

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

MARIANE VEDOVATTI MONFARDINI

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE AMOSTRAS DE
Escherichia coli ENTEROAGREGATIVA (EAEC) E COM PADRÃO *CHAIN-LIKE*
ADHESION (CLA) ISOLADAS DE CRIANÇAS COM E SEM DIARREIA**

VITÓRIA
2012

MARIANE VEDOVATTI MONFARDINI

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE AMOSTRAS DE
Escherichia coli ENTEROAGREGATIVA (EAEC) E COM PADRÃO *CHAIN-LIKE*
ADHESION (CLA) ISOLADAS DE CRIANÇAS COM E SEM DIARREIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial de obtenção do Grau de Mestre em Doenças Infecciosas.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Liliana Cruz Spano

Co-orientador: Isabel Cristina Affonso Scaletsky

VITÓRIA
2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestranda MARIANE VEDOVATTI MONFARDINI apresentou a dissertação intitulada “**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE AMOSTRAS DE *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA (EAEC) E COM PADRÃO *CHAIN-LIKE ADHESION* (CLA) ISOLADA DE CRIANÇAS COM E SEM DIARREIA**” em sessão pública, no dia 27 de abril de 2012, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu (X) **aprovar** () **reprovar** a dissertação para habilitar a farmacêutica MARIANE VEDOVATTI MONFARDINI a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 27 de abril de 2012

Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Junior
(Membro Externo)

Prof. Dr. Moises Palaci
(Membro Interno)

Prof. Dra. Lilliana Cruz Spano
(Orientadora)

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Monfardini, Mariane Vedovatti, 1985-
M742c Caracterização genotípica e fenotípica de amostras de *Escherichia coli*
enteroagregativa (EAEC) e com padrão *chain-like adhesion* (CLA)
isoladas de crianças com e sem diarreia / Mariane Vedovatti Monfardini. –
2012.
95 f. : il.

Orientadora: Liliana Cruz Spano.

Coorientadora: Isabel Cristina Affonso Scaletsky.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. *Escherichia coli*. 2. Genes. 3. Virulência (Microbiologia). 4.
Biofilme. I. Spano, Liliana Cruz. II. Scaletsky, Isabel Cristina Affonso. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV.
Título.

CDU: 61

Aos meus pais, Marcos e Celiane, pelo amor incondicional e incentivo nas minhas decisões.

Ao meu esposo Leonardo pelo carinho, força e compreensão em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me abençoar todos os dias e me proporcionar o convívio com pessoas tão especiais.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Liliana Cruz Spano, pelo exemplo, amizade, dedicação, paciência e confiança no meu trabalho.

À Dr^a Isabel Cristina Affonso Scaletsky por enriquecer o presente trabalho com contribuição técnico-científica.

Aos Professores da Microbiologia pelo apoio, em especial à Mariceli e Ana Paula por disponibilizarem seus laboratórios.

Aos Professores da Pós Graduação pelos conhecimentos transmitidos, em especial à Dra Angélica pelo auxílio e esclarecimento nas análises estatísticas.

À professora Sônia Kitagawa pelos ensinamentos e confiança no meu trabalho.

Às minhas amigas, Laura, Keyla e Marina, que fazem parte do LabGIn e as que já fizeram parte, Lilian, Yohanna, pelos momentos de distração e apoio nos experimentos.

À Luciana e Ronaldo, queridos amigos do LabVir, por toda disposição e amizade.

À Heloísa, Érica, Lia Mara e todos os Funcionários do Laboratório da Microbiologia pelo companheirismo e por proporcionarem a realização dos experimentos.

À farmacêutica do Laboratório de Micologia, Simone, por sua disposição e paciência em ajudar.

À Tamara, por gentilmente ter preparado e enviado os isolados utilizados como controle. Ao Doutorando Paulo Wagner (Engenharia Ambiental) por ter permitido e acompanhado a utilização do leitor de microplaca.

A todos os alunos da Pós-Graduação e Iniciação Científica dos laboratórios da microbiologia, pela confiança e amizade.

Aos Amigos da Turma da Pós por fazerem parte dessa conquista.

Aos meus pais, esposo, irmão e todos os familiares pela torcida, incentivo e apoio.

Aos meus afilhados e sobrinhos pela alegria proporcionada.

À FAPES pela concessão da bolsa de mestrado e CNPq pelo financiamento do projeto.

Obrigada a todos!

RESUMO

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é considerada um patógeno emergente de diarreia aguda e persistente em crianças, conhecida pela heterogeneidade de isolados. O objetivo deste estudo foi caracterizar, através de métodos genotípicos e fenotípicos, amostras de *E. coli* com padrão de aderência agregativo (AA), positivas ou negativas para plasmídeo pAA, e de *E. coli chain-like adhesion* (CLA) de crianças com até doze anos de idade, com e sem diarreia, provenientes de comunidades quilombolas e de bairros de periferia do Norte do Espírito Santo, Brasil. Foram analisadas um total de 202 amostras (57 e 145 de crianças com e sem diarreia, respectivamente), sendo 189 EAEC (81 pAA+ e 108 pAA-) e 13 *E. coli* com padrão CLA, por: (i) PCR *monoplex* e *multiplex* para detecção de 20 genes de virulência, plasmidiais e/ou cromossômicos (*aggA*, *aafA*, *agg-3A*, *aggR*, *aap*, *shf*, *agn43*, *astA*, *pet*, *sen*, *set1A*, *sat*, *hlyA*, *irp2*, *iucA*, *chuA*, *papC*, *sfa*, *fis*, e *yafK*) e categorizados qualitativamente conforme a frequência encontrada; (ii) Teste de formação de biofilme em superfície abiótica, em meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco com 0,4% de glicose, corado com safranina e cristal violeta seguido por leitura de densidade ótica para classificação em formador (forte e fraco) e não formador; (iii) Ensaio de formação de película em caldo Mueller Hinton sob agitação a 37°C por 20 horas, e classificados em *score* (0, 1+, 2+, 3+). Os seguintes genes foram detectados nos isolados de EAEC: (i) *fis* e *yafK* em altíssima frequência (>80% das amostras); (ii) *irp2*, *pet*, *agn43* e *iucA* em alta frequência (30-50% das amostras); (iii) *astA* e *shf* em moderada frequência (20-30%); (iv) *aap*, *aggR*, *sat*, *set1A* e *chuA* em baixa frequência (10-20%) e; (v) *aafA*, *aggA*, *agg-3A*, *hlyA*, *papC* e *sen* em baixíssima frequência (<10%). O gene *sfa* não foi encontrado. O gene *agn43* foi estatisticamente significativo entre as amostras de EAEC de crianças com diarreia ($p < 0,05$). EAEC típica e atípica corresponderam a 16,4% e 83,6% do isolados, respectivamente, e não foram associadas à diarreia ($p > 0,05$). Os genes *aap* e *agn43* foram isoladamente associados aos isolados de EAEC atípica de crianças com diarreia ($p < 0,05$). O gene *chuA* foi associado aos isolados de EAEC pAA- de crianças com diarreia ($p < 0,05$). Foram produtoras de biofilme 30,7% (safranina) e 24,9% (cristal violeta) das amostras de EAEC e nenhuma das amostras com padrão CLA. Os genes *aap*, *agg-3A*, *aggR* e *shf* foram significantes entre os isolados biofilme+ ($p < 0,05$). A formação de película foi encontrada em 72% das amostras de EAEC e em 100% das *E. coli* com padrão CLA. Nas amostras com padrão CLA foram detectados nove dos 20 genes pesquisados [*fis* (100%), *pet* (92,3%), *iucA* (76,9%), *yafK* (76,9%), *agn43* (69,2%), *chuA* (7,7%), *hlyA* (15,4%), *irp2* (23,1%) e *shf* (7,7%)]. Estes resultados demonstram (i) a baixa frequência de EAEC típica na população estudada, (ii) genes que codificam as adesinas AAF em baixíssima frequência, (iii) a formação de biofilme incomum nas amostras de EAEC e não associada à diarreia, (iv) altíssima frequência do gene *pet* nas amostras de *E. coli* com padrão CLA (v) *E. coli* com padrão CLA com características genotípicas e fenotípicas distintas da EAEC. Estes resultados confirmam a heterogeneidade genética das amostras de EAEC e sugerem subpopulações mais virulentas (EAEC *agn43+*, EAEC atípica *aap+* e/ou *agn43+* e, EAEC pAA- *chuA+*).

Palavras-chave: 1. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC). 2. *Escherichia coli* com padrão *chain-like adhesion* (CLA). 3. Genes de virulência. 4. Formação de biofilme. 5. Formação de película.

ABSTRACT

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is an emerging pathogen of acute and persistent diarrhea in children, recognized by the heterogeneity among the strains. The aim of this study was to characterize, by genotypic and phenotypic methods, EAEC isolates, positive and negative for pAA plasmid, and *E. coli* isolates with chain-like adhesion pattern (CLA), from children up to twelve years old, with and without diarrhea, from “quilombola” communities and neighborhoods in the outskirts of the Northern Espírito Santo, Brazil. Were analyzed a total of 202 isolates (57 and 145 children with and without diarrhea, respectively), 189 EAEC (81 pAA+ and 108 pAA-) and 13 *E. coli* with CLA pattern, by: (i) Multiplex and monoplex PCR for 20 plasmid and/or chromosomal virulence genes (*aggA*, *aafA*, *agg-3A*, *aggR*, *aap*, *shf*, *agn43*, *astA*, *pet*, *sen*, *set1A*, *sat*, *hlyA*, *irp2*, *iucA*, *chuA*, *papC*, *sfa*, *fis*, e *yafK*), which were qualitatively categorized according to the frequency found, (ii) Test of biofilm formation on abiotic surface in Dulbecco’s modified Eagle’s minimal medium with 0.4% glucose, stained with safranin or crystal violet and classified as strong or weak former and not former according optical density, (iii) Testing for clump formation in Mueller Hinton Broth with shaking at 37 °C for 20 hours, and classified into score (0, 1+, 2+, 3+). The following genes were detected in EAEC isolates: (i) *fis* and *yafK* at a very high frequency (> 80%), (ii) *irp2*, *pet*, *agn43* and *iucA* in high frequency (30-50%); (iii) *astA* and *shf* in moderate frequency (20-30%), (iv) *aap*, *aggR*, *sat*, *set1A* and *chuA* in low frequency (10-20%) and (v) *aafA*, *aggA*, *agg-3A*, *hlyA*, *papC* and *sen* at very low frequency (<10%). The *sfa* gene was not found. The *agn43* gene was statistically significant in EAEC isolates out of children with diarrhea ($p < 0.05$). Typical and atypical EAEC, accounted for 16.4% and 83.6% of the isolates, respectively, and were not associated with diarrhea ($p > 0.05$). *aap* and *agn43* genes were individually associated with atypical EAEC isolates from children with diarrhea ($p < 0.05$). The *chuA* gene was associated with EAEC pAA- isolated from children with diarrhea ($p < 0.05$). Biofilm former were observed in 30.7% (safranin) and 24.9% (crystal violet) in EAEC and none out of the *E. coli* with CLA pattern. The *aap*, *agg-3A*, *aggR* and *shf* genes were significant among biofilm + EAEC isolates ($p < 0.05$). The clump formation was found in 72% of the EAEC and 100% of *E. coli* with CLA pattern. Nine out of 20 genes were detected in *E. coli* with CLA pattern [*fis* (100%), *pet* (92.3%), *iucA* (76.9%), *yafK* (76.9%), *agn43* (69.2%), *chuA* (7.7%), *hlyA* (15.4%), *irp2* (23.1%) and *shf* (7.7%)]. These results demonstrate (i) the low frequency of typical EAEC, (ii) genes encoding the AAF adhesins at very low frequency, (iii) biofilm formation in few of EAEC isolates and not associated with diarrhea, (iv) high frequency *pet* gene in isolates of *E. coli* with CLA pattern; (v) *E. coli* with CLA pattern with distinct genotypic and phenotypic characteristics from EAEC. These results confirm the genetic heterogeneity of EAEC isolates and suggest the presence of more virulent subpopulations (EAEC *agn43*+, atypical EAEC *aap* + and/or *agn43*+ and EAEC pAA- *chuA*+).

KEY WORDS: 1. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). 2. *E. coli* with chain-like adhesion pattern (CLA). 3. Virulence genes. 4. Biofilm formation. 5. Clump formation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação esquemática da patogênese resumida dos seis patotipos diarreio gênicos de *E. coli*. (Adaptado de Kaper et al., 2004)17
- Figura 2** – Mapa de restrição (*MluI*) do plasmídeo pAA2 da cepa EAEC 042 (Czeczulin et al., 1999).....20
- Figura 3** – Estágios de formação de biofilme (Reimpresso em Houd & Michiels, 2005).....22
- Figura 4** – Modelo proposto para a função da dispesina no protótipo EAEC 042. (Adaptado de Velarde et al., 2007).....26
- Figura 5** – Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio de produtos de PCR multiplex para os genes *pet* (600pb), *set1A* (309pb) e *astA* (110pb). Col. 1- Padrão de peso molecular 100 pb; Col. 2 e 8 - Amostras *pet+*, *set1A+* e *astA+*; Col. 3, 4 e 9- Amostras *astA+*; Col. 5, 12, 17 e 18 - Amostras negativas; Col. 6, 13, 15 e 16 - Amostras *pet+*; Col.7 - Amostra *astA+* e *pet+*; Col.10, 11 e 14 - Amostras *set1A+* e *pet+*; Col. 19 e 20 - Controle positivo e negativo, respectivamente.....44
- Figura 6** – Ensaio de capacidade de formação de biofilme de EAEC em placas de poliestireno após a solubilização do corante safranina (A) e cristal violeta (B), das mesmas amostras. A intensidade da coloração está relacionada à capacidade de formação de biofilme.....50
- Figura 7** – Resultado do ensaio de formação de película: (A) negativo (0), (B) uma cruz (1+), (C) duas cruces (2+) e (D) três cruces (3+).....55

LISTA DE FLUXOGRAMA, QUADROS E GRÁFICOS

FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 – Esquema do processamento das amostras.....	37
--	----

QUADROS

Quadro 1 – Relação das amostras de <i>E. coli</i> utilizadas como controles positivos nos diversos experimentos.....	36
Quadro 2 - <i>Primers</i> e condições usadas nos ensaios de PCR <i>monoplex</i>	39
Quadro 3 - <i>Primers</i> e condições usadas nos ensaios de PCR <i>multiplex</i> para os genes <i>astA</i> , <i>pet</i> e <i>set1A</i>	40
Quadro 4 - <i>Primers</i> e condições usadas nos ensaios de PCR <i>multiplex</i> para os genes <i>papC</i> e <i>sfa</i>	40
Quadro 5 - <i>Primers</i> e condições usadas nos ensaios de PCR <i>multiplex</i> para os genes <i>iucA</i> e <i>chuA</i>	40

GRÁFICOS

Gráfico 1 – Box-plot das densidades ópticas das amostras de EAEC formadoras e não formadoras de biofilme utilizando o corante safranina (A) e cristal violeta (B).....	51
Gráfico 2 – Representação das médias das densidades ópticas em comprimento de onda de 490nm e 570 nm dos corantes safranina e cristal violeta, respectivamente, correspondente aos ensaios de formação de biofilme do controle positivo (EAEC 042), controles negativos (HB101 e DH5 α) e das amostras de EAEC pAA +.....	53
Gráfico 3 – Representação das médias das densidades ópticas em comprimento de onda de 490nm e 570 nm dos corantes safranina e cristal violeta, respectivamente, correspondente aos ensaios de formação de biofilme do controle positivo (EAEC 042), controles negativos (HB101 e DH5 α) e das amostras de EAEC pAA -.....	53
Gráfico 4 – Representação das médias das densidades ópticas em comprimento de onda de 490nm e 570 nm dos corantes safranina e cristal violeta, respectivamente, correspondente aos ensaios de formação de biofilme do controle positivo (EAEC 042), controles negativos (HB101 e DH5 α) e das amostras de <i>E. coli</i> com o padrão CLA.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Potenciais fatores de virulência descritos em EAEC.....	24
Tabela 2 – Presença dos genes de virulência entre amostras de EAEC pAA+ e pAA- de crianças com ou sem diarreia residentes em comunidades quilombolas e da periferia do norte do Espírito Santo.....	44
Tabela 3 – Perfil genético das amostras de EAEC pAA+ e pAA- de crianças com ou sem diarreia residentes em comunidades quilombolas e da periferia do norte do Espírito Santo.....	45
Tabela 4 – Distribuição dos genes de virulência entre as amostras de EAEC pAA+ e pAA- isoladas de crianças sintomática e assintomática residentes em comunidades quilombolas e da periferia do norte do Espírito Santo.....	48
Tabela 5 – Distribuição dos genes de virulência entre as amostras de EAEC típicas e EAEC atípicas isoladas de crianças sintomáticas e assintomática residentes em comunidades quilombolas e da periferia do norte do Espírito Santo.....	49
Tabela 6 – Classificação das EAEC (pAA+ e pAA-) formadoras de biofilme em fracas e fortes formadoras.....	52
Tabela 7 – Distribuição dos genes de virulência entre amostras de EAEC pAA+ e pAA-, formadoras e não formadoras de biofilme, classificados conforme corante safranina.....	54
Tabela 8 – Resultados do ensaio de formação de película (<i>score</i>) nas amostras de EAEC pAA+ e pAA- isoladas de crianças sintomáticas e assintomáticas.....	55
Tabela 9 – Distribuição dos genes de virulência entre amostras de EAEC pAA+ e pAA- formadoras e não formadoras de película na interface ar-líquido.....	56
Tabela 10 – Resultados do ensaio de formação de película (<i>score</i>) nas amostras de EAEC não formadoras, fraca formadoras e forte formadoras de biofilme.....	57
Tabela 11 – Presença dos genes pesquisados nas amostras de <i>E. coli</i> com padrão CLA isoladas de crianças sintomáticas e assintomáticas residentes em comunidades quilombolas e da periferia do norte do Espírito Santo.....	58
Tabela 12 – Perfil genético das amostras de <i>E. coli</i> apresentando o padrão CLA isoladas de crianças sintomáticas e assintomática residentes em comunidades quilombolas e da periferia do norte do Espírito Santo.....	58
Tabela 13 – Resultados do ensaio de formação de película (<i>score</i>) nas amostras de <i>E. coli</i> com padrão CLA isoladas de crianças sintomáticas e assintomáticas.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

\bar{x} – Média

AA - Aderência Agregativa

AAF – Fímbria de Aderência Agregativa

AAF/I – Fímbria de Aderência Agregativa tipo I

AAF/II – Fímbria de Aderência Agregativa tipo II

AAF/III – Fímbria de Aderência Agregativa tipo III

AAF/IV – Fímbria de Aderência Agregativa tipo IV

Ag43 – Antígeno 43

AMPc – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

BFP – *Bundle-forming pilus* (pilus formadores de feixe)

CDEC – *Cell detaching Escherichia coli* (*Escherichia coli* destacadora de células)

CLA – *Chain-like adhesion* (aderência em cadeia)

DA – Aderência difusa

DAEC – *Diffusely adherent Escherichia coli* (*Escherichia coli* de aderência difusa)

DEC – *Escherichia coli* Diarreiogênica

DMEM – *Dulbecco's minimum essential medium* (Meio essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco)

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

dNTP – *Deoxyribonucleotide triphosphates* (Deoxinucleotídeo Trifosfato)

DO – Densidade óptica

DP – Desvio padrão

EAEC – *Enteraggregative Escherichia coli* (*Escherichia coli* enteroagregativa)

EAF – EPEC *adherence factor* (fator de aderência de EPEC)

EAST1 – EAEC *heat-stable enterotoxin 1* (Toxina termo estável de EAEC 1)

EHEC – *Enterohaemorrhagic Escherichia coli* (*Escherichia coli* enterohemorrágica)

EIEC – *Enteroinvasive Escherichia coli* (*Escherichia coli* enteroinvasora)

EPEC – *Enteropathogenic Escherichia coli* (*Escherichia coli* enteropatogênica)

EPS – *Extracellular Polymeric Substances* (Substâncias Polimérica Extracelular)

ETEC – *Enterotoxigenic Escherichia coli* (*Escherichia coli* enterotoxigênica)

Gb3Cer – *Globotriaosylceramide* (Glicosíngolípido globotriaosilceramida)

GMPc – *Cyclic guanosine monophosphate* (Monofosfato cíclico de guanosina)

GO – Goiás

HIV – *Human immunodeficiency virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

LA – *Localized adherence* (Aderência Localizada)

LAL – *Localized-like adherence* (Aderência Localizada-like)

LB – Luria Bertani (caldo Luria Bertani)

LEE – *Locus of enterocyte effacement*

LPS – Lipopolissacarídeo

LT – *Heat Labile toxin* (enterotoxina termo-lábil)

MA – Maranhão

ORF – *Open reading frame* (região aberta de leitura)

pAA- – Isolado sem o plasmídio pAA

pAA – *Plasmid of aggregative adhesion* (Plasmídio de aderência agregativa)

pAA+ – Isolado com o plasmídio pAA

PAI – *Pathogenicity island* (Ilha de patogenicidade)

PBS – *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato salino)

ShET1 - *Shigella enterotoxin 1* (enterotoxina tipo 1 de *Shigella*)

ST – *Heat Stable toxin* (Toxina termo estável)

UPEC – Uropathogenic *Escherichia coli* (*Escherichia coli* uropatogênica)

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 <i>Escherichia coli</i>	16
2.2 Patotipos diarréiogênicos de <i>Escherichia coli</i>	16
2.3. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	19
2.3.1. Caracterização	19
2.3.2. Patogênese.....	20
2.3.2.1. Biofilme por EAEC	21
2.3.2.2. Potenciais fatores de virulência	23
2.3.3. Epidemiologia.....	30
2.3.4. Diagnóstico	31
3. OBJETIVO	34
3.1. Objetivo Geral	34
3.2. Objetivos Específicos.....	34
4. METODOLOGIA	35
4.1. Origem e características das amostras bacterianas	35
4.2. Extração do DNA bacteriano	36
4.3. Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	37
4.4. Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica.....	41
4.5. Ensaio de formação de película.....	42
4.6. Análise estatística	42
5. RESULTADOS	43
5.1. Caracterização genotípica de virulência das amostras de EAEC pAA+ e pAA-.....	43
5.1.1. Presença de sequências genéticas associadas à virulência de EAEC e distribuição em EAEC pAA+ e pAA-.....	43
5.1.2. Distribuição dos genes de virulência entre amostras de EAEC típicas e atípicas isoladas de crianças sintomáticas e assintomáticas	49
5.2. Caracterização fenotípica de virulência das amostras de EAEC pAA+ e pAA-.....	50
5.2.1 Análise qualitativa e quantitativa da formação de biofilme	50
5.2.2. Análise da formação de película na interface ar-liquido.....	55
5.2.3. Análise entre amostras de EAEC formadoras e não formadoras de biofilme e de película.....	56
5.3. Caracterização genotípica e fenotípica de virulência das amostras de <i>E. coli</i> apresentando o padrão CLA	57
5.3.1. Presença de sequências genéticas associadas à virulência de EAEC	57

5.3.2. Análise da formação de biofilme e película.....	59
6. DISCUSSÃO.....	60
6.1. Genes de virulência em amostras de EAEC.....	60
6.2. Caracterização genotípica das EAEC típica e atípica.....	68
6.3. Caracterização genotípica das EAEC positivas e negativas para o plasmídio pAA	70
6.4. EAEC e formação de biofilme.....	72
6.5. EAEC e formação de película.....	74
6.6. <i>E. coli</i> com padrão CLA: fatores genotípicos e fenotípicos.....	75
6.7. Combinações de genes nas amostras de EAEC	76
6.8. Considerações finais	77
7. CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	79
ANEXO 1 – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....	93
ANEXO 2 – Meios de cultura e soluções utilizados	94

1. INTRODUÇÃO

A doença diarreica é importante causa de morbidade e mortalidade em todo mundo, sendo mais prevalente em países em desenvolvimento, devido, em grande parte, à falta de saneamento, higiene e água potável (Bern et al., 1992; UNICEF/WHO, 2009). Vírus, parasitas e bactérias são as principais causas infecciosas de diarreia (Albert et al., 1999) e destes, os agentes infecciosos bacterianos ganham destaque em regiões em desenvolvimento (Gomes et al., 1991; Youssef et al., 2000; Moreno et al., 2010). Dentre os agentes bacterianos, por sua vez, a *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC) tem um papel importante. Seis patotipos de DEC são conhecidos e classificados com base na patogênese, manifestações clínicas e pela presença de fatores de virulência e destes, a *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) têm emergido com importante patógeno (Nataro & Kaper, 1998; Harrington et al., 2006).

EAEC, um dos últimos patotipos descritos, é caracterizada por não secretar as enterotoxinas termo lábil (LT) e termo-estável (ST) e aderir a células HEp-2 com um padrão de aderência agregativo (AA) (Nataro & Kaper, 1998). Uma variante deste padrão de aderência foi caracterizada como *chain-like adhesion* (CLA) por Gioppo et al. (2000). Estudos em países desenvolvidos e em desenvolvimento têm relacionado a EAEC à diarreia aguda e persistente em crianças, a surtos de gastroenterite e à diarreia crônica de pacientes com HIV (Bardhan et al., 1998; Gassama-Sow, et al, 2004; Harada et al. 2007; Moreno et al., 2010). Porém, muitos estudos não são capazes de determinar a importância da EAEC como causa de doença por ser um patotipo também encontrado em indivíduos sem diarreia (Scaletsky et al. 2002; Bueris et al., 2007; Spano et al. 2008). Vários fatores prováveis de virulência vêm sendo descritos com objetivo de caracterizar esse patotipo e diferenciar os isolados de pacientes com diarreia de assintomáticos. Isso tem permitido evidenciar a EAEC como patotipo caracteristicamente heterogêneo com nenhum fator de virulência comum a todos os isolados (Kahali et al., 2004; Huang et al. 2007).

A patogênese da EAEC não é completamente compreendida, mas é proposto um modelo constituído por aderência com formação de biofilme na mucosa intestinal, o que pode levar à diarreia persistente ou ainda, a uma colonização prolongada em pacientes assintomáticos (Nataro et al., 1998).

Dessa forma, no intuito de caracterizar genotipicamente e fenotipicamente isolados de EAEC e de *E. coli* com padrão CLA de crianças com e sem diarreia, o presente estudo descreve o repertório de 20 genes de virulência, a capacidade de formação de biofilme em superfície abiótica e a formação de película em interface ar-líquido.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli, considerado o principal anaeróbico facultativo da microbiota do cólon humano, é um bacilo gram negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae* (Nataro & Kaper, 1998). Coloniza o trato gastrointestinal poucas horas após o nascimento, geralmente como comensal (Kaper et al., 2004). Dado à sua grande plasticidade genômica, a aquisição de elementos genéticos móveis levou ao surgimento de patógenos altamente adaptados e capazes de causar doenças, desde gastroenterites a infecções extra intestinais como infecção do trato urinário, sanguínea e do sistema nervoso central (Croxen & Finlay, 2010).

2.2 Patotipos diarreio gênicos de *Escherichia coli*

Os isolados de *E. coli* capazes de causar infecção entérica são conhecidos como patotipos diarreio gênicos de *Escherichia coli* (DEC) e estão entre os patógenos bacterianos mais comuns isolados de pacientes com diarreia em todo mundo (Flores & Okhuysen, 2009). Seis patotipos de DEC são conhecidos e classificados, com base na patogênese, manifestações clínicas e pela presença de fatores de virulência, em: *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteropatogênica típica e atípica (tEPEC e aEPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (Nataro & Kaper, 1998; Okeke, 2009; Croxen & Finlay, 2010) (Figura 1). CDEC (*Cell Detaching E. coli*) trata-se de um potencial patotipo de DEC cujo papel na diarreia ainda carece de ser estabelecido e é caracterizado pela atividade hemolítica e capacidade de destacar monocamadas de célula em superfície de cultura *in vitro* (Gunzburg et al., 1993; Okeke, 2009).

EPEC, primeiro patotipo descrito, permanece como importante causa de diarreia infantil em países em desenvolvimento (Nataro & Kaper, 1998). Conhecido por não produzir toxina de Shiga (stx), este patotipo é dividido em EPEC típica (tEPEC) e atípica (aEPEC), pela presença e ausência, respectivamente, do plasmídeo EAF (EPEC *adherence factor*), que codifica o pilus tipo IV chamado de BFP (*Bundle-forming pilus*). O BFP participa da aderência bactéria-bactéria e bactéria-células epiteliais e é responsável pelo padrão de aderência localizada (LA) em cultura de célula HEP-2 ou HeLa (Giron et al., 1991; Nataro & Kaper, 1998; Tobe et al., 1999). A aEPEC descrita também como causa de diarreia em

adultos, apresenta um padrão localizado-*like* (LAL) bem como o agregativo (AA) e difuso (DA) (Dulguer et al., 2003; Kaper et al., 2004). A lesão A/E (*attaching/effacing*), característica histopatológica intestinal da infecção pela EPEC, é formada pela aderência inicial e íntima às células da mucosa intestinal e induz mudanças notáveis no citoesqueleto, incluindo acúmulo de actina polimerizada que forma estruturas semelhantes a um pedestal, levando assim, à destruição da microvilosidade (Kaper et al., 2004; Vidal et al., 2007). Genes presentes na ilha de patogenicidade (PAI) denominada região LEE (*Locus of enterocyte effacement*), também presente no patotipo EHEC, são responsáveis pela formação da lesão A/E (McDaniel et al., 1995).

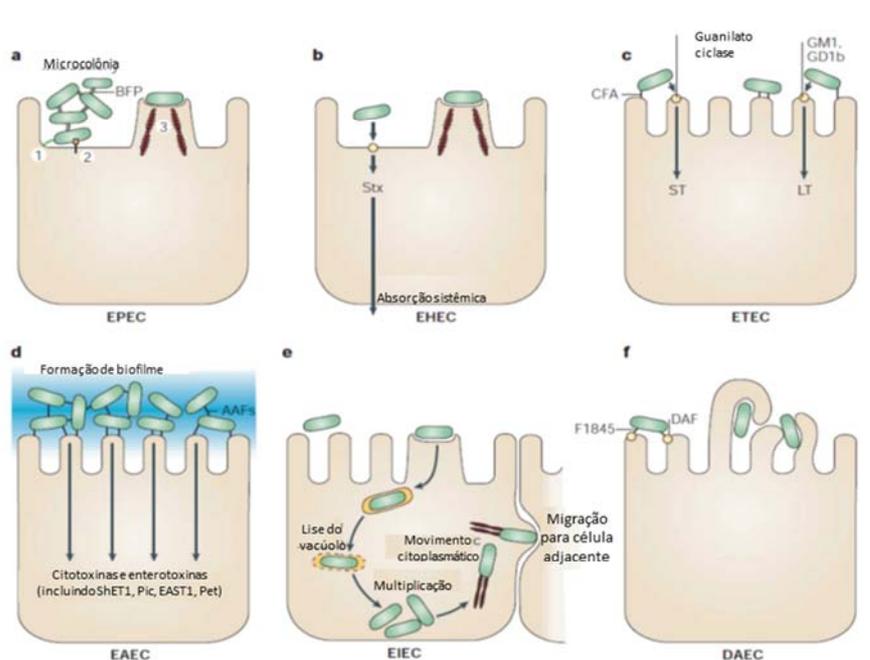


Figura 1 – Representação esquemática da patogênese resumida dos seis patótipos diarreiogênicos de *E. coli*. (Adaptado de Kaper et al., 2004)

EHEC foi reconhecida pela primeira vez como causa de doença humana em um surto de diarreia sanguinolenta associada à ingestão de hambúrguer mal cozido (Riley et al., 1983) e, casos de síndrome urêmica hemolítica associados com a presença de citotoxina produzida por *E. coli* (Karmali et al., 1983). Ambos os fatos levaram ao reconhecimento desse importante patógeno entérico (Nataro & Kaper, 1998). O principal reservatório desse patótipo é o trato gastrointestinal de bovinos e devido à sua baixa dose infecciosa (menos de 100 células) causa numerosos surtos (Kaper et al., 2004). A patogênese da EHEC é devido à produção da toxina Stx, conhecida como verocitotoxina ou toxina Shiga-*like*, que se liga a receptores celulares

Gb3Cer (glicoesfingolípídeo globotriaosilceramida). Após a interação com receptor, a toxina é endocitada, clivada, e então uma de suas subunidades “inativa” o ribossomo inibindo a síntese proteica (Zoja et al., 2010). O dano causado por essa toxina torna esse patotipo associado à colite hemorrágica e, em alguns casos, à síndrome hemolítica urêmica. De um modo geral, os isolados de *E. coli* que produzem a toxina Stx e que não possuem a ilha de patogenicidade LEE são denominados STEC (*E. coli* produtora da toxina de shiga) (Kaper, et al., 2004).

ETEC é causa de diarreia infantil em países em desenvolvimento e a principal causa de diarreia de viajantes para esses países (Guth, 2000; Shah et al., 2009). A diarreia é caracterizada por fezes aquosas e sua patogênese está associada à liberação das enterotoxinas termo lábil (LT) e ou termo estável (ST). As enterotoxinas ligam-se a seus receptores (gangliosídeo GM1 ou guanilato ciclase), desencadeiam uma sinalização intracelular levando ao acúmulo de mensageiros secundários (AMPc - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico - ou GMPc – monofosfato cíclico de guanosina), o que aumenta a secreção de íons e água para a luz intestinal (Kaper et al., 2004, Qadri et al., 2005).

EIEC, bioquímica, genética e patogênicamente relacionada à *Shigella* spp., é o único patotipo de DEC verdadeiramente intracelular, capaz de invadir e se replicar em células epiteliais e macrófagos, levando à morte destes por apoptose. Além disso, pode elaborar uma ou mais enterotoxinas importantes na patogênese da diarreia (Nataro & Kaper, 1998; Kaper et al., 2004).

DAEC é definida pela presença do padrão característico de aderência difusa em cultura de célula HEp-2 (Scaletsky et al., 1984; Okeke, 2009). Tem sido implicada como causa de diarreia em alguns estudos, entretanto seus mecanismos de virulência não estão bem estabelecidos (Nataro & Kaper, 1998; Torres et al., 2005; Lopes et al., 2005). Estudos têm mostrado que a DAEC é capaz de induzir a extensão de projeções longas e finas da superfície celular, que envolve a bactéria e a protege da ação de antimicrobianos (Yamamoto et al., 1992; Cookson & Nataro, 1996).

A EAEC, por se tratar do objeto deste estudo, será abordada com mais detalhes nos itens seguintes.

2.3. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

2.3.1. Caracterização

EAEC foi um dos últimos patótipos de *E. coli* descrito. Inicialmente, Scaletsky et al.(1984) e Nataro et al.(1985) mostraram um padrão de aderência em células HEp-2 claramente distinto do padrão localizado (LA) da EPEC, sendo o novo padrão descrito, à princípio, como aderência difusa (DA). Nataro et al. (1987), investigando a aderência de *E. coli* de crianças chilenas com diarreia e saudáveis, foram capazes de subdividir o fenótipo anteriormente descrito como aderente "difuso" em duas categorias: aderência agregativa (AA) e a verdadeira aderência difusa (DA). A alta prevalência do padrão AA em *E. coli* de crianças com diarreia, levou à criação do novo patótipo de DEC, denominado EA_{Agg}EC, ou simplesmente, EAEC (Nataro & Kaper, 1998).

O patótipo EAEC é caracterizado por cepas de *E. coli* que não secretam as enterotoxinas termo-lábil (LT) e termo-estável (ST) e que aderem a células HEp-2 com um padrão AA. O padrão AA foi distinguido dos outros padrões pela proeminente autoaglutinação das células bacterianas uma nas outras, o que frequentemente ocorre na superfície das células, bem como na lamínula de vidro livre das células HEp-2. Essa agregação, caracterizada por camadas de bactérias, foi descrita como a configuração de "tijolo empilhado" (Nataro & Kaper, 1998). Um tipo de aderência definido como *chain-like adhesion* (CLA), caracterizado pela disposição em cadeia das células bacterianas, foi sugerido como uma variante do padrão AA, visto que isolados com esse padrão apresentavam pelo menos uma sequência de gene descrito no protótipo EAEC 042 e que alguns isolados apresentavam genes *aggC* e *aggR* (Gioppo et al., 2000).

O fenótipo de aderência agregativa (AA) foi associado à presença de plasmídios, então denominados pAA (pAA1 e pAA2). O plasmídio pAA1 possui 60 MDa, presente no protótipo EAEC 17-2 (sorotipo O3:H2) e isolado de criança chilena com diarreia (Vial et al., 1988), possui os genes que codificam a fímbria de aderência agregativa (AAF/I), o regulador transcricional *AggR* e a toxina EAST1 (Toxina termo estável de EAEC) (Savarino et al., 1991; Nataro et al., 1992, 1994). O plasmídio pAA2, de aproximadamente 100 Kb, presente no protótipo EAEC 042 (O44:H18) e isolado de uma criança com diarreia no Peru (Czeczulin et al., 1999), codifica muitos fatores de virulência bem caracterizados como a toxina Pet, a fímbria de aderência agregativa II (AAF/II), o regulador transcricional *aggR*, a proteína Shf,

a toxina EAST1, a dispersina e seu sistema de secreção Aat (Figura 2) (Czeczulin et al., 1999; Chaudhuri et al., 2010).

EAEC pode ser classificada como típica ou atípica de acordo com a presença ou ausência do regulador transcricional AggR, respectivamente (Kaper et al. 2004; Sarantuya et al., 2004). Embora os estudos tenham considerado este critério, Kaper et al. (2004) sugeriram que o termo EAEC típica fosse reservado para cepas que carregariam AggR e pelo menos um grupo de genes regulados por AggR, e o termo EAEC atípica, para cepas sem o regulador transcricional AggR.

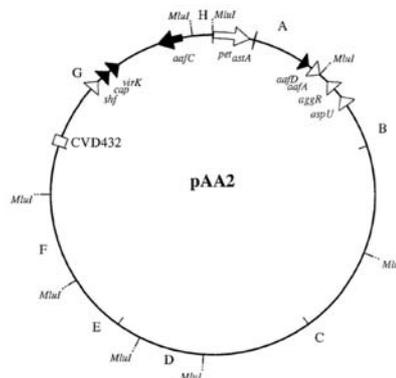


Figura 2 – Mapa de restrição (*MluI*) do plasmídeo pAA2 da cepa EAEC 042 (Czeczulin et al., 1999)

2.3.2. Patogênese

Transmitida pela rota fecal-oral, a contaminação de alimentos e água tem papel importante na transmissão da EAEC (Cennimo et al., 2007). Em estudo com voluntários, diarreia foi causada por uma dose infecciosa de 10^{10} UFC de EAEC, após um período de incubação de 8 a 18 horas (Nataro et al., 1995a).

A patogênese da infecção da EAEC não é totalmente compreendida, entretanto características histopatológicas e vários prováveis genes de virulência vem sendo descritos. Apesar da complexidade, um modelo com três estágios é proposto para a patogênese da EAEC: (i) o primeiro estágio, envolve a aderência na mucosa intestinal e/ou camada de muco através de fimbrias de aderência agregativa (AFF) ou outros fatores de colonização; (ii) no segundo, há formação do biofilme e aumento da produção de muco pelos enterócitos, o que pode promover uma colonização persistente e talvez uma má absorção de nutrientes; (iii) no terceiro e último estágio, há liberação de toxinas e indução de uma resposta inflamatória, alteração na mucosa e secreção intestinal (Nataro et al., 1998; Huang & DuPont, 2004; Harrington et al., 2006). Estes estágios serão abordadas nos subitens que se seguem.

Os sintomas mais comuns relatados na infecção com a EAEC são diarreia aquosa com ou sem sangue e muco, dor abdominal, náusea, vômito e pouca febre. A diversidade de sintomas clínicos na infecção por esse patotipo pode ser devida à heterogeneidade entre os isolados de EAEC, à dose infecciosa, a fatores de susceptibilidade genética do hospedeiro e resposta imune (Huang et al., 2006).

2.3.2.1. Biofilme por EAEC

Biofilme é definido como uma comunidade estruturada de células bacterianas incorporadas em uma matriz polimérica tridimensional autoproduzida e aderente a superfícies bióticas ou abióticas (Costerton et al., 1999).

O modelo de formação de biofilme, da diferenciação à maturação, possui pelo menos cinco estágios de desenvolvimento (Figura 3). (i) Adesão inicial reversível de bactérias planctônicas que se aproximam da superfície sólida pela corrente do fluido ou pela motilidade, e que tem que ultrapassar as forças de repulsão entre a célula e a superfície. A superfície sólida é condicionada, ou seja, pode ser modificada pela adsorção de vários solutos e alterar suas propriedades, que favorecem a aderência bacteriana inicial. (ii) Transição da aderência reversível para a irreversível, por produção de polímeros extracelulares pela bactéria e/ou por adesinas localizadas em pili ou fímbrias, que interagem com a superfície. (iii) Desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme. (iv) Formação de microcolônias dentro do biofilme maduro. Nesse estágio, as substâncias poliméricas extracelulares servem como matriz de adesão e nutrientes, no intuito de manter a produção do ambiente. Arquiteturas complexas são formadas, com estruturas semelhantes a pedestais, com canais de água e poros, onde a bactéria desenvolve padrões específicos de crescimento e apresenta diferenças fisiológicas e metabólicas das células planctônicas. (v) Dispersão de células do biofilme para o ambiente ao redor, com retorno ao estado planctônico e possibilidade de colonizar um novo ambiente. (Davey & O'Toole, 2000; Donlan, 2002; Dunne, 2002; Van Houdt & Michiels, 2005).

A diferenciação de células planctônicas em biofilmes maduros complexos, anteriormente citado, resulta de mudanças no padrão global de expressão de genes (Schembri et al., 2003; Beloin et al., 2004; Ren et al., 2004) e alterações fenotípicas tais como proteção da resposta do hospedeiro pela presença da matriz extracelular e resistência aumentada a antimicrobianos

por baixa penetração na matriz, taxa de crescimento alterada, e alterações fisiológicas por repressão/indução de genes (Donlan & Costerton, 2002; Suh et al., 2010).

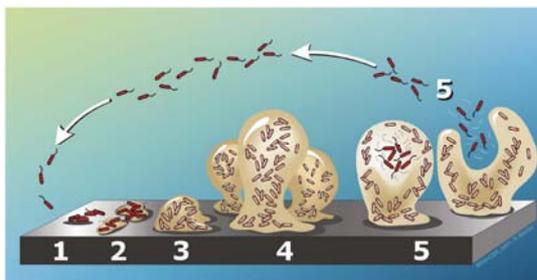


Figura 3 – Estágios de formação de biofilme (Reimpresso em Houd & Michiels, 2005)

A matriz polimérica extracelular também denominada EPS (substância polimérica extracelular) é composta principalmente por água, polissacarídeos, proteínas e ácido nucleico. EPS imobiliza as células do biofilme e as mantém intimamente próximas, permitindo fortes interações, incluindo comunicação célula-célula e microconsórcio sinérgico (Flemming & Wingender, 2010). Esta comunicação inter-celular é responsável por aumento da taxa de transferência de genes de resistência e de virulência (Donlan & Costerton., 2002; Donlan, 2002).

Celulose, PGA (β -1,6-N-acetil-D-glucosamina) e ácido colânico são os exopolissacarídeos descritos como componentes da matriz de biofilme de *E. coli*. A celulose é um homopolissacarídeo composto de D-glicopirranose com ligações glicosídicas β 1 \rightarrow 4 e tem sido associada em algumas bactérias com a habilidade de formar um biofilme rígido na interface ar-líquido (Beloin et al., 2008). O polissacarídeo PGA é um polímero envolvido na adesão de estafilococos e mostrou estar envolvido na adesão a superfícies abióticas, adesão intracelular e formação de biofilme em *E. coli* (Wang et al., 2004). O ácido colânico é um polímero carregado negativamente de glicose, galactose, fucose e ácido glicurônico, que forma uma cápsula protetora na célula bacteriana em condições ambiental e de crescimento específicos (Beloin et al., 2008).

A matriz protege os organismos contra dessecação, biocidas, alguns antibióticos e cátions metálicos, radiação ultravioleta e do reconhecimento da resposta imunológica (Flemming & Wingender, 2010). Todos esses aspectos de prováveis papéis da EPS pode contribuir para o desenvolvimento do fenótipo de resistência de biofilmes de *E. coli* patogênica e levar a infecções persistentes (Anderson et al., 2003; Justice et al., 2004).

A formação de biofilme mucoso e denso, na infecção por EAEC, pode contribuir para capacidade diarreio gênica desse patótipo e, talvez, para a habilidade de causar colonização e

diarreia persistente, conforme mencionado anteriormente, o que pode ocasionar desnutrição por diminuir a absorção de nutrientes (Nataro et al., 1996; Steiner et al., 1998; Nataro & Kaper, 1998). A colonização por EAEC pode também levar à malnutrição pelo aumento da demanda metabólica da inflamação intestinal. Os hospedeiros malnutridos, incapazes de reparar danos na mucosa, são mais propensos a terem diarreia persistente por EAEC, formando assim um ciclo (Nataro et al., 1998; Huang et al., 2006). Dessa forma, a presença da EAEC e de seu biofilme na mucosa intestinal podem agravar o estado nutricional do paciente, principalmente em hospedeiros malnutridos de países em desenvolvimento.

2.3.2.2. Potenciais fatores de virulência

Diversos fatores de virulência têm sido relacionados com a patogenicidade da EAEC, entre eles adesinas, toxinas, regulador de transcrição e sideróforos (Tabela 1).

No estágio de aderência, participam três tipos de fímbrias de aderência agregativa (AAF), requeridas para ligação com a matriz extracelular, que são codificadas por plasmídios e denominadas: AAF/I, AAF/II, AAF/III e AAF/IV (Boisen et al., 2008; Farfan et al., 2008).

AAF/I constitui fímbrias formadoras de feixe de dois a três nanômetros de diâmetro, codificadas por um *cluster* de quatro genes *aggDCBA* presente na região 1 do plasmídio de 60 MDa (pAA1). Baseado em análise mutacional, homologia de sequência de aminoácidos e dados ultra-estruturais, os produtos dos genes *aggA*, *aggC* e *aggD* são respectivamente a subunidade estrutural principal da fímbria, proteína *usher* da membrana externa e chaperona periplasmática envolvidos na biogênese de AAF/I. O ORF (*open reading frame*) *aggB* não apresentou nenhuma similaridade com outras proteínas relatadas (Nataro et al., 1992; Savarino et al., 1994). AAF/I é associada ao fenótipo AA, hemaglutinação de eritrócitos humano e autoaglutinação em meios de cultura (Nataro et al., 1992).

Na região 2 do plasmídio pAA1, ao ser sequenciado, foram identificados vários OFRs potenciais, um deles, o *aggR*, codifica uma proteína homóloga a proteínas ligadoras de DNA da família AraC (Nataro et al., 1993). O gene *aggR* é um regulador transcripcional necessário para a expressão de AAF/I, entretanto ele não é restrito ao plasmídio pAA e, além de genes plasmidiais, ele regula genes cromossômicos (Nataro et al., 1993; Harrington et al., 2006). Sugere-se que a expressão de *aggR* seja por autoativação, sendo o início da expressão necessário e suficiente para autoregulação (Morin et al., 2010).

Tabela 1 – Potenciais fatores de virulência descritos em EAEC.

Proteína (gene)	Classificação	Função	Localização	Referências
Fímbria de aderência agregativa I (AAF/I) (<i>agg</i>)	Adesina	Aderência agregativa	Plasmídio	Nataro et al., 1992; Savarino et al., 1994.
Fímbria de aderência agregativa II (AAF/II) (<i>aaf</i>)	Adesina	Aderência agregativa	Plasmídio	Czczulin et al., 1997.
Fímbria de aderência agregativa III (AAF/III) (<i>agg-3</i>)	Adesina	Aderência agregativa	Plasmídio	Bernier et al., 2002.
Fímbria de aderência agregativa IV (AAF/IV) (<i>hda</i>)	Adesina	Aderência agregativa	Plasmídio	Boisen et al., 2008.
Pili tipo IV (<i>pil</i>)	Adesina	Aderência agregativa e conjugação de plasmídio	Plasmídio	Dudley et al., 2006b.
Fímbria P (<i>pap</i>)	Adesina	Reconhece e faz ligação em digalactosídeos na membrana de enterócitos e células uroepiteliais	Cromossomo	Lund et al., 1988.
Fímbria S (<i>sfa</i>)	Adesina	Reconhecer receptores contendo ácido siálico em células eucarióticas	Cromossomo	Hacker et al., 1993.
Regulador transcricional AggR (<i>aggR</i>)	Regulador transcricional	Regula expressão de genes plasmidiais e cromossômicos	Plasmídio	Nataro et al., 1993.
Dispersina (<i>aap</i>)	Proteína de membrana externa	Antiagregação; Dispersão da EAEC na mucosa intestinal	Plasmídio	Czczulin et al., 1999. Sheikh et al., 2002.
Transportador AatA (<i>aat</i>)	Sistema de transporte	Sistema de transporte de Aap	Plasmídio	Nishi et al., 2003
Shf (<i>shf</i>)	Sem função conhecida	Relacionada a formação de biofilme na fase de maturação	Plasmídio e Cromossomo	Czczulin et al., 1999. Chaudhuri et al., 2010.
Enterotoxina termo-estável de EAEC (EAST1) (<i>astA</i>)	Toxina	Induz alteração no transporte de íons	Plasmídio	Savarino et al., 1991.
Toxina codificada pelo plasmídio (Pet) (<i>pet</i>)	Toxina	Atividade citotóxica, provavelmente pela degradação da espectrina	Plasmídio	Eslava et al., 1998
Enterotoxina de <i>Shigella</i> 1 (ShET1) (<i>set1A/pic</i>)	Toxina	Patogênese não bem estudada, mas leva ao acúmulo de líquidos	Cromossomo	Fasano et al., 1995.
Enterotoxina de <i>Shigella</i> 2 (ShET2) (<i>sen</i>)	Toxina	Responsável por causar diarreia aquosa	Plasmídio	Nataro et al., 1995b
Toxina autotransportada (Sat) (<i>sat</i>)	Toxina	Atividade citopática e proteolítica	Ilha de patogenicidade	Guyer et al., 2000.
Hemolisina α (<i>hlyA</i>)	Toxina	Leva a formação de poros aquosos na membrana celular	Ilha de patogenicidade	Guinot et al., 2000.
IucA (sintetase envolvida na síntese de aerobactina) (<i>iucA</i>)	Sideróforo	Quelante de íons férricos	Plasmídio/ Cromossomo	Lorenzo & Neilands, 1986.
Irp2 (biossíntese da yersiniabactina) (<i>irp2</i>)	Sideróforo	Quelante de íons férricos	Cromossomo	Czczulin et al., 1999.
Chu (<i>chuA</i>)	Receptor de heme na membrana externa	Captura heme para aquisição de ferro	Cromossomo	Torres & Payne, 1997.

Proteína (gene)	Classificação	Função	Localização	Referências
Antígeno 43 (<i>agn43</i>)	Proteína de membrana externa	Envolvida na agregação bacteriana e formação de biofilme	Cromossomo	Schembri et al., 2003.
Pic (<i>pic/ set1A</i>)	Proteína autotransportada	Atividade de hemaglutinina e mucinolítica	Cromossomo	Henderson, et al., 1999; Navarro-garcia & Elias, 2011.
Fis (<i>fis</i>)	Regulador transcricional	Regulador dependente da fase de crescimento (contribui para a biogênese de AAF/II via ativação de <i>aggR</i>).	Cromossomo	Sheikh et al., 2001.
YafK (<i>yafK</i>)	Sem papel sugerido	Necessário para a transcrição dos genes AAF/II	Cromossomo	Sheikh et al., 2001.

Morfológica e geneticamente diferente de AAF/I, AAF/II é constituída por fímbrias mais espessas (5 nm de diâmetro) estruturadas em feixes filamentosos mais soltos/frouxos. Codificada pelo plasmídeo pAA2 da EAEC 042, medeia a aderência dessa cepa em célula HEP-2 (Czeczulin et al., 1997). Os genes que codificam essa fímbria são organizados em dois *clusters*. Na primeira região do segmento genético encontra-se os genes *aafD*, *aafA* e *aggR* que codificam respectivamente a chaperona, a pilina e o regulador transcricional. A região 2, compreende os genes *aafD*, locus provável de uma chaperona silenciada, *aafC*, o *usher*, e *aafB*, uma invasina. O regulador transcricional *aggR* regula a biogênese de AAF/II, através dos genes *aafA* e *aafD* (Elias et al., 1999).

AAF/III são estruturas fimbriais flexíveis e longas, encontradas rodeando a superfície bacteriana em filamentos individuais. Foi descrita na EAEC típica 55989 e relacionada à agregação e adesão a células. O *cluster aag-3*, de origem plasmidial, codifica AAF/III e apresenta organização genética similar com os *clusters* descritos para AAF/I e AAF/II, sendo composta por um *cluster* de quatro ORFs: *aggD*, *aggC*, *aggB* e *aggA*. O gene *aggD* codifica uma chaperona periplasmática, *aggC* um provável *usher*, *aggB* uma proteína similar a membros da família de invasinas e *aggA* uma proteína com função de adesina. Um gene localizado *downstream* de *agg-3* codifica um produto idêntico ao AggR, mas não há evidências no seu envolvimento com a produção de AAF/III (Bernier et al., 2002).

A ausência das AAF e a permanência do padrão AA sugerem outros mecanismos de adesão, como o mediado pela adesina Hda (AAF/IV), descrita mais recentemente (Boisen et al., 2008). AAF/IV, sugerida ser regulada por *aggR*, é codificada por um *cluster* de quatro genes, *hdaA*, *hdaB*, *hdaC* e *hdaD* presente no plasmídeo pO86A1, que codificam, respectivamente, a subunidade principal da adesina, invasina, o *usher* e a chaperona (Boisen et al., 2008).

Fatores responsáveis pela aderência das EAEC atípicas não são bem definidos. Dudley et al. (2006b) descreveram em uma EAEC atípica, associada a um surto, um pili do tipo IV, codificado por um *locus* de genes presente no plasmídeo (*pilL-V*) com diversas funções, como aderência à células do hospedeiro e superfície abiótica e conjugação de plasmídeo.

A dispersina ou Aap (*anti aggregation protein*), responsável por mediar a dispersão da EAEC na mucosa intestinal, é uma proteína codificada pelo gene *aap* (originalmente designado *aspU*), que está presente no plasmídeo pAA2 (Czczulin, et al., 1999; Sheikh et al., 2002). A dispersina é secretada para a superfície da EAEC e se liga não covalentemente ao lipopolissacarídeo (LPS). O mecanismo de dispersão sugerido é mediado pela capacidade da dispersina neutralizar a forte carga negativa do LPS e as AAFs, que são fortemente carregadas positivamente, ficam livres para se deslocarem para fora da superfície celular e podem se ligar em outros sítios (Figura 4), levando a um fenótipo de antiagregação e capacidade de dispersão da bactéria pela mucosa intestinal (Harrington et al., 2006; Velarde et al., 2007).

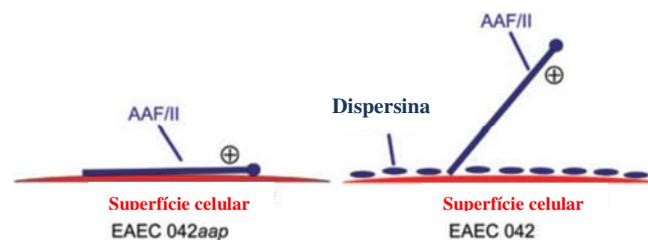


Figura 4 – Modelo proposto para a função da dispersina no protótipo EAEC 042. (Adaptado de Velarde et al., 2007)

Esse processo único de agregação e antiagregação requer um sistema de transporte ABC, codificado pelo *cluster* de cinco genes *aatPABCD* (*enteroaggregative ABC transporter*), presente no plasmídeo pAA2. Dentro desse *cluster* encontra-se a região da sonda pAA (pCVD432), que mostrou-se associado à EAEC patogênica. Os genes *aatP*, *aatC* e *aatA* codificam proteínas homólogas a permeases de membrana interna, proteína ligadora de cassete-ATP e proteína de membrana externa TolC respectivamente. A proteína AatA forma um canal de membrana externa (TolC) e pode agir diretamente como poro para translocação da proteína Aap (Nishi et al., 2003).

A indução e formação de biofilme, que ocorrem no segundo estágio da patogênese da EAEC, possuem potenciais genes/proteínas relacionados. Sugere-se que a formação de biofilme está relacionada com aumento da expressão de Ag43 (antígeno 43), que é uma proteína de

membrana externa autotransportada, envolvida na agregação bacteriana (Schembri et al., 2003). O gene *agn43* (também conhecido como *flu*), que codifica o Ag43, está localizado no cromossoma da *E. coli* K12, mas somente com uma cópia; em outros isolados pode apresentar mais cópias (Diderichsen, 1980; Roche et al., 2001; Beloin et al., 2008). Em cultura líquida, essa proteína pode levar a uma autoagregação e formação de película, seguido rapidamente de sedimentação, facilitando a adesão bactéria-bactéria e o desenvolvimento tridimensional do biofilme (Owen et al., 1996; Henderson et al., 1997; Haslam, et al., 1999; Kjaergaard et al., 2000; Schembri et al., 2003). O gene *agn43* foi descrito em EAEC, mas não foi associado à formação de biofilme nesse patótipo (Mendez-Arancibia et al., 2008). Entretanto, Chaudhuri et al. (2010) ao sequenciar o protótipo EAEC 042 mostrou que ele possui três alelos desse gene e que todos promovem a formação de biofilme e agregação célula-célula.

Sheikh et al. (2001) sugerem dois genes relacionados com a formação de biofilme: *fis* e *yafk*. O primeiro é um gene cromossômico que codifica uma proteína de 11,4 kDa, a qual liga-se ao DNA e está envolvida na regulação dependente da fase de crescimento. Sugere-se que Fis contribua para a formação de biofilme via biogênese de AAF/II, pela ativação da expressão de AggR (Sheikh et al., 2001; Morin et al., 2010). Já o gene *yafk* é descrito como necessário para a transcrição dos genes AAF/II embora codifique uma proteína de 28kDa sem um papel sugerido (Sheikh et al., 2001).

A proteína Shf, codificada pelo gene *shf*, não possui função conhecida, mas apresenta homologia (25% aminoácidos idênticos) com a proteína IcaB do *Staphylococcus epidermidis*, implicada na adesão intercelular (Heilmann et al., 1996). Especialmente na EAEC, a forte agregação no meio de cultura causa espontaneamente a fixação das células ao substrato e, conseqüentemente, contribui para a formação de biofilme denso. Estudo com o protótipo 042 e mutantes sugere que o gene *shf* não é relacionado com a agregação na fase líquida e na fase inicial de aderência, mas é necessário para formar múltiplas camadas no biofilme na fase de maturação, exercendo assim, papel crucial na capacidade de formação de biofilme (Fujiyama et al., 2008; Vasconcellos, 2009).

No terceiro estágio da patogênese da EAEC, na qual há produção de toxinas, indução de resposta inflamatória e dano da mucosa, três toxinas são mais estudadas: (i) EAST1 (enterotoxina termo estável de EAEC), (ii) Pet (toxina codificada por plasmídeo) e (iii) ShET1 (enterotoxina de *Shigella* 1) (Huang et al., 2006).

EAST1 é uma enterotoxina de baixo peso molecular, sensível à protease, parcialmente termo-estável, imunológica e geneticamente distinta da STa da ETEC (Savarino et al., 1991). Porém,

seu tamanho, estabilidade ao calor e mensageiros secundários são semelhantes aos da STa de ETEC (Savarino et al., 1991). EAST1 é codificada pelo gene *astA* presente no plasmídio da EAEC17-2 e EAEC 042 (Savarino, et al., 1993; Czeczulin, et al., 1999). GMPc atua como mediador intracelular após a ativação da enterotoxina via adenilato ciclase, o que induz alteração no transporte de íons com resposta secretória (Savarino et al., 1991; Savarino et al., 1993)

A toxina Pet, codificada pelo plasmídio do protótipo EAEC 042, é membro da classe de proteína autotransportadora. É caracterizada por possuir um domínio C-terminal conservado, que forma um poro β -barril na membrana externa, e a partir do qual a proteína madura é transportada (Eslava et al., 1998). Pet possui atividade citotóxica contra células epiteliais intestinais e eritrócitos por um mecanismo intracelular, o qual envolve provavelmente a degradação da espectrina, uma proteína de membrana (Navarro-Garcia, et al., 1998; Villaseca et al., 2000).

ShET1 é uma toxina codificada por genes cromossômicos inicialmente descritos em *Shigella flexneri* 2a. Dois genes, *setIA* e *setIB* são responsáveis por codificar a toxina ShET1 e encontram-se na fita complementar do gene *pic*, por isso apresentam a mesma prevalência e associação (Fasano et al., 1995; Henderson, et al., 1999). A patogênese dessa toxina não é bem estudada na EAEC, mas na *S. flexneri* 2a leva ao acúmulo significativo de líquidos em alça ligada de coelho quando o cultivo é realizado em meio pobre de ferro (Henderson, et al., 1999). Pic é uma proteína autotransportada com atividade de hemaglutinina e mucinolítica. Os fenótipos identificados para Pic sugerem que ele esteja envolvido nas fases iniciais da patogênese da EAEC, promovendo a colonização do intestino (Henderson, et al., 1999; Navarro-Garcia & Elias, 2011).

Além dos genes descritos anteriormente, uma série de outros potenciais genes de virulência tem sido propostos e/ou descritos em amostras de EAEC e dentre estes, os genes: *sen*, *sat*, *iucA*, *irp*, *chuA/shuA*, *hly*, *papC* e *sfa*.

O gene *sen* (ou ShET2) está presente no plasmídio *inv*, codifica uma enterotoxina de 63 kDa e sugere-se que faça parte da fase da patogênese de *Shigella* spp. e EIEC, levando à diarreia secretora (Nataro et al., 1995 (b); Vila et al., 2000).

A toxina Sat (*secreted autotransporte toxin*), codificada pelo gene *sat*, é uma serino-protease autotransportada de *Enterobacteriaceae* (SPATE), assim como Pet e Pic. Trata-se de uma proteína de alto peso molecular (107 kDa) com atividade citopática e proteolítica,

constituindo um fator de virulência em *E. coli* uropatogênica (UPEC) (Guyer et al., 2000). Os efeitos no citoesqueleto em células epiteliais urinárias são associadas à degradação de foldrina (α e β espectrina) o que pode explicar as observações de arredondamento, alongamento e descolamento das células (Maroncle et al., 2006). Inicialmente descrita em UPEC, já tem sido isolada em *Shigella* spp. e DEC, inclusive em EAEC (Guyer et al., 2000; Ruiz et al., 2002; Mendez-Aranciba et al., 2008). Boisen et al (2009) descreveu o gene da toxina Sat como a SPATE mais comum em amostras de EAEC, superando a frequência de *pet*.

A produção de sideróforos (queladores de ferro) e sistemas de transporte de heme são mecanismos utilizados pela EAEC para aquisição de ferro (Okeke et al., 2004). A aerobactina, um sideróforo, é sintetizada por genes encontrados ou em plasmídio ou como parte de uma ilha de patogenicidade (Moss et al., 1999; Vokes et al., 1999; Ratledge & Dover, 2000). O produto do gene *iucA* é uma sintetase envolvida na síntese de aerobactina e foi descrito em alta frequência em EAEC (Okeke, et al., 2004). Yersiniabactina é também um sideróforo, cujos genes, originalmente descrito em espécies de *Yersinia*, encontram-se em uma ilha de alta patogenicidade (Okeke et al., 2004). O gene *irp2*, encontrado no genoma da EAEC 042, localizado provavelmente no cromossoma, codifica uma proteína necessária para a biossíntese da yersiniabactina (Czeczulin et al., 1999). O sistema de transporte de heme Chu (Shu em *Shigella dysenteriae*), necessita do gene cromossômico *chuA*, que codifica uma proteína de 69 Kda com função de receptor de membrana externa para transporte do heme (Torres & Payne, 1997; Okeke, et al., 2004).

O gene *hlyA* é um gene cromossômico, presente em uma ilha de alta patogenicidade, codifica uma α hemolisina que leva à formação de uma zona clara de hemólise ao redor das colônias cultivadas em ágar sangue de carneiro (Guignot et al., 2000). Amplamente descrita como fator de virulência em UPEC, a citólise pela hemolisina forma poros aquosos na membrana celular (Bhakdi et al., 1989; Welch, 1991) e causa liberação de ferro dos eritrócitos, o que aumenta a resposta inflamatória e permite que a bactéria penetre no interstício renal (Moblely, et al., 1990; Johnson, 1991; Trifillis et al., 1994).

Adesinas (fímbria do tipo 1, fímbria P, fímbria S, adesinas Afa/Dr) estão relacionadas à colonização e/ou formação de biofilme em infecções do trato urinário, sendo portanto potenciais fatores de virulência (Ong et al., 2008). Os genes que codificam as adesinas fímbria P e S já foram detectados, em frequência baixa, em isolados de EAEC de crianças e adultos com diarreia (Piva et al., 2003).

A adesina fimbrial P é codificada pelo *operon pap* (Pili Associado à Pielonefrite), que tem sido encontrado no cromossomo de *E. coli* pielonefritogênica (Lund et al., 1988). O *cluster* de nove genes *papABCDEFGHI* codificam proteínas estruturais relacionadas à aderência (*papA*, *papE*, *papF* e *papG*), à terminação e implantação da fimbria na superfície celular (*papH*), à polimerização e transporte das subunidades fimbriais (respectivamente *papC* e *papD*) e na ativação transcricional do *operon* (*papB* e *papI*). A molécula com atividade de adesina dessa fimbria, que confere especificidade de ligações a digalactosídeos (Gal(α 1–4)Gal β), presentes na membrana glicolipídica de enterócitos e células uroepiteliais, é codificada pelo gene *papG* (Lund et al., 1988; Brito, et al., 2004).

As adesinas fimbriais S (Sfa), morfologicamente idênticas às fímbricas tipo 1 e P, são capazes de reconhecer receptores contendo ácido siálico em células eucarióticas (Korhonen et al., 1984). Considerada um potencial fator de virulência, normalmente são encontradas em cepas de *E. coli* que causam infecções do trato urinário ou meningite em recém-nascidos (Hacker et al., 1993) e ainda não descritas em EAEC.

A formação de biofilme e a distribuição desses e de outros genes de virulência não é homogênea entre amostras de EAEC, o que evidencia a heterogeneidade desse patótipo. Isso faz com que seja difícil fornecer uma definição genotípica para EAEC ou propor com exatidão todo o modelo de patogênese (Okeke & Nataro, 2001). Ainda, essa heterogeneidade da EAEC esclarece em parte a falha de alguns estudos em associar essas cepas com a doença e sugere que somente um determinado grupo de isolados de EAEC sejam patógenos humanos (Okeke & Nataro, 2001).

2.3.3. Epidemiologia

Desde a sua descoberta, numerosos estudos têm sido conduzidos para determinar a epidemiologia da EAEC nas infecções diarreicas (Harrington et al., 2006) e atualmente é considerada um patógeno emergente. Huang et al. (2006) conduziram uma meta-análise da EAEC como causa de diarreia aguda e verificaram estar associada à diarreia em diferentes subpopulações tanto de países em desenvolvimento como desenvolvidos.

Vários estudos epidemiológicos têm sido realizados em países em desenvolvimento e muitos deles identificam a EAEC como patógeno em crianças com diarreia, inclusive em regiões do Brasil (Kang et al., 1995; González et al., 1997; Kahali et al., 2004; Nguyen et al., 2005; Araujo et al., 2007; Moreno et al., 2010). Os poucos estudos desenvolvidos em países

industrializados tem demonstrado uma proporção maior de EAEC isolada de crianças com diarreia comparado com os controles (Pabst, et al., 2003; Nataro et al., 2006).

A diarreia persistente (>14 dias) é um problema emergente em países em desenvolvimento e suas causas não são totalmente entendidas. A EAEC já foi implicada como causa de diarreia persistente no nordeste brasileiro, Índia e Bangladesh, (Bhan et al., 1989; Fang et al., 1995; Bardhan et al., 1998). Estudos têm evidenciado também a participação da EAEC na gênese da diarreia persistente de pacientes infectados com HIV (Wanke et al., 1998; Gassama-Sow et al., 2004).

Surto descritos em países industrializados como também em regiões em desenvolvimento, mostram a participação da EAEC como patógeno (Pai et al., 1997; Itoh et al., 1997; Harada et al., 2007). Em 2011, um grande surto de síndrome urêmica hemolítica e colite hemorrágica, ocorrido na Alemanha, foi associado a isolados de *E. coli* com padrão AA em cultura de célula, perfil genético de EAEC (*aggA*, *aggR*, *pic* e *aap*) e com capacidade de produzir toxina de Shiga (*stx2*). Considerando essas características e o sequenciamento de isolados do surto, a cepa causadora do surto foi identificada como EAEC produtora da toxina de shiga/verotoxina. (Scheutz et al., 2011; Bielaszewska et al., 2011, Rohde et al., 2011).

Conhecida como causa da diarreia dos viajantes, EAEC é o segundo patógeno bacteriano, após ETEC, mais comumente isolado de viajantes adultos procedentes de países em desenvolvimento (Gascon et al., 1998; Adachi et al., 2001).

Apesar de estudos estarem associando a EAEC com a diarreia, em outros ela parece causar infecções subclínicas por colonização intestinal (Huang & DuPont, 2004). No Brasil, estudos caso/controle têm relatado a EAEC como um dos enteropatógenos mais isolados, entretanto não associado com a diarreia (Scaletsky et al. 2002; Bueris et al., 2007; Spano et al. 2008).

2.3.4. Diagnóstico

O padrão de aderência agregativo em cultura de célula HEp-2 ou HeLa diferencia a EAEC das outras *E. coli*, sendo o padrão ouro para identificar EAEC (Weintraub, 2007). Entretanto, essa técnica possui limitações como: (i) um grande número de colônias isoladas de uma amostra fecal para análise; (ii) laborioso; (iii) tempo para execução; (iv) necessidade de laboratório/profissional especializado. Na tentativa de propor um ensaio com menos limitações, aderência em células HEp-2 fixadas com formalina foi proposta por facilitar a

execução do ensaio e que, apesar da boa especificidade e sensibilidade, não tem sido utilizada (Miqdady et al., 2002).

Outros testes fenotípicos, como capacidade de formação de biofilme e formação de película, e testes genotípicos também foram desenvolvidos para caracterização deste patotipo e/ou de suas propriedades de virulência. Práticos, rápidos, com possibilidade de análise de um número maior de amostras, técnicas de biologia molecular como PCR e hibridização de colônias têm sido amplamente utilizadas no diagnóstico de EAEC.

Baudry et al (1990), propuseram um ensaio de hibridização com a sonda do plasmídeo da cepa EAEC17-2 - associada ao padrão agregativo - (pCVD432 ou sonda EAEC ou sonda pAA), cuja sensibilidade foi de 89% e especificidade de 99% comparado com o padrão ouro. Alguns estudos têm utilizado somente essa técnica de detecção de EAEC (Araujo et al., 2007; Spano et al., 2008) e outros têm mostrado baixa a sensibilidade e especificidade da sonda pCVD432 (Gioppo et al., 2000; Okeke et al., 2000; Diego M. Lozer, dados não publicados).

PCR para a mesma região do plasmídeo (pCVD432 – *aatA*), para o regulador transcricional *AggR*, PCR *multiplex* para os genes *aggA*, *aafA* e *astA* e para *aggR* e *astA* já foram propostos para detecção de EAEC (Schmidt et al., 1995; Tsai et al., 2002; Toma et al. 2003; Ruttler et al., 2006). Entretanto esses ensaios genotípicos tem como alvo genes plasmidiais, assim como o proposto por Baudry et al (1990), e dessa forma, assumem também que esses alvos correspondem a fatores de virulência conservados, e que, possivelmente, irão apresentar também sensibilidade variável (Baudry, et al., 1990; Huang & DuPont, 2004).

Como ensaios fenotípicos para identificar EAEC, foi descrito o teste formação de película como útil, simples, rápido e de baixo custo, esse ensaio é baseado na formação de halo visível na superfície de cultura bacteriana em caldo Müller-Hinton incubada com agitação (Albert, et. al., 1993; Iwanaga et al., 2002). Wakimoto et al. (2004) propuseram o ensaio de biofilme, baseado na aderência de isolados de EAEC em microplaca de poliestireno por 24 hs seguido por coloração com corante básico, solubilização e quantificação por densidade ótica, como *screening* de EAEC, acompanhado por teste de aderência em células HEP-2 ou HeLa (Wakimoto et al., 2004). Este ensaio foi posteriormente usado no *screening* de EAEC, visto que o biofilme é uma importante característica desse patotipo e pode estar relacionado à diarreia persistente ou a colonização de indivíduos saudáveis (Mohamed et al., 2007; Tokuda et al., 2010).

Nenhum dos testes desenvolvidos foi capaz de demonstrar 100% de correlação com o ensaio de aderência em célula HEp-2, sendo assim, esse ensaio continua sendo necessário para a classificação das EAEC (Flores & Okhuysen, 2009).

A necessidade de entender a heterogeneidade dos isolados de EAEC, que alguns estudos associam à diarreia e outros sugerem uma colonização ou infecção subclínica, têm impulsionado a busca de possíveis marcadores de virulência nos isolados de pacientes com diarreia. Muitos estudos apenas relatam e reafirmam a heterogeneidade genotípica e fenotípica da EAEC, outros, têm mostrado a existência de subpopulações de EAEC com determinados fatores de virulência associado a isolados de paciente com diarreia. Portanto, realizar pesquisas com isolados de pacientes com e sem diarreia pode auxiliar na caracterização da EAEC e contribuir no estabelecimento de marcadores de virulência.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Análise genotípica e fenotípica de amostras de *Escherichia coli* com aderência agregativa (EAEC) positivas e negativas para o plasmídeo de virulência pAA e amostras de *E. coli* com padrão *chain-like adhesion* (CLA), isoladas de crianças sintomáticas e assintomáticas residentes em periferia urbana e em comunidades quilombolas do Norte do Estado do Espírito Santo.

3.2. Objetivos Específicos

1. Verificar a presença de sequências genéticas que codificam adesinas, toxinas, sideróforos e outras proteínas envolvidas na patogênese de EAEC;
2. Analisar a associação entre os perfis genéticos com a origem das amostras (sintomáticas ou assintomáticas);
3. Avaliar a formação de biofilme em superfície abiótica;
4. Avaliar a formação de película na interface ar-líquido.
5. Analisar aspectos fenotípicos (formação de biofilme e película) com perfil genético;
6. Analisar a associação entre a formação de biofilme com a origem das amostras (sintomáticas ou assintomáticas);
7. Analisar a associação entre a formação de biofilme com a formação de película; e
8. Comparar aspectos genotípicos e fenotípicos de amostras de EAEC com amostras de *E. coli* com padrão CLA.

4. METODOLOGIA

4.1. Origem e características das amostras bacterianas

As amostras estudadas foram isoladas durante um estudo epidemiológico sobre diarreia em crianças menores de doze anos de idade com (sintomáticos) e sem (assintomáticos) diarreia aguda, residentes em comunidades quilombolas e na periferia dos municípios de São Mateus e de Conceição da Barra, no Norte do Espírito Santo, Brasil. Esse estudo epidemiológico compreendeu, originalmente, a análise de amostras de fezes de 142 crianças com diarreia (sintomáticas) e 428 crianças sem diarreia (assintomáticas) residentes em bairros da periferia e comunidades quilombolas no Norte do Espírito Santo, Brasil. As comunidades quilombolas são constituídas por descendentes de escravos fugidos na época da escravidão no Brasil, que vivem em áreas rurais semi-isoladas com baixo índice de saneamento (água potável, esgoto e coleta de lixo). Tanto as comunidades quilombolas como os bairros da periferia estudados possuem baixo nível socioeconômico. Os casos de diarreia foram considerados pela evacuação de três vezes ou mais de fezes líquidas ou pastosas por dia ou pela frequência maior do que o normal (WHO, 2012). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo em 20 de dezembro de 2006 (Anexo 1).

No referido estudo, em cada amostra de fezes foi pesquisada, através de métodos convencionais, a presença dos seguintes enteropatógenos: *Shigella* spp., *Salmonella* spp., rotavírus, adenovírus, astrovírus e norovírus (Diego M. Lozer, dados não publicados; Fernando Vicentini, dados não publicados). Além disto, de cada amostra de fezes semeada em ágar MacConkey foram selecionadas cinco colônias fermentadoras e duas não fermentadoras de lactose, típicas de *E. coli*. Em seguida, foram realizados testes bioquímicos para confirmação da espécie, e as amostras foram armazenadas em ágar nutriente inclinado a 4-8°C e em suspensão de sacarose 24% a -20°C. Todas as amostras de *E. coli* foram submetidas a testes de adesão a células HEp-2 de 3 horas para caracterizar o padrão de adesão e ensaios de PCR multiplex para identificação de EPEC, EAEC, ETEC, EIEC e STEC (Aranda et al., 2004). O patotipo DAEC foi pesquisado através do teste de hibridização de colônias com a sonda genética *daaC* (Bilge et al., 1989).

Dentre as 202 amostras de *E. coli* inseridas nesse estudo, 189 (54 sintomáticas e 135 assintomáticas) apresentaram amostras de *E. coli* com o padrão de adesão agregativa (AA), sendo que 81 dessas amostras foram positivas para o plasmídeo de virulência pAA. Outras 13

amostras de fezes (3 sintomáticas e 10 assintomáticas) apresentaram *E. coli* com o padrão CLA (*chain-like adhesion*). O número de isolados com estas características, em cada amostra de fezes, variou de um a três, mas para o presente estudo, somente um isolado de cada uma dessas 202 amostras de fezes foi selecionado e considerado como uma amostra bacteriana distinta (Fluxograma 1).

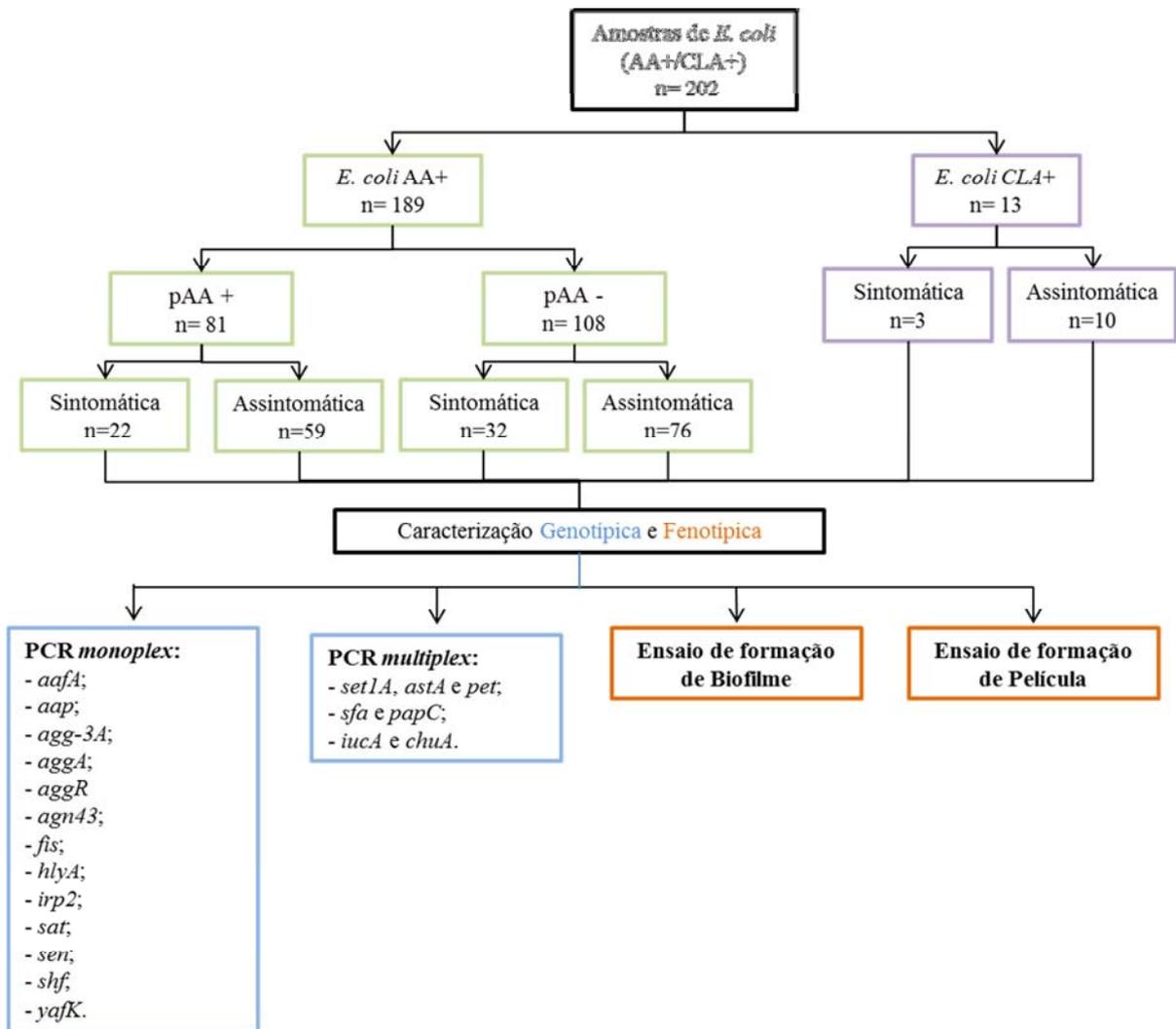
Amostras de *E. coli* utilizadas como controles positivos nos diversos experimentos estão contidas no Quadro 1. Exceto quando especificado, as amostras de *E. coli* HB101 e DH5 α foram utilizadas como controles negativos.

Quadro 1 – Relação das amostras de *E. coli* utilizadas como controles positivos nos diversos experimentos.

Controle positivo	Experimentos
<i>E. coli</i> 042	PCR: <i>aggR</i> , <i>aafA</i> , <i>aap</i> , <i>set1A</i> , <i>astA</i> , <i>pet</i> , <i>shf</i> , <i>agn43</i> , <i>fis</i> e <i>yafK</i> . Ensaio de biofilme e formação de película
<i>E. coli</i> 17-2	PCR: <i>aggA</i>
<i>E. coli</i> RN785-1	PCR: <i>irp2</i> e <i>agg3A</i>
<i>E. coli</i> EDL933	PCR: <i>chuA</i>
<i>S. flexneri</i> MA245-5	PCR: <i>iucA</i> e <i>sat</i>
<i>E. coli</i> J96	PCR: <i>sfa</i> e <i>papC</i>

4.2. Extração do DNA bacteriano

O DNA bacteriano foi obtido a partir de duas colônias suspensas em 100 μ L de água deionizada (Milli-Q[®] / Millipore) em tubos de polipropileno de 500 μ L (Axygen, USA), seguido de aquecimento em banho-maria (100°C) por 5 minutos. A suspensão foi então homogeneizada e centrifugada a 10.000 X g por 1 minuto. O sobrenadante foi mantido congelado a -20°C em alíquotas de 18 μ L e descongelado no momento do uso por no máximo quatro vezes.



Fluxograma 1 – Esquema do processamento das amostras

4.3. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A técnica de PCR foi empregada na pesquisa da presença de 20 potenciais genes de virulência em amostras de EAEC e de *E. coli* com padrão CLA. Os *primers* utilizados nas reações de PCR *monoplex* para a pesquisa de 13 dos 20 determinantes genéticos das amostras estudadas estão relacionados no Quadro 2. Protocolos de PCR *multiplex* foram realizados para a pesquisa dos genes (i) *set1A*, *astA* e *pet*, (ii) *sfa* e *papC* e (iii) *iucA* e *chuA* (Quadros 3, 4 e 5), e destes, o protocolo para a detecção dos genes das toxinas ShET1, EAST1 e Pet foi estabelecido no presente estudo por terem sido originalmente descritas com a mesma temperatura de hibridização (Huang et al., 2007).

A PCR foi realizada com um volume final de 25 μ L, contendo 1,5 mM de $MgCl_2$, 20 mM Tris-HCl-pH 8,4, 50 mM KCl, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 U de Platinum® Taq DNA

Polymerase, 2 μL de DNA bacteriano e 0,4 μM de cada primer, exceto no caso da PCR multiplex para detecção dos genes *set1A*, *astA* e *pet*, em que o conjunto de *primers astA* foi utilizado em concentração de 0,16 μM . Todos os reagentes utilizados na PCR foram obtidos da Invitrogen[®] (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Veriti[®] Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Após a amplificação, os produtos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose (Pronadisa) 1,5%, comparando ao padrão de peso molecular de 100 pb. Alíquotas de 10 μL dos produtos de PCR foram misturadas a 8 μL do tampão de amostra para DNA e 2 μL solução de arrasto (*Loading solution*) e aplicadas no gel. A corrida eletroforética foi realizada sob voltagem constante de 100 Volts em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X. Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (5 mg/mL) por 10 a 15 minutos e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta acoplado ao sistema de processamento de imagens MiniBispPro[™] (Bio América Inc.).

Quadro 2- Primers e condições usadas nos ensaios de PCR *monoplex*.

Gene	Descrição	Sequencia (5'→3')	Tamanho fragmento	Condições de amplificação	Referência
<i>aggA</i>	Subunidade fímbrial AAF/I	TTA GTC TTC TAT CTA GGG AAA TTA ATT CCG GCA TGG	450 pb	1x(95/5 min.), 30x(94°C/1 min.; 46°C/1 min.; 72°C/1 min.), 1x(72/7 min.)*	Czczulin et al., 1999
<i>aafA</i>	Subunidade fímbrial AAF/II	ATG TAT TTT TAG AGG TTG AC TAT TAT ATT GTC ACA AGC TC	518 pb	1x(95/5 min.), 30x(94°C/1 min.; 50°C/1 min.; 72°C/1 min.), 1x(72/7 min.)*	Czczulin et al., 1999
<i>agg-3A</i>	Subunidade fímbrial AAF/III	GTA TCA TTG CGA GTC TGG TAT TCA G GGG CTG TTA TAG AGT AAC TTC CAG	462 pb	1x(95/5 min.), 30x(94°C/1 min.; 65°C/1 min.; 72°C/1 min.), 1x(72/7 min.)*	Bernier et al., 2002
<i>aggR</i>	Regulador transcricional de AAF/I e AAF/II	CTA ATT GTA CAA TCG ATG TA ATG AAG TAA TTC TTG AAT	308 pb	1x(95/5 min.), 30x(94°C/1 min.; 42°C/1 min.; 72°C/1 min.), 1x(72/7 min.)	Czczulin et al., 1999
<i>aap</i>	Dispersina (proteína anti-agregação)	CTT TTC TGG CAT CTT GGG T GTA ACA ACC CCT TTG GAA GT	232 pb	1x(95/5 min.), 30x(94°C/1 min.; 52°C/1 min.; 72°C/1 min.), 1x(72/7 min.)	Czczulin et al., 1999
<i>shf</i>	ORF críptico	ACT TTC TCC CGA GAC ATT C CTT TAG CGG GAG CAT TCA T	613 pb	1x(95/5 min.), 30x(94°C/1 min.; 50°C/1 min.; 72°C/1 min.), 1x(72/7 min.)	Czczulin et al., 1999
<i>hlyA</i>	α -hemolisina	CTC ATT GGC CTC ACC GAA CGG GCT GGC AGC TGT GTC CAC GAG	299 pb	1x(95/5 min.), 35x(94°C/30 seg.; 57°C/30 seg.; 72°C/1 min.), 1x(72/7 min.)	Guignot et al., 2000
<i>irp2</i>	Yersiniabactina	AAG GAT TCG CTG TTA CCG GAC TCG TCG GGC AGC GTT TCT TCT	264 pb	1x(95/5 min.), 30x(94°C/1 min.; 55°C/1 min.; 72°C/1 min.), 1x(72/7 min.)	Czczulin et al., 1999
<i>yafk</i>	Proteína requerida para transcrição dos genes de AAF/II	ATT CTA GAA ACC GTT TTA TCA AG ATA AGC TTT GGC GCT TAT TTT GC	800 pb	1x(95/5 min.), 35x(94°C/1 min.; 52°C/45seg.; 72°C/1 min.), 1x(72/7 min.)*	Sheikh et al., 2001
<i>sen</i>	<i>Shigella</i> enterotoxina 2 (ShET-2)	ATG TGC CTG CTA TTA TTT AT CAT AAT AAT AAG CGG TCA GC	799 pb	1x(95/5 min.), 30x(94°C/1 min.; 55°C/1 min.; 72°C/1 min.), 1x(72/7 min.)	Vila et al., 2000
<i>agn43</i>	Antígeno 43 (Fator de autoagregação)	ACG CAC AAC CAT CAA TAA AA CCG CCT CCG ATA CTG AAT GC	600pb	1x(95/5 min.), 30x(94°C/1 min.; 55°C/1 min.; 72°C/1 min.), 1x(72/7 min.)	Mendez-Arancibia et al., 2008
<i>sat</i>	Toxina autotransportada	ACT GGC GGA CTC ATG CTG T AAC CCT GTA AGA AGA CTG AGC	387 pb	1x(95/5 min.), 30x(94°C/25seg.; 64°C/1 min.; 72°C/2,5 min.), 1x(72/7 min.)	Ruiz et al., 2002
<i>fis</i>	Proteína ligadora DNA	ATG CCG TAT TTT TTC AAT TTT TTA C ATG TTC GAA CAA CGC GTA AAT TCT	297pb	1x(94°C/10 min.), 25x(94°C/30 seg.; 58°C/40 seg.; 72°C/55 seg.), 1x(72°C/10 min.)	Sheikh et al., 2001

*Condições de amplificação com modificações realizadas neste estudo

Quadro 3- Primers e condições usadas nos ensaios de PCR multiplex para os genes *astA*, *pet* e *set1A*.

Gene	Descrição	Sequencia (5'→3')	Tamanho fragmento	Condições de amplificação	Referência
<i>astA</i>	Toxina termo estável de EAEC (EAST 1)	CCA TCA ACA CAG TAT ATC CGA GGT CGC GAG TGA CGG CTT TGT	111 pb	1x(95/5 min.), 30x(94°C/1 min.; 55°C/1 min.; 72°C/1 min.), 1x(72/7 min.)	Huang et al., 2007
<i>pet</i>	Toxina codificada pelo plasmídeo (serina protease)	GAC CAT GAC CTA TAC CGA CAG C CCG ATT TCT CAA ACT CAA GAC C	600 pb		
<i>set1A</i>	Mucinase/Enterotoxina 1 <i>Shigella</i> (ShET1)	TCA CGC TAC CAT CAA AGA TAT CCC CCT TTG GTG GTA	309 pb		

Quadro 4- Primers e condições usadas nos ensaios de PCR multiplex para os genes *papC* e *sfa*.

Gene	Descrição	Sequencia (5'→3')	Tamanho fragmento	Condições de amplificação	Referência
<i>papC</i>	Fímbria P	GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGCG ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A	328 pb	1x(95/5 min.), 30x(94°C/2 min.; 65°C/1 min.; 72°C/2 min.), 1x(72/7 min.)	Le Bouguenec et al., 1992
<i>sfa</i>	Fímbria S	CTC CGG AGA ACT GGG TGC ATC TTA C CGG AGG AGT AAT TAC AAA CCT GGCA	410 pb		

Quadro 5- Primers e condições usadas nos ensaios de PCR multiplex para os genes *iucA* e *chuA*.

Gene	Descrição	Sequencia (5'→3')	Tamanho fragmento	Condições de amplificação	Referência
<i>chuA</i>	Receptor heme	ATC TGC TGC GTC ATG TTC CT GTA GTG GTC ATA CCT TTG AGC	1.7 kb	1x(95/5 min.), 30x(94°C/30 seg.; 52°C/30 seg.; 72°C/1,5 min.), 1x(72/7 min.)	Okeke et al., 2004
<i>iucA</i>	Sintetase da síntese da aerobactina	AGT CTG CAT CTT AAC CTT CA CTC GTT ATG ATC GTT CAG AT	1.1 kb		

4.4. Ensaio de formação de biofilme em superfície abiótica

O ensaio para detecção e quantificação de biofilmes foi realizado em microplacas de poliestireno de 96 poços de acordo com o protocolo descrito por Sheikh et al. (2001), com algumas modificações. As amostras bacterianas foram semeadas em ágar MacConkey para obtenção de colônias isoladas. Em seguida, uma colônia bacteriana foi transferida para tubos contendo 2 mL de caldo Luria Bertani (LB). Após incubação a 37°C por 16-18 h sob agitação de 100 rpm, a suspensão bacteriana foi ajustada para $1,5 \times 10^8$ UFC/mL com auxílio de escala 0,5 de Mac Farland. Uma alíquota de 2 µL dessa suspensão foi inoculada em 200 µL de meio essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 0,4% de glicose em poços de microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato (TPP®). A seguir, as microplacas foram incubadas estaticamente a 37°C por 24 h. As células livres em suspensão foram removidas através de quatro lavagens com 200 µL de PBS 0,2 M pH 7,2 e o excesso de tampão, removido por inversão da microplaca sobre papel toalha. Os poços da microplaca foram secos à temperatura ambiente (TA) por cerca de 20 minutos. Para fixação, 200 µL de etanol 75% foi adicionado a cada poço por 10 minutos, o álcool foi descartado e a microplaca seca à TA, novamente.

As microplacas com as bactérias aderidas e a matriz do biofilme foram coradas com safranina e com cristal violeta. Para coloração com safranina, foi adicionado a cada poço 200 µL do corante catiônico a 0,1% por 15 minutos, o corante foi descartado e os poços lavados quatro vezes com água destilada por imersão. O excesso de água foi removido pela inversão da microplaca sobre papel toalha. A microplaca foi seca à TA por cerca de uma hora, o corante solubilizado pela adição de 100 µL de etanol a 97% em éter (v/v) e o volume completado com 100 µL de PBS 0,2 M pH7,2. A formação de biofilme foi então detectada pela densidade óptica (DO) em leitor de ELISA Thermoplate TP-READER® no comprimento de onda de 490 nm.

Para coloração com cristal violeta, realizada em paralelo com coloração com safranina, 200 µL do corante a 0,5% foi adicionado em cada poço e incubado por 5 minutos. O corante foi descartado e a lavagem realizada como descrito anteriormente. Após a secagem à TA, o corante foi solubilizado com 200 µL de etanol 95% por dois minutos e 150 µL de cada poço foi transferido para uma nova microplaca e a DO determinada em leitor de microplacas UVM 340 (Asys, Biochrom Ltd) no comprimento de onda de 570 nm.

O ensaio com o corante safranina foi realizado em triplicata, repetido pelo menos duas vezes e o ensaio com corante cristal violeta foi realizado em triplicata pelo menos uma vez. Todos os ensaios foram acompanhados por um controle positivo (EAEC 042) e dois controles negativos (*E. coli* HB101 e DH5 α).

A média dos valores da DO de cada amostra bacteriana foi calculada, sendo desconsiderados valores que divergiam em 20% da média das duas DO mais próximas. A classificação da amostra bacteriana em “formadora” e “não formadora” de biofilme foi realizada considerando-se a média (\bar{x}) e o desvio padrão (DP) dos controles negativos testados. Amostras bacterianas apresentando uma DO superior à média e mais três vezes a DO dos controles negativos foram consideradas “formadoras” de biofilme, conforme descrito por Stepanovic et al. (2007). As amostras foram consideradas fortes formadoras de biofilme se a DO foi superior a duas vezes a média da DO dos controles negativos mais três vezes o DP dos controles negativos ($>2\bar{x}DO_{CN}+3DP_{CN}$) e fraca, se $<2\bar{x}DO_{CN}+3DP_{CN}$ (Stepanovic et al., 2007).

4.5. Ensaio de formação de película

O ensaio de formação de película na interface ar-líquido foi realizado segundo metodologia descrita por Albert et al. (1993). As amostras bacterianas foram semeadas em ágar MacConkey a 37°C por 16-18 horas para obtenção de colônias isoladas. A seguir, cinco colônias bacterianas foram transferidas para tubos contendo 5 mL de caldo Mueller Hinton (Difco). Após incubação a 37°C por 20 h sob agitação constante de 100 rpm, foi realizada a leitura da formação de uma película na interface ar-líquido. O ensaio foi realizado em duplicata e repetido se os resultados divergissem entre os tubos. A formação de película foi observada visualmente por dois observadores independentes e o *score* (0, 1+, 2+, 3+) foi registrado de acordo com a espessura da película formada.

4.6. Análise estatística

Os dados obtidos foram armazenados no programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 17.0. A análise estatística foi realizada usando o teste de probabilidade exato de Fisher e Qui quadrado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes (intervalo de confiança de 95%).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização genotípica de virulência das amostras de EAEC pAA+ e pAA-

5.1.1. Presença de sequências genéticas associadas à virulência de EAEC e distribuição em EAEC pAA+ e pAA-

O resultado da pesquisa de genes de virulência das 189 amostras de EAEC está apresentado na Tabela 2. Os fragmentos de DNA obtidos nos ensaios de PCR *multiplex* que foi estabelecido no presente estudo para detecção simultânea dos genes *set1A*, *astA* e *pet* pode ser observado na Figura 5.

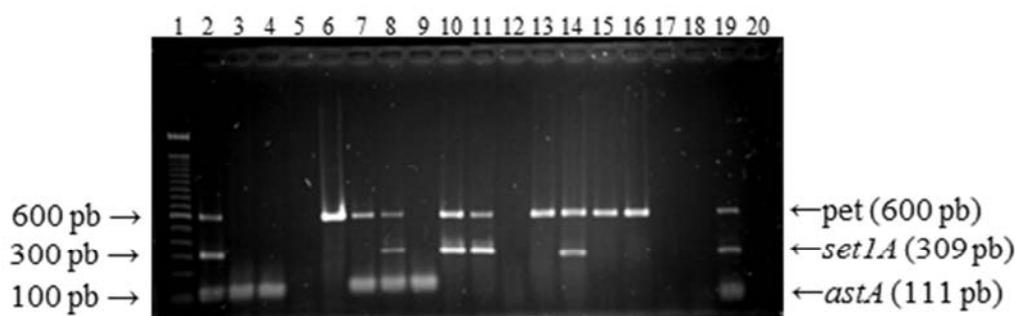


Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio de produtos de PCR multiplex para os genes *pet* (600pb), *set1A* (309pb) e *astA* (110pb). Col. 1- Padrão de peso molecular 100 pb; Col. 2 e 8 - Amostras *pet+*, *set1A+* e *astA+*; Col. 3, 4 e 9- Amostras *astA+*; Col. 5, 12, 17 e 18 - Amostras negativas; Col. 6, 13, 15 e 16 - Amostras *pet+*; Col.7 - Amostra *astA+* e *pet+*; Col.10, 11 e 14 - Amostras *set1A+* e *pet+*; Col. 19 e 20 - Controle positivo e negativo, respectivamente.

Os genes pesquisados foram encontrados em diferentes frequências e sendo então classificados como: (i) altíssima frequência (>80% das amostras), como os genes *fis* e *yafK*; (ii) alta frequência (30-50% das amostras), como os genes *irp2*, *pet*, *agn43* e *iucA*; (iii) moderada frequência (20-30%) como *astA* e *shf*; (iv) baixa frequência (10-20%), como os genes *aap*, *aggR*, *sat*, *set1A* e *chuA* e; (v) baixíssima frequência (<10%) como *aafA*, *aggA*, *agg3A*, *hlyA*, *papC* e *sen* detectados entre 1-8 amostras de EAEC (Tabela 2). O intervalo de 50-80% não entrou na classificação, pois nenhum dos genes testados foi encontrado nestas frequências. O gene *sfa* não foi encontrado em nenhuma das amostras de EAEC. O gene *agn43* foi o único que apresentou uma frequência significativamente maior nas amostras de crianças sintomáticas do que assintomáticas ($P= 0,0236$).

A Tabela 3 apresenta os perfis genéticos das 189 amostras de EAEC estudadas, onde pode se observar as diferentes combinações de sequências genéticas de adesinas, toxinas, sideróforos e outras proteínas apresentadas por essas amostras.

Das 189 amostras de EAEC foram obtidas 89 combinações com até 12 dos 20 genes pesquisados. A maioria das amostras (66,1%) era portadora de quatro ou mais dos genes pesquisados e 63,0% e 20,4% das amostras pAA+ e pAA-, respectivamente, possuíam seis genes ou mais (Tabela 3).

Tabela 2 – Presença dos genes de virulência entre amostras de EAEC pAA+ e pAA- de crianças com ou sem diarreia residentes em comunidades quilombolas e da periferia do norte do Espírito Santo.

Genes de Virulência	pAA+	pAA-	Total
	N=81 n (%)	N=108 n (%)	N=189 n (%)
<i>aggA</i>	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>aafA</i>	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>agg-3A</i>	2 (2,5)	1 (0,9)	3 (1,6)
<i>aggR</i>	27 (33,3)	4 (3,7)	31 (16,4)
<i>aap</i>	25 (30,9)	6 (5,6)	31 (16,4)
<i>astA</i>	29 (35,8)	15 (13,9)	44 (23,3)
<i>pet</i>	40 (49,4)	38 (35,2)	78 (41,3)
<i>set1A</i>	23 (28,4)	5 (4,6)	28 (14,8)
<i>shf</i>	24 (29,6)	19 (17,6)	43 (22,8)
<i>hlyA</i>	2 (2,5)	6 (5,6)	8 (4,2)
<i>irp2</i>	48 (59,3)	42 (38,9)	90 (47,6)
<i>yafK</i>	70 (86,4)	95 (88)	165 (87,3)
<i>iucA</i>	38 (46,9)	35 (32,4)	73 (38,6)
<i>chuA</i>	8 (9,9)	23 (21,3)	31 (16,4)
<i>sen</i>	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>agn43</i>	40 (49,4)	34 (31,5)	74 (39,2)
<i>papC</i>	1 (1,2)	4 (3,7)	5 (2,6)
<i>sfa</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>sat</i>	13 (16)	12 (11,1)	25 (13,2)
<i>fis</i>	81 (100)	107 (99,1)	188 (99,5)

Tabela 3 – Perfil genético das amostras de EAEC pAA+ e pAA- de crianças com ou sem diarreia residentes em comunidades quilombolas e da periferia do norte do Espírito Santo..

Combinações de genes	Nº de amostra	pAA+	pAA-	Total
		N=81 n (%)	N=108 n (%)	N=189 n (%)
<i>fis</i>	1	1 (1,2)	3 (2,7)	4 (2,1)
<i>pet</i>	1	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>aggR fis</i>	2	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>fis astA</i>	2	1 (1,2)	1 (0,9)	2 (1,1)
<i>fis pet</i>	2	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>fis yafK</i>	2	5 (6,2)	28 (25,9)	33 (17,5)
<i>fis agn43 irp2</i>	3	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>fis yafK agn43</i>	3	1 (1,2)	3 (2,8)	4 (2,1)
<i>fis yafK astA</i>	3	0 (0)	2 (1,9)	2 (1,1)
<i>fis yafK chuA+</i>	3	0 (0)	2 (1,9)	2 (1,1)
<i>fis yafK irp2</i>	3	2 (2,5)	3 (2,8)	5 (2,6)
<i>fis yafK iucA</i>	3	2 (2,5)	0 (0)	2 (1,1)
<i>fis yafK pet</i>	3	1 (1,2)	2 (1,9)	3 (1,6)
<i>shf fis astA</i>	3	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>shf fis yafK</i>	3	1 (1,2)	1 (0,9)	2 (1,1)
<i>fis pet agn43 irp2</i>	4	2 (2,5)	1 (0,9)	3 (1,6)
<i>fis pet irp2 iucA</i>	4	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>fis pet iucA chuA</i>	4	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>fis yafK aap astA</i>	4	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>fis yafK agn43 irp2</i>	4	6 (7,4)	6 (5,6)	12 (6,3)
<i>fis yafK astA agn43</i>	4	1 (1,2)	1 (0,9)	2 (1,1)
<i>fis yafK astA irp2</i>	4	2 (2,5)	2 (1,9)	4 (2,1)
<i>fis yafK astA iucA</i>	4	3 (3,7)	0 (0)	3 (1,6)
<i>fis yafK irp2 iucA</i>	4	3 (3,7)	0 (0)	3 (1,6)
<i>fis yafK pet iucA</i>	4	0 (0)	7 (6,5)	7 (3,7)
<i>shf fis yafK agn43</i>	4	2 (2,5)	0 (0)	2 (1,1)
<i>shf fis yafK astA</i>	4	0 (0)	2 (1,9)	2 (1,1)
<i>shf fis yafK irp2</i>	4	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>fis agg-3A aap irp2 chuA</i>	5	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>fis pet agn43 sat iucA</i>	5	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>fis yafK aap agn43 chuA</i>	5	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>fis yafK aap astA chuA</i>	5	1 (1,7)	0 (0)	1 (0,5)
<i>fis yafK aap pet chuA</i>	5	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>fis yafK agn43 irp2 chuA</i>	5	0 (0)	2 (1,9)	2 (1,1)
<i>fis yafK agn43 irp2 iucA</i>	5	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>fis yafK astA agn43 irp2</i>	5	3 (3,7)	1 (0,9)	4 (2,1)
<i>fis yafK astA irp2 iucA</i>	5	2 (2,5)	0 (0)	2 (1,1)
<i>fis yafK pet agn43 irp2</i>	5	2 (2,5)	1 (0,9)	3 (1,6)
<i>fis yafK pet agn43 iucA</i>	5	1 (1,2)	1 (0)	2 (1,1)
<i>fis yafK pet irp2 iucA</i>	5	0 (0)	1 (9)	1 (0,5)
<i>fis yafK pet iucA chuA</i>	5	1 (1,2)	2 (1,9)	3 (1,6)

Combinações de genes	Nº de	pAA+	pAA-	Total
	genes/ amostra	N=81 n (%)	N=108 n (%)	N=189 n (%)
<i>shf fis yafK agn43 irp2</i>	5	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>shf fis yafK irp2 iucA</i>	5	0 (0)	3 (2,8)	3 (1,6)
<i>shf fis yafK pet iucA</i>	5	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>aggR shf fis yafK aap pet</i>	6	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>fis pet agn43 irp2 sat iucA</i>	6	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>fis yafK aap astA agn43 chuA</i>	6	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>fis yafK aap astA pet chuA</i>	6	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>fis yafK pet agn43 irp2 iucA</i>	6	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>fis yafK pet irp2 iucA chuA</i>	6	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>fis yafK pet irp2 sat chuA</i>	6	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>shf fis yafK pet irp2 iucA</i>	6	2 (2,5)	1 (0,9)	3 (1,6)
<i>aggR fis set1A pet agn43 irp2 iucA</i>	7	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>aggR fis yafK aap astA pet iucA</i>	7	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>fis yafK pet agn43 irp2 sat iucA</i>	7	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>fis yafK pet irp2 sat iucA chuA</i>	7	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>fis yafK set1A pet agn43 irp2 chuA</i>	7	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>fis yafK set1A pet agn43 irp2 sat</i>	7	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>shf fis yafK agn43 irp2 sat iucA</i>	7	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>shf fis yafK agn43 irp2 iucA chuA</i>	7	0 (0)	2 (1,9)	2 (1,1)
<i>shf fis yafK pet irp2 iucA chuA</i>	7	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>aggR fis set1A pet agn43 irp2 sat iucA</i>	8	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>aggR shf fis aap set1A astA agn43 irp2</i>	8	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>aggR shf fis yafK aap astA pet iucA</i>	8	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>aggR shf fis yafK aap pet agn43 iucA</i>	8	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>aggR shf fis yafK aap set1A pet chuA</i>	8	3 (3,7)	0 (0)	3 (1,6)
<i>fis yafK pet agn43 irp2 sat iucA chuA</i>	8	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>shf fis yafK pet irp2 sat iucA chuA</i>	8	1 (1,2)	1 (0,9)	2 (1,1)
<i>aggR fis yafK astA pet agn43 irp2 sat iucA</i>	9	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>aggR shf fis aap set1A pet agn43 irp2 iucA</i>	9	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>aggR shf fis agg-3A aap set1A astA irp2 iucA</i>	9	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>aggR shf fis yafK aap set1A pet irp2 iucA</i>	9	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>aggR shf fis yafK aap set1A pet sat iucA</i>	9	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>fis yafK pet agn43 irp2 sat iucA chuA papC</i>	9	0 (0)	2 (1,9)	2 (1,1)
<i>shf fis yafK set1A astA pet agn43 sat iucA</i>	9	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>shf fis yafK set1A pet agn43 irp2 iucA sen</i>	9	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>aggR fis yafK aap set1A astA pet agn43 irp2 iucA</i>	10	2 (2,5)	0 (0)	2 (1,1)
<i>aggR fis yafK aap set1A pet agn43 irp2 sat iucA</i>	10	1 (2,5)	0 (0)	1 (0,5)
<i>aggR fis yafK aggA aap set1A astA pet agn43 irp2</i>	10	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>aggR fis yafK set1A astA pet agn43 irp2 sat iucA</i>	10	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>aggR shf fis yafK aap set1A astA pet agn43 irp2</i>	10	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>aggR shf fis yafK aap set1A astA pet irp2 iucA</i>	10	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>aggR shf fis yafK agg-3A aap set1A astA pet agn43</i>	10	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>aggR shf fis yafK set1A pet agn43 irp2 sat iucA</i>	10	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)

Combinações de genes	Nº de genes/ amostra	pAA+	pAA-	Total
		N=81	N=108	N=189
		n (%)	n (%)	n (%)
<i>shf fis yafK pet agn43 irp2 sat iucA chuA papC</i>	10	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>aggR fis yafK aap set1A astA pet agn43 irp2 sat iucA</i>	11	2 (2,5)	0 (0)	2 (1,1)
<i>aggR shf fis yafK aap set1A astA pet agn43 iucA papC</i>	11	1 (1,2)	0 (0)	1 (0,5)
<i>aggR shf fis yafK pet agn43 irp2 sat iucA chuA papC</i>	11	0 (0)	1 (0,9)	1 (0,5)
<i>aggR shf fis yafK aap set1A astA pet agn43 irp2 sat iucA</i>	12	1 (1,2)	1 (0,9)	2 (1,1)

4.1.2. Distribuição dos genes de virulência entre amostras de EAEC pAA+ e pAA- isoladas de crianças sintomáticas e assintomáticas

No grupo das EAEC pAA+, os genes *aap*, *aggR*, *pet*, *astA*, *set1A*, *irp2*, *iucA* e *agn43* foram encontrados mais frequentemente do que nas amostras de EAEC pAA- ($p < 0,05$) (Tabela 2). A distribuição dos genes de virulência entre amostras de EAEC pAA+ e pAA- isoladas de crianças sintomáticas e assintomática está apresentada na Tabela 4. Entretanto não houve diferença estatística de nenhum dos genes nas amostras de EAEC pAA+ isoladas de crianças sintomáticas e assintomáticas. No grupo das EAEC pAA-, *chuA* apresentou uma frequência significativamente maior nos sintomáticos do que nos assintomáticos ($P = 0,0076$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição dos genes de virulência entre as amostras de EAEC pAA+ e pAA- isoladas de crianças sintomática e assintomática residentes em comunidades quilombolas e da periferia do norte do Espírito Santo.

Genes de virulência	pAA+		pAA-	
	Sintomática	Assintomática	Sintomática	Assintomática
	N=22 n (%)	N=59 n (%)	N=32 n (%)	N=76 n (%)
<i>aggA</i>	0 (0)	1 (1,7)	0 (0)	0 (0)
<i>aafA</i>	0 (0)	1 (1,7)	0 (0)	0 (0)
<i>agg-3A</i>	1 (4,5)	1 (1,7)	0 (0)	1 (1,3)
<i>aggR</i>	7 (31,8)	20 (33,9)	1 (3,1)	3 (3,9)
<i>aap</i>	7 (31,8)	18 (30,5)	4 (12,5)	2 (2,6)
<i>astA</i>	8 (36,4)	21 (35,6)	7 (21,9)	8 (10,5)
<i>pet</i>	11 (50)	29 (49,2)	11 (34,4)	27 (35,5)
<i>set1A</i>	7 (31,8)	16 (27,1)	2 (6,3)	3 (3,9)
<i>shf</i>	6 (27,3)	18 (30,5)	6 (18,8)	13 (17,1)
<i>hlyA</i>	0 (0)	2 (3,4)	2 (6,3)	4 (5,3)
<i>irp2</i>	13 (59,1)	35 (59,3)	13 (40,6)	29 (38,2)
<i>yafK</i>	18 (81,8)	52 (88,1)	31 (96,9)	64 (84,2)
<i>iucA</i>	8 (36,4)	30 (50,8)	10 (31,3)	25 (32,9)
<i>chuA</i>	1 (4,5)	7 (11,9)	12 (37,5)*	11 (14,5)
<i>sen</i>	0 (0)	0 (0)	1 (3,1)	0 (0)
<i>agn43</i>	14 (63,6)	26 (44,1)	14 (43,8)	20 (26,3)
<i>papC</i>	0 (0)	1 (1,7)	3 (9,4)	1 (1,3)
<i>sfa</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>sat</i>	3 (13,6)	10 (16,9)	6 (18,8)	6 (7,9)
<i>fis</i>	22 (100)	59 (100)	32 (100)	75 (98,7)

* $p < 0,05$

5.1.2. Distribuição dos genes de virulência entre amostras de EAEC típicas e atípicas isoladas de crianças sintomáticas e assintomáticas

As amostras de EAEC típicas, apresentando o regulador transcricional AggR foram encontradas associadas estatisticamente aos genes *shf*, *aap*, *set1A*, *astA*, *pet*, *agn43*, *irp2*, *sat* e *iucA* quando comparas as EAEC atípicas ($p < 0,05$) (dados não mostrados).

A Tabela 5 apresenta a distribuição dos genes pesquisados entre amostras de EAEC típica e atípica isoladas de crianças sintomáticas e assintomáticas. No grupo das EAEC típicas, nenhum gene foi associado à diarreia ($p > 0,05$), enquanto no grupo das EAEC atípicas, os genes *aap* e *agn43* ocorreram em frequência significativamente maior nas amostras de crianças sintomáticas do que nas assintomáticas ($p < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5 – Distribuição dos genes de virulência entre as amostras de EAEC típicas e EAEC atípicas isoladas de crianças sintomáticas e assintomática residentes em comunidades quilombolas e da periferia do norte do Espírito Santo.

Genes de virulência	EAEC típicas			EAEC atípicas		
	Sintomática	Assintomática	P	Sintomática	Assintomática	P
	N=8 n (%)	N=23 n (%)		N= 46 n (%)	N=112 n (%)	
<i>aggA</i>	0 (0)	1 (4,3)	>0,05	0 (0)	0 (0)	ND
<i>aafA</i>	0 (0)	0 (0)	ND	0 (0)	0 (0)	ND
<i>agg-3A</i>	1 (12,5)	1 (4,3)	>0,05	0 (0)	1 (0,9)	>0,05
<i>aap</i>	6 (75)	18 (78,3)	>0,05	5 (10,9)	2 (1,8)	0,0226
<i>aatA*</i>	7 (87,5)	17 (73,9)	>0,05	10 (21,7)	32 (28,6)	>0,05
<i>astA</i>	3 (37,5)	14 (60,9)	>0,05	12 (26,1)	15 (13,4)	>0,05
<i>pet</i>	8 (100)	20 (87)	>0,05	14 (30,4)	36 (32,1)	>0,05
<i>set1A</i>	7 (87,5)	17 (73,9)	>0,05	2 (4,3)	2 (1,8)	>0,05
<i>shf</i>	5 (62,5)	14 (60,9)	>0,05	7 (15,2)	18 (16,1)	>0,05
<i>hlyA</i>	1 (12,5)	2 (8,7)	>0,05	1 (2,2)	4 (3,6)	>0,05
<i>irp2</i>	6 (75)	14 (60,9)	>0,05	20 (43,5)	50 (44,6)	>0,05
<i>yafK</i>	6 (75)	19 (82,6)	>0,05	43 (93,5)	97 (86,6)	>0,05
<i>iucA</i>	7 (87,5)	15 (65,2)	>0,05	11 (23,9)	40 (35,7)	>0,05
<i>chuA</i>	1 (12,5)	3 (13)	>0,05	12 (26,1)	15 (13,4)	>0,05
<i>sen</i>	0 (0)	0 (0)	ND	1 (2,2)	0 (0)	>0,05
<i>agn43</i>	6 (75)	14 (60,9)	>0,05	22 (47,8)	32 (28,6)	0,0204
<i>papC</i>	1 (12,5)	1 (4,3)	>0,05	2 (4,3)	1 (0,9)	>0,05
<i>sfa</i>	0 (0)	0 (0)	ND	0 (0)	0 (0)	ND
<i>sat</i>	4 (50)	7 (30,4)	>0,05	5 (10,9)	9 (8)	>0,05
<i>fis</i>	8 (100)	23 (100)	ND	46 (100)	111 (99,1)	>0,05

*Realizado em estudo prévio (Diego M. Lozer, dados não publicados)

ND: Não Determinado

5.2. Caracterização fenotípica de virulência das amostras de EAEC pAA+ e pAA-

5.2.1 Análise qualitativa e quantitativa da formação de biofilme

O ensaio de biofilme em superfície abiótica foi realizado em microplacas de poliestireno utilizando os corantes safranina e cristal violeta (Figura 6).

As médias das DO e DP dos controles negativos (HB101 e DH5 α) e positivo (EAEC 042) encontrados nos ensaios com a safranina foram 0,131(\pm 0,009) e 0,588(\pm 0,034), respectivamente; e nos ensaios com o cristal violeta foram 0,171(\pm 0,010) e 0,632(\pm 0,044), respectivamente.

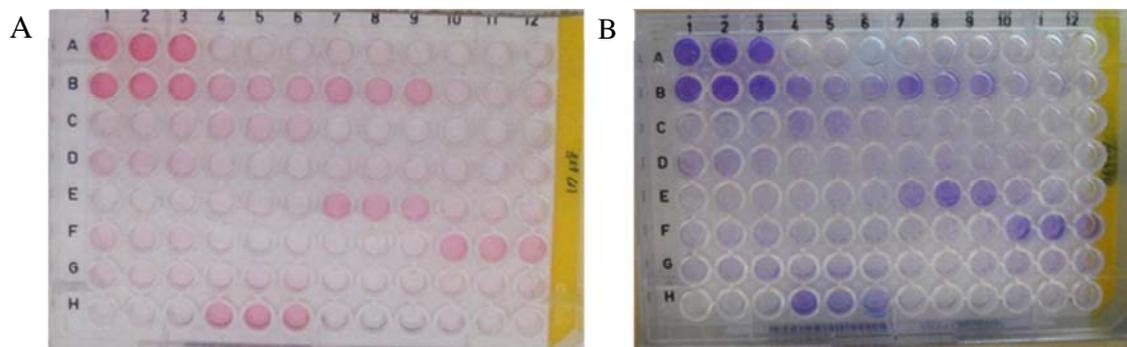
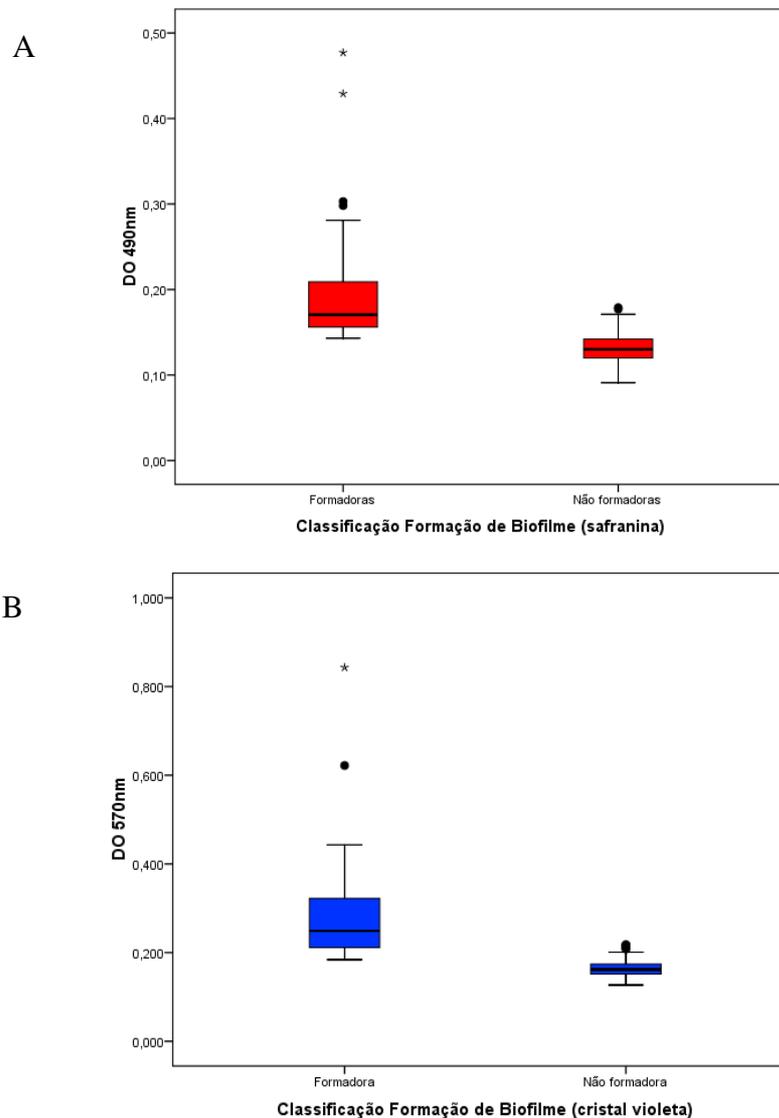


Figura 6 – Ensaio de capacidade de formação de biofilme de EAEC em placas de poliestireno após a solubilização do corante safranina (A) e cristal violeta (B), das mesmas amostras. A intensidade da coloração está relacionada à capacidade de formação de biofilme.

Utilizando o critério de $\bar{x}DO_{CN}+3DP_{CN}$, respectivamente, 24,9% (47/189) e 30,7% (58/189) das amostras foram consideradas formadoras de biofilme utilizando os corantes cristal violeta e safranina. As médias das DO e DP das amostras formadoras e não formadoras de biofilme foram respectivamente 0,263 (\pm 0,131) e 0,129 (\pm 0,017) quando usado o corante safranina e 0,328 (\pm 0,139) e 0,164 (\pm 0,019) quando usado o cristal violeta (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Box-plot das densidades ópticas das amostras de EAEC formadoras e não formadoras de biofilme utilizando o corante safranina (A) e cristal violeta (B).



Os Gráficos 2 e 3 apresentam a distribuição das DO obtidas nas amostras EAEC pAA+ e pAA- respectivamente quando utilizado os corantes safranina e cristal violeta. As EAEC formadoras de biofilme classificadas tanto pela safranina como pelo cristal violeta estão distribuídas de forma semelhante entre os isolados de crianças com e sem diarreia ($p > 0,05$) (dado não mostrado). Para as próximas análises de capacidade de formação de biofilme foram considerados os resultados obtidos com o corante safranina.

Entre as amostras de EAEC pAA+, 37,0% (30/81) delas foram classificadas como formadoras de biofilme e nas amostras de EAEC pAA-, foram consideradas formadoras de biofilme 25,9% (28/108).

Das 58 amostras formadoras de biofilme por safranina, 25,9% (15/58) foram classificadas como fortes e 74,1% (43/58) como fracas formadoras. Nos grupos pAA+ e pAA- foram forte formadoras de biofilme 36,7% e 14,3% respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6 – Classificação das EAEC (pAA+ e pAA-) formadoras de biofilme em fracas e fortes formadoras.

Classificação de formadora	pAA+ N=30	pAA- N=28	Total N=58
	n (%)	n (%)	n (%)
Fraca formadora	19 (63,3)	24 (85,7)	43 (74,1)
Forte formadora	11 (36,7)	4 (14,3)	15 (25,9)

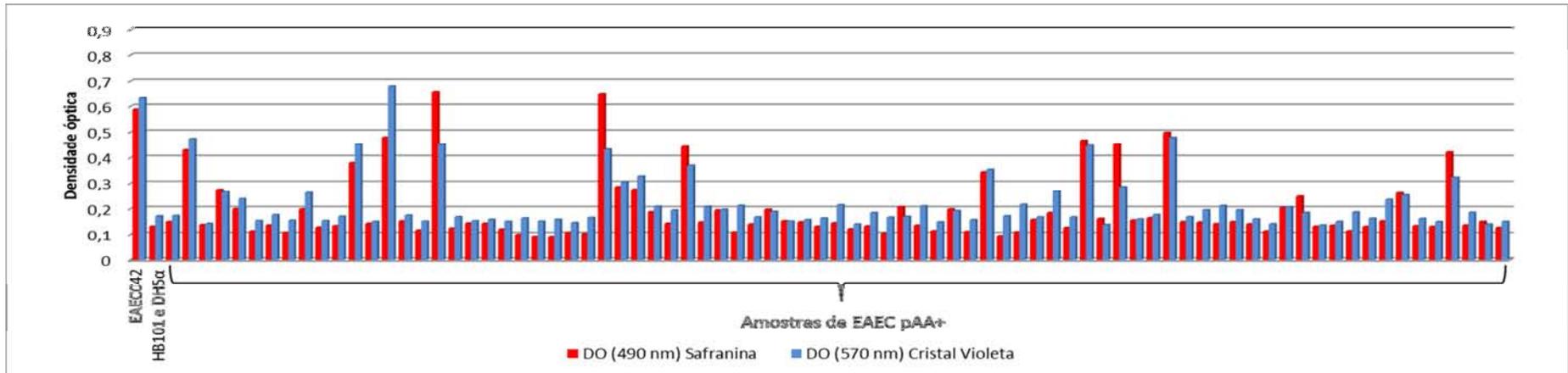


Gráfico 2 – Representação das médias das densidades ópticas em comprimento de onda de 490nm e 570 nm dos corantes safranina e cristal violeta, respectivamente, correspondente aos ensaios de formação de biofilme do controle positivo (EAEC 042), controles negativos (HB101 e DH5 α) e das amostras de EAEC pAA +.

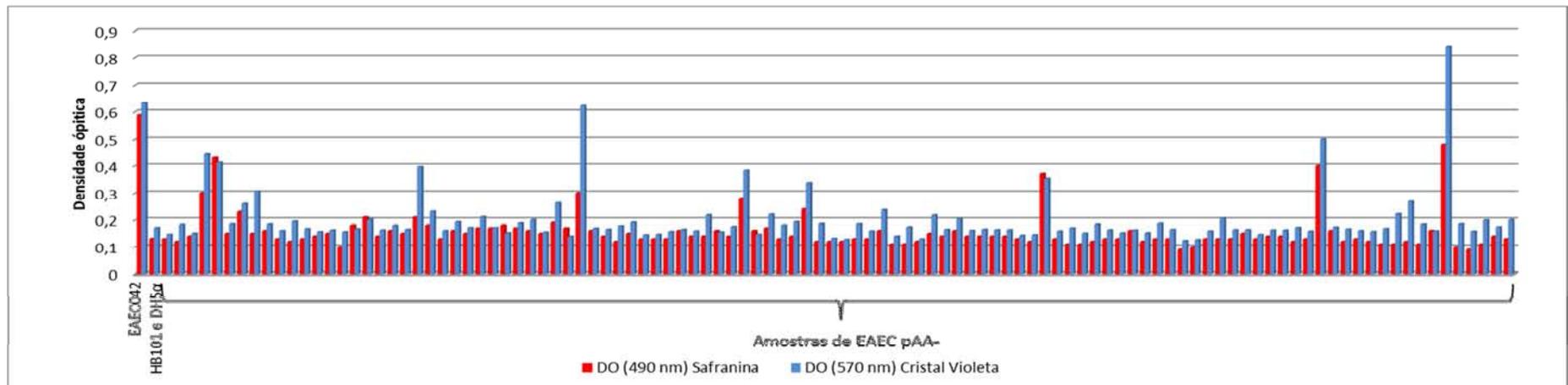


Gráfico 3 – Representação das médias das densidades ópticas em comprimento de onda de 490nm e 570 nm dos corantes safranina e cristal violeta, respectivamente, correspondente aos ensaios de formação de biofilme do controle positivo (EAEC 042), controles negativos (HB101 e DH5 α) e das amostras de EAEC pAA -.

Os genes *aggR*, *aap*, *shf*, *agg-3A*, *astA*, *set1A* e *sat* foram associados às amostras de EAEC formadoras de biofilme. Entre as amostras de EAEC pAA+ formadoras de biofilme os genes *aggR*, *shf*, *aap*, *set1A* e *astA* foram associados à esse fenótipo enquanto nas pAA- foram associados os genes *set1A* e *astA* ($p < 0,05$) (Tabela 7).

Tanto nas amostras fortes quanto nas fracas formadoras de biofilme o número máximo de genes encontrados foi de 12 e dentre estas, 86,6% (13/15) e 11,6% (5/43) possuem pelo menos nove dos 12 genes encontrados, respectivamente. Considerando-se apenas os genes que estão relacionados com a formação de biofilme (*aggR*, *aggA*, *aafA*, *agg-3A*, *shf*, *aap* e *agn43*), 80% (12/15) das amostras forte formadoras e 14% (6/43) das fracas formadoras possuíam pelo menos três desses genes.

Tabela 7 – Distribuição dos genes de virulência entre amostras de EAEC pAA+ e pAA-, formadoras e não formadoras de biofilme, classificados conforme corante safranina.

Genes de Virulência	pAA+			pAA-		
	Formadora de biofilme n= 30	Não formadora de biofilme n=51	P	Formadora de biofilme n= 28	Não formadora de biofilme n=80	P
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
<i>aggA</i>	0 (0)	1 (2)	>0,05	0 (0)	0 (0)	ND
<i>aafA</i>	1 (3,3)	0 (0)	>0,05	0 (0)	0 (0)	ND
<i>agg-3A</i>	2 (6,7)	0 (0)	>0,05	1 (3,6)	0 (0)	>0,05
<i>aggR</i>	19 (63,3)	8 (15,7)	0,0000	3 (10,7)	1 (1,3)	>0,05
<i>aap</i>	18 (60)	7 (13,7)	0,0000	2 (7,1)	4 (5)	>0,05
<i>astA</i>	15 (50)	14 (27,5)	0,0409	7 (25)	8 (10)	0,0482
<i>pet</i>	19 (63,3)	21 (41,2)	>0,05	8 (28,6)	30 (37,5)	>0,05
<i>set1A</i>	19 (63,3)	4 (7,8)	0,0000	4 (14,3)	1 (1,3)	0,0155
<i>shf</i>	13 (43,3)	11 (21,6)	0,0383	5 (17,9)	14 (17,5)	>0,05
<i>hlyA</i>	2 (6,7)	0 (0)	>0,05	2 (7,1)	4 (5)	>0,05
<i>irp2</i>	17 (56,7)	31 (60,8)	>0,05	12 (42,9)	30 (37,5)	>0,05
<i>yafK</i>	25 (83,3)	45 (88,2)	>0,05	21 (75)	74 (92,5)	0,0367
<i>iucA</i>	15 (50)	23 (45,1)	>0,05	9 (32,1)	26 (32,5)	>0,05
<i>chuA</i>	5 (16,7)	3 (5,9)	>0,05	5 (17,9)	18 (22,5)	>0,05
<i>sen</i>	0 (0)	0 (0)	ND	1 (3,6)	0 (0)	>0,05
<i>agn43</i>	18 (60)	22 (43,1)	>0,05	10 (35,7)	24 (30)	>0,05
<i>papC</i>	1 (3,3)	0 (0)	>0,05	1 (3,6)	3 (3,8)	>0,05
<i>sfa</i>	0 (0)	0 (0)	ND	0 (0)	0 (0)	ND
<i>sat</i>	7 (23,3)	6 (11,8)	>0,05	5 (17,9)	7 (8,8)	>0,05
<i>fis</i>	30 (100)	51 (100)	ND	28 (100)	79 (98,8)	>0,05

5.2.2. Análise da formação de película na interface ar-líquido

A interpretação da formação de película foi realizada considerando a espessura do halo formado na superfície da cultura, e foi categorizada em um *score*: 0, 1+, 2+ e 3+ (Figura 7). Foi observada formação de película por 72% (136/189) das EAEC, distribuídas no *score* de: 1+ em 34,4%, 2+ em 27,5% e 3+ em 10,1% (Tabela 8).

Nas EAEC pAA+ 75,3% (61/81) das amostras foram formadoras de película, e nas EAEC pAA-, 69,4% (75/108) (Tabela 8).

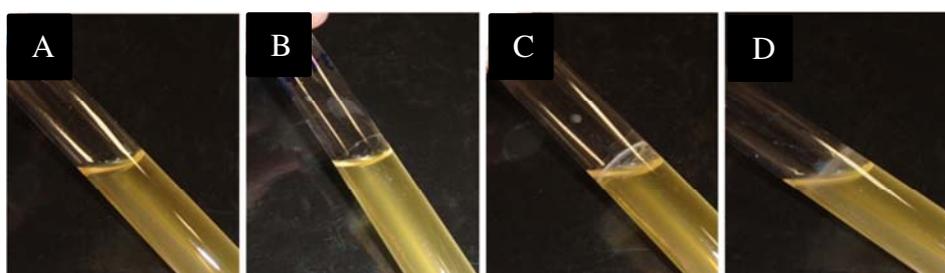


Figura 7 – Resultado do ensaio de formação de película: (A) negativo(0), (B) uma cruz (1+), (C) duas cruzes (2+) e (D) três cruzes (3+)

Tabela 8 – Resultados do ensaio de formação de película (*score*) nas amostras de EAEC pAA+ e pAA- isoladas de crianças sintomáticas e assintomáticas.

<i>Score</i> de película	pAA+ N=81	pAA- N=108	Total N=189
	n (%)	n (%)	n (%)
Negativo	20 (24,7)	33 (30,6)	53 (28,0)
1+	27 (33,3)	38 (35,2)	65 (34,4)
2+	23 (28,4)	29 (26,9)	52 (27,5)
3+	11 (13,6)	8 (7,4)	19 (10,1)

Os genes *aggR*, *aap*, e *iucA* foram significativamente associados às amostras pAA+ formadoras de película ($p < 0,05$) enquanto no grupo pAA- somente o gene *aggR* foi associado à formação de película ($p < 0,05$) (Tabela 9).

Tabela 9 – Distribuição dos genes de virulência entre amostras de EAEC pAA+ e pAA- formadoras e não formadoras de película na interface ar-líquido.

Genes de Virulência	pAA+			pAA-		
	Película Positiva N=61	Película Negativa N=20	P	Película Positiva N=75	Película Negativa N=33	P
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
<i>aggA</i>	1 (1,6)	0 (0)	>0,05	0 (0)	0 (0)	ND
<i>aafA</i>	1 (1,6)	0 (0)	>0,05	0 (0)	0 (0)	ND
<i>agg-3A</i>	2 (3,3)	0 (0)	>0,05	1 (1,3)	0 (0)	>0,05
<i>aggR</i>	27 (44,3)	0 (0)	0,0001	4 (5,3)	0 (0)	0,0001
<i>aap</i>	25 (41)	0 (0)	0,0002	5 (6,7)	1 (3)	>0,05
<i>shf</i>	21 (34,4)	3 (15)	>0,05	12 (16)	7 (21,2)	>0,05
<i>irp2</i>	35 (57,4)	13 (65)	>0,05	25 (33,3)	17 (51,5)	>0,05
<i>yafK</i>	53 (86,9)	17 (85)	>0,05	63 (84)	32 (97)	>0,05
<i>iucA</i>	33 (54,1)	5 (25)	0,0376	27 (36)	8 (24,2)	>0,05
<i>chuA</i>	7 (11,5)	1 (5)	>0,05	17 (22,7)	6 (18,2)	>0,05
<i>agn43</i>	28 (45,9)	12 (60)	>0,05	23 (30,7)	11 (33,3)	>0,05
<i>papC</i>	1 (1,6)	0 (0)	>0,05	3 (4)	1 (3)	>0,05
<i>sfa</i>	0 (0)	0 (0)	ND	0 (0)	0 (0)	ND
<i>fis</i>	61 (100)	20 (100)	ND	74 (98,7)	33 (100)	>0,05

ND: Não determinado

5.2.3. Análise entre amostras de EAEC formadoras e não formadoras de biofilme e de película

Nas amostras formadoras de biofilme 34,6% (47/136) foram formadoras de película e 25,6% (11/43) não formaram película ($p < 0,05$). Entre as amostras de EAEC forte formadoras de biofilme 40% apresentou o *score* de 3+ no ensaio de formação de película, enquanto somente 7% e 7,6% das fracas formadoras e não formadoras respectivamente apresentou esse *score* (3+) (Tabela 10). Foram negativas para a formação de película 32,1% das não formadoras de biofilme e 25,6% das fracas formadoras de biofilme, entretanto nenhuma amostra forte formadora de biofilme foi negativa para formação de película.

Tabela 10 – Resultados do ensaio de formação de película (*score*) nas amostras de EAEC não formadoras, fraca formadoras e forte formadoras de biofilme.

<i>Score</i> película	Não formadora n=131 n (%)	Fraca formadora n= 43 n (%)	Forte formadora n=15 n (%)
Negativo	42 (32,1)	11 (25,6)	0 (0)
1+	47 (35,9)	16 (37,2)	2 (13,3)
2+	32 (24,4)	13 (30,2)	7 (46,7)
3+	10 (7,6)	3 (7,0)	6 (40,0)

5.3. Caracterização genotípica e fenotípica de virulência das amostras de *E. coli* apresentando o padrão CLA

5.3.1. Presença de sequências genéticas associadas à virulência de EAEC

Os resultados da pesquisa dos genes de virulência nas amostras de *E. coli* apresentando o padrão CLA estão apresentados na Tabela 11. Dentre os 20 genes pesquisados, *fis* (100%), *pet* (92,3%), *iucA* e *yafK* (76,9%) foram os mais frequentes. Nenhum destes genes foi detectado em frequência significativamente maior em amostras de *E. coli* com padrão CLA de crianças sintomáticas do que nas assintomáticas.

De modo geral, a presença de pelo menos um gene foi observada em todas as amostras e nas três isoladas de crianças sintomáticas, somente a combinação *fis*, *yafK*, *pet*, *agn43* e *iucA* foi observada (Tabela 12).

Tabela 11 – Presença dos genes pesquisados nas amostras de *E. coli* com padrão CLA isoladas de crianças sintomáticas e assintomáticas residentes em comunidades quilombolas e da periferia do norte do Espírito Santo.

Genes de Virulência	Sintomática	Assintomática	Total
	N=3 n (%)	N=10 n (%)	N=13 n (%)
<i>aggA</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>aafA</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>agg-3A</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>aggR</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>aap</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>astA</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>pet</i>	3 (100)	9 (90)	12 (92,3)
<i>set1A</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>shf</i>	0 (0)	1 (10)	1 (7,7)
<i>hlyA</i>	0 (0)	2 (20)	2 (15,4)
<i>irp2</i>	0 (0)	3 (30)	3 (23,1)
<i>yafK</i>	3 (100)	7 (70)	10 (76,9)
<i>iucA</i>	3 (100)	7 (70)	10 (76,9)
<i>chuA</i>	0 (0)	1 (10)	1 (7,7)
<i>sen</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>agn43</i>	3 (100)	6 (60)	9 (69,2)
<i>papC</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>sfa</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>sat</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>fis</i>	3 (100)	10 (100)	13 (100)

Tabela 12 – Perfil genético das amostras de *E. coli* apresentando o padrão CLA isoladas de crianças sintomáticas e assintomática residentes em comunidades quilombolas e da periferia do norte do Espírito Santo.

Combinações de genes	Sintomática	Assintomática	Total
	N=3 n (%)	N=10 n (%)	N=13 n (%)
<i>fis</i>	0 (0)	1 (10)	1 (7,7)
<i>fis pet iucA</i>	0 (0)	1 (10)	1 (7,7)
<i>fis yafK pet</i>	0 (0)	1 (10)	1 (7,7)
<i>fis pet agn43 iucA</i>	0 (0)	1 (10)	1 (7,7)
<i>fis yafK pet agn43</i>	0 (0)	1 (10)	1 (7,7)
<i>fis yafK pet irp2 iucA</i>	0 (0)	1 (10)	1 (7,7)
<i>fis yafK pet agn43 iucA</i>	3 (100)	0 (0)	3 (23,1)
<i>fis yafK pet agn43 iucA chuA</i>	0 (0)	1 (10)	1 (7,7)
<i>fis yafK pet agn43 iucA irp2</i>	0 (0)	2 (20)	2 (15,4)
<i>shf fis yafK pet agn43 iucA</i>	0 (0)	1 (10)	1 (7,7)

5.3.2. Análise da formação de biofilme e película

Nenhuma das 13 amostras de *E. coli* com o padrão CLA foi capaz de formar biofilme. A distribuição das DO das amostras CLA estão apresentados no Gráfico 4. Todas estas amostras (CLA+) formaram a película, sendo que 69,3% das amostras tiveram um score de 2+ e 3+ (Tabela 13).

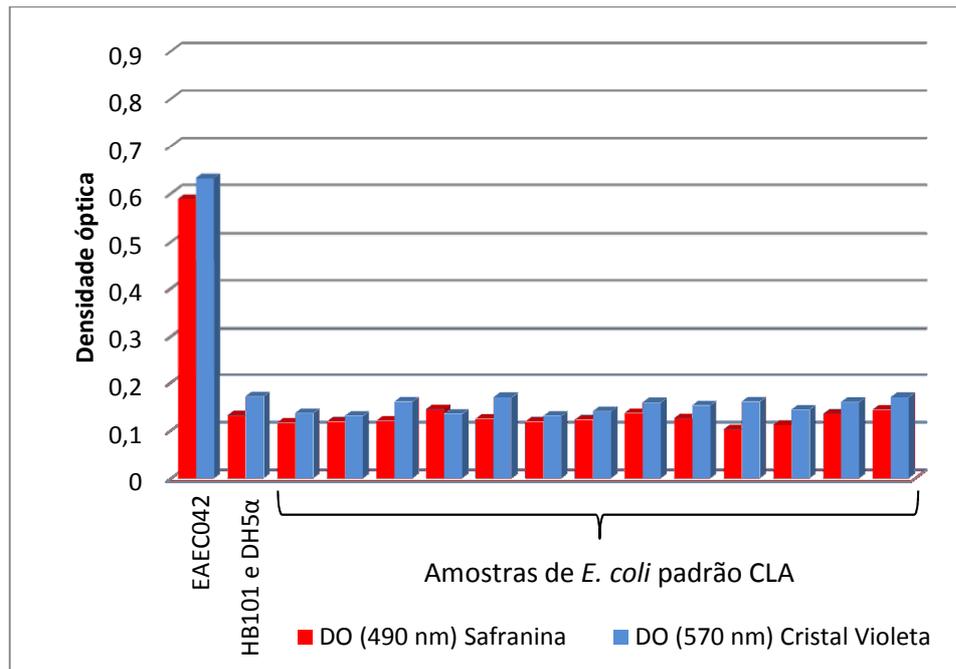


Gráfico 4 – Representação das médias das densidades ópticas em comprimento de onda de 490nm e 570 nm dos corantes safranina e cristal violeta, respectivamente, correspondente aos ensaios de formação de biofilme do controle positivo (EAEC 042), controles negativos (HB101 e DH5α) e das amostras de *E. coli* com o padrão CLA.

Tabela 13 – Resultados do ensaio de formação de película (*score*) nas amostras de *E. coli* com padrão CLA isoladas de crianças sintomáticas e assintomáticas.

<i>Score</i> película	<i>E. coli</i> padrão CLA
	N=13 n (%)
1+	4 (30,8)
2+	6 (46,2)
3+	3 (23,1)

6. DISCUSSÃO

A EAEC é um patógeno emergente em diarreia em países desenvolvidos e em desenvolvimento, tanto em crianças quanto em adultos (Fang et al., 1995; Wanke et al., 1998; Adachi et al., 2001; Harada et al., 2007; Araujo et al., 2007). Enquanto diversos estudos epidemiológicos demonstram a associação da EAEC com a diarreia, outros relatam esse patotipo não correlacionado à diarreia, apesar de ser um dos enteropatógenos mais isolados, (Adachi et al., 2001; Scaletsky et al., 2002; Gassama-Sow et al., 2004; Nataro et al., 2006; Vernacchio et al., 2006; Spano et al., 2008; Moreno et al., 2010).

Os aspectos genotípicos e fenotípicos de virulência mostram que a EAEC é um patotipo caracteristicamente heterogêneo, sem um marcador comum a todas elas e que dificulta a compreensão da sua patogênese (Czeczulin et al., 1999; Okeke et al., 2000; Vila et al., 2000; Huang et al., 2007; Mendez-Arancibia et al., 2008; Moreno et al., 2010; Boisen et al., 2012).

O presente estudo caracterizou amostras de EAEC e de *E. coli* com padrão CLA, isoladas de crianças com e sem diarreia, de um estudo caso-controle realizado previamente em uma população que vive em precárias condições higiênico-sanitárias. Nesse estudo, a EAEC foi o patógeno mais prevalente, embora não associada à diarreia ($p > 0,05$) (Diego M. Lozer, dados não publicados). Foram então pesquisadas nessas amostras a distribuição de 20 genes relacionados a fatores de virulência, tanto cromossômicos quanto plasmidiais, e a capacidade de formação de biofilme em superfície abiótica e de película na interface ar-líquido.

6.1. Genes de virulência em amostras de EAEC

Os 20 genes pesquisados neste estudo serão discutidos individualmente e entre as EAEC positivas e negativas para pAA, típica e atípica e em amostras de *E. coli* com padrão CLA.

O processo de aderência inicial à mucosa intestinal e/ou camada de muco requer estruturas fimbriais de aderência agregativa (AAF) ou outras adesinas (Huang et al., 2006). No presente estudo foi pesquisado os genes *aggA*, *aafA* e *agg-3A* que codificam as subunidades fimbriais AAF/I, AAF/II, e AAF/III. A frequência de qualquer um desses genes nas amostras foi baixíssima (2,7%) (*aggA* 0,5%, *aafA* 0,5%, *agg-3A* 1,6%) e nenhum deles foi significativo em amostras de crianças sintomáticas ($p > 0,05$). Em conformidade com este estudo, taxas também baixíssimas foram descritas para o gene *aggA*, no Brasil e em outros países (0%-9,1%) (Gioppo et al., 2000; Kahali et al., 2004; Sarantuya et al., 2004; Mendez-Arancibia et al.,

2008; Tokuda et al., 2010). Entretanto, Elias et al. (2002) descreveram este gene em 11,7% em isolados de 128 crianças com até quatro anos de idade, com e sem diarreia. Semelhante ao encontrado para o gene *aafA*, baixíssima frequência foi descrita por outros pesquisadores do Brasil (2,3% a 9%) bem como de outros países (1,7%-11%) (Gioppo et al., 2000; Vila et al., 2000; Elias et al., 2002; Jiang et al., 2002; Kahali et al., 2004; Sarantuya et al., 2004; Zamboni et al., 2004; Araujo et al., 2007; Huang et al., 2007; Mendez-Arancibia et al., 2008; Regua-Mangia et al., 2009; Boisen et al., 2012). Poucos estudos pesquisaram o gene *agg-3A*, e estes o descreveram também em frequência baixíssima (1%-9,6%) em amostras de diferentes localidades do mundo (Sarantuya et al., 2004; Huang et al., 2007; Tokuda et al., 2010; Boisen et al., 2012), em conformidade com o achado do presente estudo.

Estes mesmos genes foram encontrados em frequência maior em diversos outros estudos. Para o gene *aggA* (AAF/I) as taxas variaram de 26 a 63% em outros países e em amostras de crianças do Rio de Janeiro (42%) (Czeczulin et al., 1999; Okeke et al., 2000; Jiang et al., 2002; Huang et al., 2007; Regua-Mangia et al., 2009; Boisen et al., 2012). Para o gene *aafA* (AAF/II), as taxas foram de 15 a 54% (Czeczulin et al., 1999; Okeke et al., 2000; Bouzari et al., 2001; Tokuda et al., 2010). No Brasil, nenhum estudo descreveu taxas superiores a 9% para *aafA* (AAF/II) (Gioppo et al., 2000; Elias et al., 2002; Zamboni et al., 2004; Araujo et al., 2007; Regua-Mangia et al., 2009). Para o gene *agg-3A* (AAF/III), somente dois estudos descreveram taxas maiores, que foram de 14% em amostras de pacientes hospitalizados na Índia e de 28% em crianças brasileiras (Kahali et al., 2004; Zamboni et al., 2004).

Alguns estudos, além de pesquisarem os genes das mesmas subunidades fimbriais pesquisadas em nosso estudo, pesquisaram também os genes responsáveis pela síntese dos respectivos *ushers* (*aggC*, *aafC* e *agg3C*) e observaram uma positividade maior dos *ushers*, sugerindo que esses genes acessórios são mais conservados e que há variações notáveis na sequência dos genes estruturais (Rich et al., 1999; Gioppo et al., 2000; Kahali et al., 2004; Bhardwaj et al., 2006; Boisen et al., 2012). Esses dados sugerem que as taxas encontradas no presente estudo referentes aos genes que codificam as subunidades fimbriais poderiam ser maiores do que as efetivamente encontradas se os respectivos *ushers* tivessem sido pesquisados.

No presente estudo, os genes que codificam as subunidades fimbriais das AAFs foram detectadas tanto em EAEC de crianças sintomáticas como assintomáticas, não sendo associadas à doença diarreica na população estudada. Okeke et al. (2000) e Jenkins et al. (2007) evidenciaram amostras de EAEC com gene da AAF/II associados ao grupo com

diarreia e AAF/I a controle saudável, corroborando estudo com voluntários, no qual o protótipo EAEC17-2 (AAF/I+) não causou diarreia e a EAEC 042 (AAF/II+) causou (Nataro et al., 1995a).

Outros genes de adesinas foram investigados nas amostras de EAEC deste estudo, como *papC* e *sfa* que são descritas em UPEC. O gene *papC*, responsável pela polimerização das subunidades fimbriais da adesina tipo P, foi detectado em baixíssima frequência (2,6%) semelhante à obtida com isolados de crianças de Brasília (4,8%) (Piva et al., 2003), mas bem inferiores aos obtidos com crianças menores de quatro anos de São Paulo (18,2%) (Suzart et al., 2001). Okeke et al. (2000b) mostraram que amostras de *E. coli* que hibridizaram com o gene *pap* possuíam um padrão de aderência difuso ou agregativo muito fraco, mas não mostrou a frequência em EAEC. No presente estudo, as amostras positivas para *papC* apresentaram padrão de aderência mais fraco também.

O gene *sfa*, que codifica a fímbria S, não foi evidenciado em nossas amostras, sugerindo que a fímbria codificada por esse gene não é comum em EAEC e não seria importante, portanto, na adesão dessas amostras. O estudo de Piva et al. (2003), realizado em Brasília, não detectou esse gene em amostras de EAEC de crianças, mas somente de adultos com diarreia ($p < 0,05$).

Portanto, estes resultados sugerem que outras adesinas não pesquisadas como *hda* (AAF/IV), ou até mesmo desconhecidas, podem estar envolvidas na etapa inicial da patogênese da EAEC.

O gene *agn43* que codifica a proteína Ag43 foi encontrado em uma frequência total de 39,2% e foi o único, independente da presença de outros fatores, estatisticamente associado às amostras de crianças com diarreia ($p < 0,05$). Taxas semelhantes (33,7%) foram descritas por Mendez-Arancibia et al. (2008) em amostras de EAEC de crianças menores de cinco anos com diarreia da Tanzânia. De nosso conhecimento, nenhum estudo realizado no Brasil pesquisou este gene em amostras de EAEC.

Ainda não está elucidado como a proteína do gene *agn43* participaria na patogênese da EAEC. Porém, foi sugerida a participação da proteína Ag43 de *E. coli* em estágios tardios de infecção e em desenvolvimento de biofilme intracelular por UPEC em células epiteliais da bexiga (Restieri et al., 2007; Ulett et al., 2007; Luna et al., 2008; Goller & Seed, 2010). A participação na formação de biofilme, assim como na agregação célula-célula, também foi demonstrada para os alelos descritos do gene *agn43* do protótipo EAEC 042 (Chaudhuri et al., 2010). Conforme Hasman et al. (1999), a atividade de autoagregação talvez possa conferir

sobrevivência aumentada em diversos ambientes, o que poderia favorecer a diarreia persistente. Portanto, os achados do presente estudo e os demais relatos, sugerem que o gene *agn43* poderia desempenhar um papel na patogênese da infecção por EAEC.

O gene *aap*, que codifica a dispersina, foi detectado em uma frequência classificada como baixa no presente estudo, totalizando 16,4% das amostras de EAEC, taxa semelhante à descrita em estudo caso-controle no Brasil com crianças menores de dois anos (12%) (Zamboni et al., 2004). Esta frequência se encontra dentro de taxas (8,4% a 32,6%) descritas em estudos com viajantes para países em desenvolvimento (México, Jamaica e Índia), em indivíduos com e sem diarreia da Nigéria e Mongólia (até 16 anos de idade) ou em crianças (< 5anos) com diarreia da Tanzânia (Okeke et al., 2000; Jiang et al., 2002; Huang et al., 2003; Sarantuya et al., 2004; Huang et al., 2007; Mendez-Arancibia et al., 2008). Porém, outros estudos realizados no Brasil detectaram frequências bem superiores às encontradas no presente estudo, variando de 58% a 93%, assim como de outras partes do mundo, que variaram de 60% a 100% (Czeczulin et al., 1999; Suzart et al., 2001; Elias et al., 2002; Kahali et al., 2004; Jenkins et al., 2007; Boisen et al., 2008, 2012; Regua-Mangia et al., 2009; Moreno et al. 2010; Tokuda et al., 2010; Aslani et al., 2011). Apesar de ser um gene relacionado à virulência da EAEC por conferir um fenótipo antiagregação que possibilita a sua dispersão na mucosa (Czeczulin et al., 1999; Sheikh et al., 2002), os resultados obtidos no presente estudo e a maior parte daqueles publicados (previamente citados) não encontraram diferença significativa entre os isolados de indivíduos com e sem diarreia ($p>0,05$), sugerindo que não participaria, pelo menos sozinho, na virulência. Porém, os estudos realizados no Brasil por Zamboni et al. (2004), com crianças de SC, RN, GO e MA, e por Huang et al. (2007) com viajantes para México, Guatemala e Índia mostraram associação do gene *aap* com amostras de quadro diarreico.

Considerando os genes envolvidos com a produção de toxinas (*pet*, *astA*, *set1A*, *sen*, *sat* e *hlyA*), o mais frequente dentre estes nas amostras de EAEC foi o *pet* (41,3%), que está presente no plasmídeo pAA. Este gene codifica uma proteína que cliva e degrada a fodrina α (espectrina não eritróide), levando à destruição do citoesqueleto e consequente exfoliação celular (Canizalez-Roman & Navarro-García, 2003). Apesar desse mecanismo descrito e de ter sido encontrado em alta frequência nas amostras estudadas, não foi estatisticamente significativa entre os isolados de crianças com diarreia ($p>0,05$). Frequência similar (38%) foi descrita em crianças do sul (Santa Catarina), nordeste (Rio Grande do Norte e Maranhão) e centro-oeste (Goiás) do Brasil e também em viajantes para países em desenvolvimento, de

pacientes hospitalizados e de crianças (31%-46%) (Okeke et al., 2000; Kahali et al., 2004; Zamboni et al., 2004; Moon et al., 2005; Mohamed et al., 2007; Huang et al., 2007). Estas taxas foram significativamente maiores do que as encontradas em amostras de EAEC isoladas tanto de diversas regiões do Brasil (5,1%-14,1%) quanto de outras partes do mundo (<16%) (Gioppo et al., 2000; Vila et al., 2000; Elias et al., 2002; Sarantuya et al., 2004; Piva et al., 2003; Araujo et al., 2007; Jenkins et al., 2007; Boisen et al., 2008, 2009, 2012; Mendez-Arancibia et al., 2008; Regua-Mangia et al., 2009; Moreno et al., 2010; Tokuda et al., 2010).

Como o presente estudo, outros pesquisadores não encontraram correlação de *pet* com amostras de crianças com diarreia do Brasil e também de países da África, Ásia, América Central e Europa (Okeke et al., 2000; Elias et al., 2002; Sarantuya et al., 2004; Zamboni et al., 2004; Jenkins et al., 2007; Mohamed et al., 2007; Huang et al., 2007; Regua-Mangia et al., 2009; Boisen et al., 2012), o que sugere que a proteína codificada por esse gene não possui papel na enteropatogenicidade, pelo menos isoladamente, nas amostras de EAEC, conforme também previamente sugerido por Regua-Mangia et al. (2009).

A presença do gene *pet* é descrito em associação com a presença do gene de AAF/II por alguns pesquisadores (Czeczulin et al., 1999; Jenkins et al., 2007; Boisen et al., 2009). No presente estudo, esta análise não pode ser realizada pois somente uma amostra foi *aafA+* (AAF/II), mas neste caso, ela foi *pet+* (dado não mostrado), possivelmente por serem carregados no mesmo plasmídeo.

O gene da toxina EAST1 (*astA*) foi o segundo em frequência dos genes produtores de toxina pesquisados, detectado em 23,3% das amostras de EAEC. Diversos estudos tem descrito *astA* em amostras de EAEC com frequências diversas, variando de 22% a 74% entre diferentes populações no mundo (Rich et al., 1999; Gioppo et al., 2000; Okeke et al., 2000; Vila et al., 2000; Bouzari et al., 2001; Suzart et al., 2001; Elias et al., 2002; Piva et al., 2003; Kahali et al., 2004; Sarantuya et al., 2004; Zamboni et al., 2004; Araujo et al., 2007; Huang et al., 2007; Jenkins et al., 2007; Boisen et al., 2008, 2012; Mendez-Arancibia et al., 2008; Regua-Mangia et al., 2009; Moreno et al. 2010; Tokuda et al., 2010; Aslani et al., 2011). No Brasil, estudos relatam frequência compatível com a encontrada na população deste estudo, variando de 27% a 35% (Zamboni et al., 2004; Araujo et al., 2007; Regua-Mangia et al., 2009), enquanto outros, descrevem frequência maiores, de 44% a 73% (Gioppo et al., 2000; Suzart et al., 2001; Elias et al., 2002; Piva et al., 2003; Moreno et al. 2010).

A presença do gene *astA* foi mais frequente nas amostras das crianças sintomáticas, embora não estatisticamente associado a esse grupo, como também demonstrado por outros

pesquisadores (Okeke et al., 2000; Sarantuya et al., 2004). Estes resultados sugerem que a toxina EAST1 não teria participação na patogênese dessas amostras, pelo menos isoladamente. Savarino et al. (1991) e Vila et al. (2000) sugeriram que a produção da toxina por EAEC seria insuficiente para causar diarreia a menos que estivesse presente outro fator de virulência. Outros estudos, inclusive realizados no Brasil, mostraram frequência até maior desse gene no grupo de assintomáticos (Vila et al., 2000; Elias et al., 2002; Regua-Mangia et al., 2009). Porém, Huang et al. (2007), em estudo sobre etiologia da diarreia de viajantes adultos de países desenvolvidos para Índia, Guatemala e México, associaram estatisticamente à diarreia as amostras de EAEC com o gene *astA*.

Cabe ressaltar que o gene *astA* não é restrito à EAEC, sendo descrito em outros patótipos de DEC e também em *E. coli* comensais (Savarino et al., 1996; Vila et al., 2000; Sarantuya et al., 2004). Sarantuya et al. (2004) mostraram *astA* em amostras de ETEC e DAEC além de EAEC na Mongólia, associado à diarreia, o que sugere que essa toxina possa desempenhar papel na patogênese destes patótipos naquela região.

O gene *setIA*, que codifica a toxina ShET1 (*Shigella flexneri* 1), foi encontrado neste estudo em uma frequência baixa, de 14,8%, similar entre amostras de crianças com (16,7%) e sem (14,1%) diarreia. Outros estudos realizados no Brasil também não encontraram associação de *setIA* com isolados de indivíduos com diarreia e revelaram frequência também baixa desse gene, de 17% (Zamboni et al., 2004), ou até mesmo, de moderada a alta (32%-78%) (Suzart et al., 2001; Elias et al., 2002; Araujo et al., 2007; Moreno et al., 2010). Frequências variadas desse gene foram também descritas em estudos de outras partes do mundo (Czeczulin et al., 1999; Okeke et al., 2000; Kahali et al., 2004; Sarantuya et al., 2004; Moon et al., 2005; Jenkins et al., 2007; Huang et al., 2007; Boisen et al., 2008, 2009, 2012; Mendez-Arancibia et al., 2008). Embora a maioria desses estudos, assim como o nosso, não evidenciassem amostras com gene *setIA* associadas à diarreia, Huang et al. (2007) detectaram *setIA* individualmente mais frequente entre amostras de EAEC do grupo com diarreia ($p < 0,05$).

De acordo com Vila et al. (2000), a presença do gene para a toxina ShET1/Pic não indica necessariamente a sua expressão, pois esse gene pode desenvolver mutações que abolem a expressão de um fator ou outro, por isso, a detecção da produção da toxina poderia ser importante para mostrar associação com o grupo de diarreia.

O gene *sen*, que codifica a enterotoxina (ShET2), foi encontrado em somente uma amostra de criança com diarreia, evidenciando em raras amostras de EAEC, a presença deste gene descrito em *Shigella*. Esse gene também foi previamente descrito em frequência baixíssima

(3,7%) em amostras de EAEC de espanhóis com diarreia, que haviam viajado para países em desenvolvimento (Vila et al., 2000). Alguns pesquisadores tem sugerido que *sen* possui múltiplos papeis na virulência, e entre eles, o aumento de liberação de íons, levando à diarreia aquosa (Nataro et al. 1995b; Vila et al., 2000). De nosso conhecimento, somente estes estudos investigaram a presença desse gene de *Shigella* em amostras de EAEC e os dados obtidos no presente estudo, mostram que são raras as amostras *sen+*, pelo menos do norte do Espírito Santo.

Responsável pela síntese de uma toxina que é autotransportada, o gene *sat* foi detectado em 13,2% (25/189) das amostras. Taxa bem maior desse gene (55%) foi encontrada em EAEC de crianças do nordeste do Brasil (Moreno et al., 2010), assim como em amostras de outras regiões do mundo, nas quais detectaram frequências variando de aproximadamente 20% a até 75% (Guyer et al., 2000; Mendez-Arancibia et al., 2008; Boisen et al., 2009, 2012). Apesar de ser um fator de virulência em potencial, visto que codifica uma toxina citopática que leva a uma forte resposta com anticorpos em infecção do trato urinário em camundongo, não foi observada associação com os isolados de diarreia em nosso estudo e nem por outros pesquisadores (Guyer et al., 2000; Moreno et al., 2010; Boisen et al., 2012).

A hemolisina α , codificada pelo gene *hlyA*, foi descrita como a provável responsável pelo efeito de destacamento de célula HEp-2 (*cytodetaching*) por isolados de *E. coli* de fezes e inclusive pelo patotipo EAEC e seu protótipo EAEC17-2 (Gomes et al., 1995; Marques et al., 1995; Nataro et al., 1995a). No presente estudo, o gene *hlyA* foi encontrado em baixíssima frequência (4,2%) e não significante entre os isolados de diarreia. A não associação com isolados de diarreia também foi observada por Regua-Mangia et al. (2009) que detectaram o gene *hlyA* em aproximadamente 20% dos isolados de crianças com e sem diarreia do Rio de Janeiro. Por outro lado, Okeke et al. (2000) e Piva et al. (2003) detectaram o gene da hemolisina α somente em amostras de EAEC de crianças com diarreia da Nigéria e do Brasil, respectivamente.

Taxas baixíssimas ou baixas para o gene *hlyA* foram também descritas por outros pesquisadores em estudos realizados no Brasil, de 6,3% a 18% (Gomes et al., 1995; Suzart et al., 2001; Piva et al., 2003; Zamboni et al., 2004) e na Nigéria, com frequência de 1,5% (Okeke et al., 2000).

Considerando nossos resultados e os de outros estudos (Gomes et al., 1995; Zamboni et al., 2004; Regua-Mangia et al., 2009), a toxina codificada pelo gene *hlyA* não deve, pelo menos considerada isoladamente, desempenhar papel tóxico na entoropatogenicidade da EAEC.

A capacidade de sequestrar ferro pode ser essencial para crescimento de patógenos, inclusive daqueles que aderem à mucosa intestinal. A EAEC possui sistemas especializados de aquisição de ferro, como os codificados pelos genes *irp2*, *iucA* e *chuA*, sendo capazes de utilizar heme ou hemoglobina como única fonte de ferro e produzir sideróforos comparável à *Shigella* spp., EHEC e UPEC (Okeke et al., 2004).

Dos genes relacionados à captação de ferro e pesquisados no presente estudo, o *irp2* foi o detectado em maior frequência (47,6%) nas amostras de EAEC, frequência esta um pouco inferior à de outros estudos no Brasil, descritos em 54% e 60,2% de amostras de diversas regiões (Elias et al., 2002; Zamboni et al., 2004). Trata-se de um gene comumente detectado em alta frequência, variando de 47,1% a até 94%, em isolados de indivíduos de diversas partes do mundo (Czeczulin et al., 1999; Kahali et al., 2004; Huang et al., 2007; Jenkins et al., 2007; Mohamed et al., 2007; Tokuda et al., 2010). Assim como o presente estudo que não encontrou associação do gene *irp2* com amostras de crianças com diarreia, outros estudos que fizeram esta análise também não encontraram (Elias et al., 2002; Zamboni et al., 2004; Huang et al., 2007; Mohamed et al., 2007). Portanto, embora o gene *irp2* possa contribuir para a virulência do isolado por sintetizar um sideróforo (Schubert et al., 1998; Czeczulin et al., 1999), em nosso estudo *irp2* parece não ser responsável pela patogenicidade da EAEC.

A frequência do gene *iucA*, que codifica a aerobactina, e de *chuA*, que codifica um receptor heme para aquisição de ferro, foi de 38,6% e 16,4%, respectivamente. Ambos os genes estavam presentes em taxas inferiores à de outros estudos realizados com amostras também do Brasil, que mostraram frequências de 67% a 75% para *iucA* e de 33,6% para *chuA* (Piva et al., 2003; Okeke et al., 2004; Regua-Mangia, et al., 2009).

Múltiplos sistemas de utilização de ferro coletivamente conferem um avanço competitivo sobre as amostras de *E. coli* que são negativas para esses fatores (Okeke et al., 2004). Assim como em outros estudos, os nossos indicam que muitas EAEC carregam genes para vários sistemas de utilização de ferro e isso pode ter papel importante na virulência. Dessa forma, segundo Okeke et al. (2004), seria necessário adequar o atual modelo de patogênese da EAEC. Porém, no presente estudo nenhum gene de sistema de aquisição de ferro (*irp2*, *iucA* ou *chuA*), sozinho ou em combinação entre eles (dados não mostrados), foram associados aos isolados de crianças com diarreia. Resultados semelhantes foram descritos em outros isolados de crianças do Brasil (Okeke et al., 2004; Regua-Mangia et al., 2009). Entretanto, a combinação *iucA* e *chuA* já foi mostrada ser mais comum em crianças nigerianas com diarreia ($p < 0,03$) (Okeke et al. 2004). Piva et al. (2003), também do Brasil, detectaram frequências

superiores a 79% do gene da aerobactina em isolados de crianças e adultos com diarreia e não detectou em isolados de criança sem diarreia.

Os genes *fis* e *yafK* foram os genes encontrados em altíssima frequência nas amostras de EAEC analisadas e apresentaram uma distribuição homogênea nos grupos propostos. Ambos os genes foram descritos como importantes na formação de biofilme do protótipo EAEC 042 por medirem a expressão da AAF/II (Sheikh et al., 2001). Como no presente estudo a frequência da subunidade fimbrial da AAF/II foi extremamente baixa (0,5%) e do gene *fis* foi alta, não é possível fazer qualquer correlação desse gene com a formação de biofilme nas amostras.

A frequência do gene *shf* detectada nas EAEC foi classificada como moderada (22,8%) e não foi associada com diarreia. Esses dados estão em conformidade com os descritos anteriormente em crianças no Brasil e em adultos viajantes para países em desenvolvimento (25%-31,3%) e sem associação com quadro diarreico (Elias et al., 2002; Huang et al., 2007; Regua-Mangia et al., 2009). Outros estudos detectaram o gene *shf* em mais de 35% de suas amostras, mas também não associados à diarreia, incluindo trabalhos com crianças no Brasil (Suzart et al., 2001; Czczulin et al., 1999; Kahali et al., 2004 ; Zamboni et al., 2004; Jenkins et al., 2007; Vasconcellos, 2009). O gene *shf* codifica uma proteína de função não conhecida que apresenta homologia com a proteína IcaB do *S. epidermidis*, implicada na adesão intercelular (Heilmann et al., 1996) e parece estar associado à formação de biofilme também em EAEC (Nataro et al., 1998; Fujiyama et al., 2008; Vasconcellos, 2009).

O gene *aggR*, por ter sido utilizado para a classificação dos grupos EAEC típica e atípica será abordado separadamente.

6.2. Caracterização genotípica das EAEC típica e atípica

O gene *aggR* foi sugerido ser um marcador de EAEC verdadeiramente virulenta, propondo-se a classificação da EAEC como típica e atípica de acordo com a presença ou ausência do ativador transcripcional (ou *regulon*) AggR, respectivamente (Jiang et al., 2002; Kaper et al., 2004; Sarantuya et al., 2004).

No presente estudo, baseando-se na presença do regulador transcripcional AggR, somente 16,4% (31/189) das amostras de EAEC foram classificados como “típica”. As frequências mais baixas de EAEC típicas já descritas variaram de 27 a 32% em EAEC de pacientes com HIV e de viajantes para países em desenvolvimento (Bernier et al., 2002; Huang et al., 2003,

2007). Em amostras de outras regiões do Brasil, as taxas descritas para EAEC típica foram sempre superiores, variando de 41%-84%, o que mostra a peculiaridade das amostras do norte do Espírito Santo (Suzart et al., 2001; Elias et al., 2002; Zamboni et al., 2004; Vasconcellos, 2009; Moreno et al. 2010). Da mesma forma para as amostras de outros países, como Nigéria, Índia, Mongólia, Mali, Reino Unido, Tanzânia e Japão, que descreveram frequência variando de 41% a 100% (Czeczulin et al., 1999; Okeke et al., 2000; Jiang et al., 2002; Kahali et al., 2004; Sarantuya et al., 2004; Bhardwai et al., 2006; Jenkins et al., 2007; Mendez-Arancibia et al., 2008; Tokuda et al., 2010; Aslani et al., 2011; Boisen et al., 2012). Outros estudos que encontraram 100% de positividade para o gene *aggR*, analisaram amostras de EAEC que foram identificadas por hibridização ou por PCR para a região CVD432 e não por aderência em cultura de células, o que pode justificar a taxa encontrada (Moon et al., 2005; Araujo et al., 2007; Boisen et al., 2008).

As EAEC típicas estão igualmente distribuídas entre crianças com e sem diarreia. Estes achados corroboram os estudos realizados com amostras de crianças do Brasil e de Mali (Zamboni et al., 2004; Regua-Mangia et al., 2009; Moreno et al. 2010; Boisen et al., 2012), mas contrastam com os resultados obtidos com amostras de crianças da Mongólia e de viajantes para países em desenvolvimento (Sarantuya et al., 2004; Huang et al., 2007).

Dentre os genes que foram encontrados significativamente associados à EAEC típica estão os genes plasmidiais *aap*, *astA*, *pet* e *shf* e os genes cromossômicos *agn43*, *iucA*, *irp2*, *sat* e *set1A*. A relação entre a presença do gene *aggR*, usada na classificação de EAEC típica, com outros genes plasmidiais é esperada e já foi demonstrada anteriormente (Boisen et al., 2008; Tokuda et al., 2010). A detecção de genes que estão localizados separadamente no mapa de restrição do plasmídeo pAA2 evidencia que existem várias EAEC com plasmídeo conservado conforme relatado por Czeczulin et al. (1999). A presença de genes cromossômicos mais frequentes em EAEC típica ($p < 0,05$) sugere que esses genes com *aggR* formam combinações estáveis ou que talvez sejam regulados por este, já que se sabe que ele também regula genes cromossômicos (Dudley et al., 2006a; Harrington et al., 2006).

Tokuda et al. (2010), assim como nosso estudo, encontraram o gene *irp2* em uma prevalência significativamente maior em EAEC típica do que na atípica. O gene *shf*, por sua vez, também foi detectado em frequência semelhante nas amostras de EAEC típica do presente estudo, foi detectado em frequência similar em EAEC típica e atípica por Vasconcellos (2009).

Além dos genes estatisticamente associados às amostras de EAEC típica, a frequência de todos os demais genes pesquisados (exceto *yafK*) foi maior entre as EAEC típica do que nas

EAEC atípicas, sugerindo que as típicas sejam dotadas de características mais virulentas. Embora os genes previamente descritos fossem mais frequentes nas EAEC típicas, nenhum deles foi relacionado aos isolados de crianças com diarreia.

Apesar de diversos estudos não associarem a EAEC atípica com diarreia, ela já foi relatada como patógeno entérico em surtos alimentares (Cobeljic et al., 1996; Itoh et al., 1997). Destaca-se que, apesar da EAEC atípica não ter sido associada à diarreia no presente estudo, quando foram analisados os diversos genes, verificou-se que a presença de qualquer um dos genes *aap* e *agn43*, isoladamente ou em combinação, conferia um papel patogênico à EAEC atípica, constituindo assim subpopulações que foram associadas à diarreia no presente estudo ($p=0,0047$, $\chi^2=8,01$). Considerando que estes mesmos genes, quando presentes na EAEC típica não foram associados a crianças com diarreia e que com isso trata-se então de um fator de virulência improvável, pelo menos isoladamente, demonstra que, até o momento, não dispomos de informações suficientes para que a patogênese da EAEC atípica se justifique pela presença individual de cada um desses gene e que esta seja inferida. Certamente, mais estudos são necessários para evidenciar outros possíveis fatores de virulência entre as EAEC atípicas.

6.3. Caracterização genotípica das EAEC positivas e negativas para o plasmídeo pAA

Estudos têm mostrado que as EAEC positivas para o plasmídeo pAA compreendem uma subpopulação distinta, com variedade maior de genes de virulência quando comparadas com amostras negativas para essa sonda (Suzart et al., 2001; Elias et al., 2002; Zamboni et al., 2004).

Neste estudo, dentre os genes plasmidiais pesquisados, os genes *aggR*, *aap*, *astA* e *pet* foram significativamente associados às amostras pAA+ ($p<0,05$), conforme esperado e previamente demonstrado (Czeczulin et al., 1999; Okeke et al., 2000; Bouzari et al., 2001; Suzart et al., 2001; Elias et al., 2002; Zamboni et al., 2004; Wakimoto et al., 2004; Regua-Mangia et al., 2009). Os demais genes plasmidiais pesquisados como *aggA*, *aafA*, *agg3A* não foram associados às amostras pAA+, provavelmente devido à baixíssima frequência com que foram encontrados e o gene *shf*, apesar não estar significativamente associado, foi encontrado em maior frequência neste grupo. Estes resultados sugerem que o plasmídeo pAA é, pelo menos parcialmente, conservado nas amostras de EAEC analisadas.

A presença de genes plasmidiais foi observado também em amostras pAA-, o que mostra que, como CVD432/*aat* corresponde a uma região do plasmídeo pAA, o fato dela ter sido negativa

não exclui a presença do plasmídio, que é parcialmente conservado, conforme previamente descrito (Czeczulin et al., 1999; Okeke et al., 2000; Bouzari et al., 2001; Elias et al., 2002; Zamboni et al., 2004).

Destaca-se o fato de que os genes de localização cromossômica *set1A*, *agn43*, *irp2* e *iucA* foram também significantes ($p < 0,05$) entre as amostras pAA+. A frequência maior do gene *irp2* nas amostras pAA+ também foi descrita anteriormente no Brasil (Elias et al., 2002; Zamboni et al., 2004). Schubert et al. (1998) descrevem *irp2* em outros patotipos de DEC em frequências menores do que na EAEC e conclui que pode ser transferido horizontalmente e mantido somente em certos patotipos. Isso suporta nossos dados que mostram *irp2* conservado nas amostras que carregam o plasmídio pAA (59,3% nas pAA+ versus 38,9% nas pAA-, Tabela 2), o que pode levar à hipótese de uma possível transferência conjunta de ambos.

Em contraposição aos resultados do presente estudo, a associação do gene cromossômico *iucA* às amostras pAA+ não foi detectada em coleções de cepas de referência e de estudo caso/controle do Brasil e da Nigéria (Okeke et al., 2004).

Nenhum dos genes pesquisados foi significativo dentre as amostras pAA- ($p > 0,05$), embora nestes, *papC* e *hlyA* ocorressem em maior número. Zamboni et al. (2004) detectaram *hly* em proporções similares entre amostras pAA+ e pAA-. Suzart et al. (2001), ao detectar o gene *hlyA* somente em amostras pAA- de EAEC destacadora de células, sugeriram que estas fossem potenciais UPEC na microbiota das fezes e que poderiam contribuir em parte pela ausência de correlação da EAEC à diarreia.

Enquanto nas EAEC pAA+ nenhum gene foi estatisticamente associado a crianças com diarreia, nas amostras pAA-, o gene *chuA* foi estatisticamente associado a crianças com diarreia ($p < 0,05$). Zamboni et al. (2004), em estudo com crianças no Brasil, mostraram os genes *astA*, *shf* e *set1A* mais frequentes nos isolado pAA- de pacientes com diarreia.

Não se sabe se as EAEC pAA- são genética ou patogenicamente relacionados às pAA+ (Okeke et al., 2000). Dessa forma, e considerando todos os resultados analisados, torna-se necessário investigar os potenciais fatores de virulência de EAEC pAA- a fim de analisar se, por exemplo, subpopulações dessas amostras positivas para o gene *chuA* seriam mais virulentas.

6.4. EAEC e formação de biofilme

A formação de biofilme em superfície abiótica pelas amostras de EAEC isoladas de crianças sintomáticas e assintomáticas foi estudada no presente estudo pela sua relação com a gênese da diarreia e com colonização persistente (Weintraub, 2007; Mohamed et al., 2007).

O procedimento utilizado foi realizado conforme estabelecido por Sheikh et al. (2001) que utiliza o corante cristal violeta, e com modificação, usando o corante safranina, conforme descrito por Stepanovic et al. (2007) para *Staphylococcus* spp. Comparação na capacidade de detecção de biofilme com o uso dos corantes foi realizado. Foram consideradas formadoras de biofilme 24,9% e 30,7% das amostras, quando utilizado os corantes cristal violeta e safranina, respectivamente. Apesar de o corante safranina classificar um número maior de amostras como formadoras de biofilme do que o cristal violeta, foi observado que, ao comparar as DO de ambos os corantes, quando a absorvância de um corante aumentava ou diminuía, a absorvância do outro corante variava da mesma forma.

Houve concordância entre ambos os corantes quanto à detecção de biofilme por amostras positivas para os genes *aggR*, *shf* e *aap* (dados não mostrados), descritos estarem relacionados com a formação de biofilme (Heilmann et al., 1996; Velarde et al., 2007; Mohamed et al., 2007; Mendez-Arancibia et al., 2008; Fujiyama et al., 2008; Vasconcellos, 2009). O gene *agg-3A*, sugerido também estar relacionado à formação de biofilme (Sheikh et al., 2001), só foi estatisticamente associado com as amostras formadoras de biofilme quando esta classificação foi feita com o corante safranina e não com o cristal violeta (dados não mostrados). Portanto, a partir dos resultados analisados, consideramos que a utilização do corante safranina pode ser utilizado em ensaios de formação de biofilme por EAEC e foi considerada na avaliação de todas as variáveis analisadas neste estudo.

Estudos realizados com isolados de crianças (Índia, Tanzânia e Dinamarca) e viajantes de países desenvolvidos para México, Índia e Guatemala descreveram taxas de formação de biofilme por EAEC superiores às encontradas no presente estudo, que variaram de 53% a 84,6% (Bhardwai et al., 2006; Mohamed et al., 2007; Mendez-Arancibia et al., 2008; Boisen et al., 2008). Essas diferenças podem ser explicadas pela origem da população estudada, pela técnica utilizada para detecção e pela forma de classificação de formadores de biofilme.

Embora a formação de biofilme seja uma das etapas importantes atribuídas à patogênese da diarreia por EAEC, ela não foi estatisticamente associada aos isolados de crianças sintomáticas ($p > 0,05$), resultado este compatível com os obtidos por Mohamed et al. (2007).

Por outro lado, a formação de biofilme pode também explicar a habilidade da EAEC de causar colonização crônica assintomática, por comprometer sua eliminação pelo hospedeiro e agravar o estado nutricional do indivíduo (Nataro et al., 1996; Steiner et al., 1998; Mohamed et al., 2007).

Os genes *aggR*, *aap*, *shf*, *agg-3A*, *astA*, *set1A* e *sat* foram estatisticamente associados às amostras de EAEC formadoras de biofilme. Destes, a presença significativa de *aggR* foi previamente demonstrada e pode ser devida ao fato deste gene sintetizar o *regulon* AggR, que controla inclusive os genes que modulam a formação de biofilme (Wakimoto et al., 2004; Mohamed et al., 2007; Mendez-Arancibia et al., 2008). Por outro lado, Tokuda et al. (2010) e Sarantuya et al. (2004) não encontraram diferenças na formação de biofilme entre as amostras *aggR+* (EAEC típica) e *aggR-* (EAEC atípica).

Destaca-se, no presente estudo, a detecção de muitas amostras *aggR-* e biofilme+ (36/58), que sugere que a regulação do biofilme pode se dar por outros fatores que não por *aggR*. Logo, torna-se necessário investigar mecanismos de virulência em amostras de EAEC atípica.

Dos genes que foram significativamente associados com as amostras formadoras de biofilme neste estudo, os genes *aap*, *shf* e *agg-3A* também eram previstos: (i) a dispersina (*aap*) contribuiria por deixar livre as fímbrias e proporcionar a interação destas com a superfície da mucosa (Velarde et al., 2007); (ii) o gene *shf*, que codifica uma proteína semelhante ao IcaB do *S. epidermidis* implicada na adesão intercelular e com papel demonstrado na capacidade de formação de biofilme (Heilmann et al., 1996; Fujiyama et al., 2008; Vasconcellos, 2009); (iii) e *agg-3A*, que codifica a subunidade fimbrial de AAF/III, pertencente a uma família de adesinas relacionadas à mediação de formação de biofilme em EAEC (Sheikh et al., 2001).

Apesar dos genes associados à formação de biofilme no presente estudo serem codificados pelo plasmídio, frequências similares de formadoras de biofilme foram encontradas entre as amostras de EAEC pAA+ (37,0%) e pAA- (25,9%). Nota-se ainda que, dentre os genes que foram estatisticamente significantes nos grupo de EAEC pAA+ e/ou pAA- formadoras de biofilme, aqueles que codificam proteínas de importância na formação de biofilme (*aap*, *aggR* e *shf*) só foram associados à esse fenótipo nas EAEC pAA+, enquanto nas pAA- formadoras de biofilme, estiverem presentes genes relacionados à produção de toxina (*astA*, *set1A*). Isto mostra que há fatores de outros plasmídios ou não plasmidiais envolvidos na formação de biofilme nas amostras pAA- que precisa ser elucidado.

O gene *yafk*, descrito como necessário para transcrição dos genes da AAF/II associados à formação de biofilme (Sheikh et al., 2001), foi encontrado em altíssima frequência (88,3%) nas amostras, porém mais frequente ainda no grupo das não formadoras de biofilme. Apenas uma amostra (biofilme+) foi *aafA+* (subunidade fimbrial de AAF/II), o que também pode contribuir para a baixa taxa de formadoras de biofilme em relação a outros estudos, que tiveram 75,7% e 84,6 % de amostras biofilme+ com taxa de *aafA+* de 3,5% e 13% (Bhardwai et al., 2006; Mendez-Arancibia et al., 2008). Entretanto, Boisen et al. (2008) não encontraram *aafA* em suas amostras que foram 79% biofilme+. Estes resultados mostram que são necessários estudos que caracterizem as etapas iniciais de formação de biofilme.

Genes não relacionados com a formação de biofilme também foram detectados significativamente associados às amostras formadoras de biofilme, como os genes que codificam toxinas, *astA*, *set1A* e *sat* ($p < 0,05$). Da mesma forma, Mohamed et al. (2007) descrevem a associação para o gene *set1A* (ShET1) em amostras biofilme+. Estes genes seriam carregados ou estariam presentes no mesmo plasmídeo que *aggR*, *agg-3A*, *aap* e *shf*, associados à formação de biofilme, ou em uma ilha de patogenicidade junto com outros genes envolvidos na formação do biofilme.

6.5. EAEC e formação de película

O teste formação de película, proposto previamente na identificação preliminar de amostras de EAEC por apresentar correlação com o padrão de aderência (Yamamoto et al., 1991; Albert et al., 1993; Iwanaga et al., 2002), foi realizado neste estudo a fim de observar se as amostras formadoras de película apresentariam correlação com formação de biofilme. Apesar de ser mediado por plasmídeo (Yamamoto et al., 1991; Albert et al., 1993), até o momento, não foram descritos os genes que estariam associados a este fenótipo em EAEC.

Das amostras de EAEC, 72% foram positivas para a formação de película. Esta taxa é semelhante com a obtida por outros estudos que detectaram de 77,7% e 84,6% (Kahali et al., 2004; Bhardwai et al., 2006). Ao considerar o *score* na formação de película, nossos resultados mostraram frequências para 1+ de 34,4%, 2+ de 27,5% e 3+ de 10,1% enquanto Bhardwai et al. (2006) detectaram frequências de 28,2%, 41% e 17,9%, respectivamente. Essas diferenças podem ser devido à: (i) origem geográfica das amostras, (ii) meio de crescimento utilizado e (iii) variações de leitura por diferentes observadores.

Não foi observado neste estudo correlação entre amostras formadoras de película e as biofilme+ ($p > 0,05$), entretanto 40% (6/15) das amostras classificadas como fortes formadoras de biofilme apresentaram o *score* de 3+ na formação de película, sugerindo que pode haver relação entre estas características fenotípicas.

Um número semelhante de amostras de EAEC pAA+ e pAA- (75,3% e 69,4%, respectivamente) foram formadoras de película, sugerindo que genes não plasmidiais podem conferir esta característica às amostras.

Dos genes pesquisados, foram estatisticamente associados às amostras formadoras de película, os seguintes genes: (i) *aap* (dispersina), *aggR* (regulador transcripcional) e *iucA* (aerobactina) nas amostras pAA+ e (ii) *aggR* nas pAA-. Os genes *aap* e *aggR* foram também significantes em amostras biofilme+, sugerindo mecanismos semelhantes entre eles, apesar de não ter havido associação estatística entre o biofilme e formação de película. Embora não se conheça o papel do gene *iucA* (sideróforo) na formação de película, sabe-se que o ferro interfere na aderência e formação de biofilme em EAEC (Alves et al., 2010).

6.6. *E. coli* com padrão CLA: fatores genotípicos e fenotípicos

Foi previamente sugerido por Gioppo et al. (2000) que o padrão CLA de aderência observado em cultura de células HEp-2 representaria uma variação do padrão AA, uma vez que, analisando genes de virulência encontrou pelo menos um gene do protótipo EAEC 042 e em algumas amostras, os genes da adesina AAF/I e do *regulon* AggR. A partir de então outros pesquisadores também tem considerado CLA como um tipo de aderência AA (Kahali et al., 2004; Bhardwai et al., 2006). As análises das amostras de *E. coli* que apresentaram este padrão foram então analisadas neste estudo separadamente daquelas com padrão AA.

Nas amostras de *E. coli* com padrão CLA foram evidenciados nove dos 20 genes pesquisados (*agn43*, *chuA*, *fis*, *hlyA*, *irp2*, *iucA*, *pet*, *shf*, *yafK*), em contraposição aos 19 genes evidenciados nas amostras de EAEC. De nosso conhecimento, somente Gioppo et al. (2000) analisaram separadamente amostras CLA, testando dez genes, sendo oito destes coincidentes com os pesquisados aqui (*aggA*, *aafA*, *pet*, *shf*, *aggR*, *aap*, *astA*, *set1A*). Analisando ambos os resultados, destaca-se dentre as amostras CLA do presente estudo que: (i) a frequência de *pet* (citotoxina) foi significativamente superior nas nossas amostras (92,3% versus 11,1%), (ii) *shf* foi detectado em frequência inferior (7,7% versus 33,3%) e (iii) a ausência em nossas amostras dos genes *aggR*, *aap*, *astA* e *set1A*. Diferentemente de Gioppo et al. (2000), o gene

aggR não foi detectado nas amostras CLA no presente estudo, nem os genes relacionados às AAF, sugerindo que o padrão CLA não represente uma variação do padrão AA. A alta frequência de *pet* dentre as amostras CLA e a ausência da maioria dos outros genes presentes no plasmídeo pAA, sugere que esse gene, nestes casos, estaria presente no cromossoma ou em outro plasmídeo não pesquisado neste estudo.

Alguns aspectos se destacaram ao comparar os resultados obtidos entre as amostras CLA e AA, como: (i) enquanto muitos dos genes não foram detectados nas CLA, outros, apresentaram taxas bem superiores do que nas amostras AA, como genes *agn43* (69,2% versus 39,2%), *hlyA* (15,4% versus 4,2%), *iucA* (76,9% versus 38,6%) e *pet* (92,3% versus 41,3%); (ii) 100% das amostras CLA foram positivas para o teste de formação de película e (iii) nenhuma amostra CLA formou biofilme. A ausência de capacidade de formação de biofilme e habilidade de formar película sugere que mecanismos diferentes estejam relacionados à formação de cada um deles. Embora o número de amostra CLA tenha sido limitado, aparentemente, apresentaram características menos heterogêneas entre si do que as do padrão AA, quando se considera os fatores genotípicos e fenotípicos investigados.

6.7. Combinações de genes nas amostras de EAEC

A análise das combinações de genes de cada amostra evidenciou uma quantidade maior de genes associados às EAEC pAA+ e às EAEC biofilme+, sugerindo que essas amostras seriam mais virulentas, conforme anteriormente sugerido por outros pesquisadores (Okeke et al., 2000; Jiang et al., 2002; Sarantuya et al., 2004; Huang et al., 2007).

Todas as 189 amostras de EAEC foram positivas para pelo menos um dos genes pesquisados, formando 89 combinações possíveis com até 12 genes por amostra, evidenciando a heterogeneidade das amostras de EAEC da área geográfica pesquisada, característica marcante descrita para este patotipo em diversos países, inclusive no Brasil (Czeczulin et al., 1999; Okeke et al., 2000; Vila et al., 2000; Bouzari et al., 2001; Elias et al., 2002; Huang et al., 2003, 2007; Kahali et al., 2004; Sarantuya et al., 2004; Zamboni et al., 2004; Moon et al., 2005; Araujo et al., 2007; Boisen et al., 2008; Mendez-Arancibia et al., 2008; Regua-Mangia et al., 2009; Aslani et al., 2011).

6.8. Considerações finais

A identificação de EAEC não é simples e é agravada pela ausência de um fator de virulência que seja marcador para todas as amostras, o que dificulta a utilização de técnicas de biologia molecular na pesquisa desse patotipo. E, além disso, em diversos outros estudos, algumas das amostras não apresentam nenhum dos marcadores de virulência pesquisados (Gioppo et al., 2000; Vila et al., 2000; Jiang et al., 2002; Elias et al., 2002; Kahali et al., 2004; Sarantuya et al., 2004; Huang et al., 2007; Mendez-Arancibia et al., 2008; Aslani et al., 2011).

Este estudo destaca a heterogeneidade da EAEC tanto pelos marcadores de virulência plasmidiais e cromossômicos, como por fatores fenotípicos como formação de biofilme e película. A heterogeneidade de genes entre as amostras pode ser justificada pelo fato de muitos dos marcadores normalmente pesquisados serem de origem plasmidial, o qual pode ser perdido ou adquirido lateralmente, favorecendo uma variedade de perfis genotípicos, conforme descrito por Czczulin et al. (1999) e Regua-Mangia et al. (2009).

Apesar da heterogeneidade de genes plasmidiais e cromossômicos descritos em amostras de EAEC, alguns autores mostram um grupo de patógenos com perfil particular de marcadores genéticos e fenotípicos capazes de tornar o isolado mais virulento (Okeke et al., 2000; Jiang et al., 2002; Elias et al., 2002; Sarantuya et al., 2004; Huang et al., 2007; Regua-Mangia et al., 2009). No presente estudo, destacam-se algumas subpopulações associadas estatisticamente a amostras de crianças com diarreia e consideradas mais virulentas: (i) EAEC *agn43+*, (ii) EAEC atípica *aap+* e/ou *agn43+* e (iii) EAEC pAA- *chuA+*. Embora a detecção do gene não condiga necessariamente com a expressão da proteína, a sua presença pelo menos, aparentemente, sugere amostras mais virulentas.

Considerando os resultados obtidos no presente estudo e dados da literatura mundial, pode ser inferido que os fatores associados com a virulência nas EAEC são ainda poucos entendidos, provavelmente por ser multifatorial e/ou depender da regulação de moléculas sinalizadoras (*quorum sensing*) ou até mesmo de características do próprio hospedeiro.

7. CONCLUSÃO

1. Foi observada uma grande heterogeneidade genotípica das amostras de EAEC;
2. Os genes relacionados à síntese de adesinas AAF/I, AAF/II e AAF/III foram encontrados em baixíssima frequência;
3. A EAEC típica, caracterizada pela presença do gene *aggR*, foi encontrada em baixa frequência na população estudada;
4. O gene *pet*, dentre os que codificam toxinas, foi o mais prevalente nas amostras e está entre as maiores taxas descritas para EAEC;
5. Presença dos genes plasmidiais *aggR*, *aap*, *pet* e *shf* em amostras de EAEC pAA-;
6. EAEC *agn43+*, EAEC pAA-/chuA+ e EAEC atípica *aap+* e/ou *agn43+* constituem subpopulações que foram estatisticamente relacionadas a crianças com diarreia;
7. A formação de biofilme não foi uma característica comum às amostras de EAEC analisadas enquanto a formação de película foi uma característica comum;
8. Os genes relacionados com o fenótipo formador de biofilme *aap*, *agg-3A*, *aggR* e *shf* foram estatisticamente associados às amostras de EAEC formadoras de biofilme;
9. Os genes *aap*, *aggR* e *iucA* foram estatisticamente associados às amostras de EAEC formadoras de película;
10. As amostras de EAEC formadoras de biofilme estiveram igualmente distribuídas entre as crianças com e sem diarreia;
11. A formação de biofilme não foi associada com a formação de película;
12. O gene plasmidial *pet* foi encontrado em altíssima frequência nas amostras de *E. coli* com padrão CLA;
13. Amostras de *E. coli* com padrão CLA são muito distintas das amostras de EAEC na população estudada, considerando os genes presentes, a formação de biofilme e de película.

REFERÊNCIAS

- ADACHI, J.A.; JIANG, Z.D.; MATHEWSON, J.J.; VERENKAR, M.P.; THOMPSON, S.; MARTINEZ-SANDOVAL, F.; STEFFEN, R.; ERICSSON, C.D.; DUPONT, H.L. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, n. 12, p. 1706-1709, 2001.
- ALBERT, M.J.; FARUQUE, A.S.; FARUQUE, S.M.; SACK, R.B.; MAHALANABIS, D. Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n.11, p.3458-3464, 1999.
- ALBERT, M.J.; QADRI, F.; HAQUE, A.; BHUIYAN, N.A. Bacterial clump formation at the surface of liquid culture as a rapid test for identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 5, p. 1397-1399, 1993.
- ALVES, J. R.; PEREIRA, M.C.; SOUZA, S.B.; COSTA, A.S.; PINTO, A.S.; MATTOS-GUARALDI, A.L.; HIRATA-JÚNIOR, R. ROSA, A.C.P.; ASAD, L.M.B.O. Iron-limited condition modulates biofilm formation and interaction with human epithelial cells of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). **J. App. Microbiol.**, v. 108, 2009.
- ANDERSON, G.G.; PALERMO, J.J.; SCHILLING, J.D.; ROTH, R.; HEUSER, J.; HULTGREN, S.J. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. **Science.**, v. 301, n. 5629, p. 105-107, 2003.
- ARANDA, K.R.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I.C. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 12, p. 5849-5853, 2004.
- ARAUJO, J.M.; TABARELLI, G.F.; ARANDA, K.R.; FABBRICOTTI, S.H.; FAGUNDES-NETO, U.; MENDES, C.M.; SCALETSKY, I.C. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 10, p. 3396-3399, 2007.
- ASLANI, M.M.; ALIKHANI, M.Y.; ZAVARI, A.; YOUSEFI, R.; ZAMANI, A.R. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 15, n. 2, p. 136-139, 2011.
- BARDHAN, P.K.; ALBERT, M.J.; ALAM, N.H.; FARUQUE, S.M.; NEOGI, P.K.; Mahalanabis, D. Small bowel and fecal microbiology in children suffering from persistent diarrhea in Bangladesh. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 26, n. 1, p. 9-15, 1998.
- BAUDRY, B.; SAVARINO, S.J.; VIAL, P.; KAPER, J.B.; LEVINE, M.M. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. **J. Infect. Dis.**, v. 161, n. 6, p. 1249-1251, 1990.
- BELOIN, C.; ROUX, A.; GHIGO, J.M. *Escherichia coli* biofilms. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 322, p. 249-289, 2008.
- BELOIN, C.; VALLE, J.; LATOUR-LAMBERT, P.; FAURE, P.; KZREMINSKI, M.; BALESTRINO, D.; HAAGENSEN, J.A.; MOLIN, S.; PRENSIER, G.; ARBEILLE, B.; GHIGO, J.M. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. **Mol. Microbiol.**, v. 51, n. 3, p. 659-674, 2004.

- BERN, C.; MARTINES, J.; ZOYSA, I.; GLASS, R.I. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. **Bull World Health Organ**, v. 70, n. 6, p.705-714, 1992.
- BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 8, p. 4302-4311, 2002.
- BHAKDI, S.; GREULICH, S.; MUHLY, M.; EBERSPÄCHER, B.; BECKER, H.; THIELE, A.; HUGO, F. Potent leukocidal action of *Escherichia coli* hemolysin mediated by permeabilization of target cell membranes. **J. Exp. Med.**, v. 169, n. 3, p. 737-754, 1989.
- BHAN, M.K.; RAJ, P.; LEVINE, M.M.; KAPER, J.B.; BHANDARI, N.; SRIVASTAVA, R.; KUMAR, R.; SAZAWAL, S. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. **J. Infect. Dis.**, v. 159, n. 6, p. 1061-1064, 1989.
- BHARDWAJ, R.; MAJUMDAR, S.; GANGULY, N.K.; TANEJA, N.; DUTTA, S.; RAMAMURTHY, T.; CHAKRABORTI, A. Characterization of adhesin variants in Indian isolates of enteroaggregative *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 258, n. 2, p. 274-283, 2006.
- BIELASZEWSKA, M.; MELLMANN, A.; ZHANG, W.; KÖCK, R.; FRUTH, A.; BAUWENS, A.; PETERS, G.; KARCH, H. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. **Lancet. Infect. Dis.** v. 11, n. 9, p. 671-676, 2011.
- BILGE, S.S.; CLAUSEN, C.R.; LAU, W.; MOSELEY, S.L. Molecular characterization of a fimbrial adhesion, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 4281-4289, 1989.
- BOISEN, N.; STRUVE, C.; SCHEUTZ, F.; KROGFELT, K.A.; NATARO, J.P. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 7), p. 281-292, 2008.
- BOISEN, N.; RUIZ-PEREZ, F.; SCHEUTZ, F.; KROGFELT, K.A.; NATARO, J.P. Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, n. 2, p. 294-301, 2009.
- BOISEN, N.; SCHEUTZ, F.; RASKO, D.A.; REDMAN, J.C.; PERSSON, S.; SIMON, J.; KOTLOFF, K.L.; LEVINE, M.M.; SOW, S.; TAMBOURA, B.; TOURE, A.; MALLE, D.; PANCHALINGAM, S.; KROGFELT, K.A.; NATARO, J.P. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali. **J. Infect. Dis.**, v. 205, n. 3, p. 431-444, 2012.
- BOUZARI, S.; JAFARI, A.; AZIZI, A.; OLOOMI, M.; NATARO, J.P. Short report: characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from Iranian children. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 1, p. 13-14, 2001.
- BRITO, B.G.; VIDOTTO, M.C.; BERBEL, M. M.; TAGLIARI, K. C. Fatores de virulência presentes em amostras de *Escherichia coli* uropatogênicas – UPEC para suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p.645-652, 2004.
- BUERIS, V.; SIRCILI, M.P.; TADDEI, C.R.; 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, 2007.

- CANIZALEZ-ROMAN, A.; NAVARRO-GARCÍA, F. Fodrin CaM-binding domain cleavage by Pet from enteroaggregative *Escherichia coli* leads to actin cytoskeletal disruption. **Mol. Microbiol.**, v. 48, n. 4, p. 947-958, 2003.
- CENNIMO, D.J.; KOO, H.; MOHAMED, J.A.; HUANG, D.B.; CHIANG, T. Enteroaggregative *Escherichia coli*: A review of trends, diagnosis, and treatment. **Infections in Medicine**, v.24, p. 100-110, 2007.
- CHAUDHURI, R.R.; SEBAIHIA, M.; HOBMAN, J.L.; WEBBER, M.A.; LEYTON, D.L.; GOLDBERG, M.D.; CUNNINGHAM, A.F.; SCOTT-TUCKER, A.; FERGUSON, P.R.; THOMAS, C.M.; FRANKEL, G.; TANG, C.M.; DUDLEY, E.G.; ROBERTS, I.S.; RASKO, D.A.; PALLAN, M.J.; PARKHILL, J.; NATARO, J.P.; THOMSON, N.R. HENDERSON, I.R. Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. **PLoS One.**, v. 5, n. 1, 2010.
- 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, 1996.
- COOKSON, S.T.; NATARO, J.P. Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli*. **Microb. Pathog.**, v. 21, n. 6, p. 421-434, 1996.
- COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science.**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.
- CROXEN, M.A.; FINLAY, B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, n.1, p.26-38, 2010.
- 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. 4135-4145, 1997.
- CZECZULIN, J.R.; WHITTAM, T.S.; HENDERSON, I.R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J.P. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 6, p. 2692-2699, 1999.
- DANESE, P.N.; PRATT, L.A.; DOVE, S.L.; KOLTER, R. The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. **Mol. Microbiol.**, v. 37, n. 2, p. 424-432, 2000.
- DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.
- DIDERICHSEN, B. flu, a metastable gene controlling surface properties of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 141, n.2, p. 858-867, 1980.
- DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.
- DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.
- DUDLEY, E.G.; THOMSON, N.R.; PARKHILL, J.; MORIN, N.P.; NATARO, J.P. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU

pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 61, n. 5, p. 1267-1282, 2006a.

Dudley, E.G.; Abe, C.; Ghigo, J.M.; Latour-Lambert, P.; Hormazabal, J.C.; Nataro, J.P.. An IncII plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. **Infect. Immun.** v.74, n. 4, p. 2102-2114, 2006b.

DULGUER, M.V.; FABBRICOTTI, S.H.; BANDO, S.Y.; MOREIRA-FILHO, C.A.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETISKY, 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, 2003.

DUNNE, W.M. JR. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002.

ELIAS, W.P. JR.; CZECZULIN, J.R.; HENDERSON, I.R.; TRABULSI, L.R.; NATARO, J.P. Organization of biogenesis genes for aggregative adherence fimbria II defines a virulence gene cluster in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 6, p. 1779-1785, 1999.

ELIAS, W.P.; UBER, A.P.; TOMITA, S.K.; TRABULSI, L.R.; GOMES, T.A. Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhoea. **Epidemiol. Infect.**, v. 129, n.1, p. 49-55, 2002.

ESLAVA, C.; NAVARRO-GARCÍA, F.; CZECZULIN, J.R.; HENDERSON, I.R.; CRAVIOTO, A.; NATARO, J.P. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 7, p. 3155-3163, 1998.

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, 1995.

FARFAN, M.J.; INMAN, K.G.; NATARO, J.P. The major pilin subunit of the AAF/II fimbriae from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates binding to extracellular matrix proteins. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 10, p. 4378-4384, 2008.

FASANO, A.; NORIEGA, F.R.; MANEVAL, D.R.JR.; CHANASONGCRAM, S.; RUSSELL, R.; GUANDALINI, S.; LEVINE, M.M. Shigella enterotoxin 1: an enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a active in rabbit small intestine in vivo and in vitro. **J. Clin. Invest.**, v. 95, n. 6, p. 2853-2861, 1995.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.

FLORES, J.; OKHUYSEN, P.C. Enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 25, n. 1, p. 8-11, 2009.

FUJIYAMA, R.; NISHI, J.; IMUTA, N.; TOKUDA, K.; MANAGO, K.; KAWANO, Y. The shf gene of a *Shigella flexneri* homologue on the virulent plasmid pAA2 of enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation. **Curr. Microbiol.**, v. 56, n. 5, p. 474-480, 2008.

GASCÓN, J.; VARGAS, M.; QUINTÓ, L.; CORACHÁN, M.; JIMENEZ DE ANTA, M.T.; VILA, J. Enteroaggregative *Escherichia coli* strains as a cause of traveler's diarrhea: a case-control study. **J. Infect. Dis.**, v. 177, n. 5, p. 1409-1412, 1998.

- GASSAMA-SOW, A.; SOW, P.S.; GUÈYE, M.; GUÈYE-N'DIAYE, A.; PERRET, J.L.; M'BOUP, S.; AÏDARA-KANE, A. Characterization of pathogenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus-related diarrhea in Senegal. **J. Infect. Dis.**, v.189, n. 1, p. 75-78, 2004.
- GIOPPO, N.M.; ELIAS, W.P. JR.; 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 diarrhoea, in Londrina, Brazil. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 190, n.2, p. 293-298, 2000.
- GIRÓN, J.A.; HO, A.S.; SCHOOLNIK, G.K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science.**, v. 254, n. 5032, p.710-713, 1991.
- GOLLER, C.C.; SEED, P.C. Revisiting the *Escherichia coli* polysaccharide capsule as a virulence factor during urinary tract infection: contribution to intracellular biofilm development. **Virulence.**, v. 1, n. 4, p. 333-337, 2010.
- 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. ET AL. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 164, n.2, p. 331-337, 1991.
- GOMES, T.A.; ABE, C.M.; MARQUES, L.R. Detection of HeLa cell-detaching activity and alpha-hemolysin production in enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from feces of Brazilian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 12, p. 3364, 1995.
- GONZÁLEZ, R.; DÍAZ, C.; MARIÑO, M.; CLORALT, R.; PEQUENEZE, M.; PÉREZ-SCHAEL, I. Age-specific prevalence of *Escherichia coli* with localized and aggregative adherence in Venezuelan infants with acute diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 5, p. 1103-1107, 1997.
- GUIGNOT, J.; BREARD, J.; BERNET-CAMARD, M.F.; PEIFFER, I.; NOWICKI, B.J.; SERVIN, A.L.; BLANC-POTARD, A.B. Pyelonephritogenic diffusely adhering *Escherichia coli* EC7372 harboring Dr-II adhesin carries classical uropathogenic virulence genes and promotes cell lysis and apoptosis in polarized epithelial caco-2/TC7 cells. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 12, p. 7018-7027, 2000.
- GUNZBURG, S.T.; CHANG, B.J.; ELLIOTT, S.J.; BURKE, V.; GRACEY, M. Diffuse and enteroaggregative patterns of adherence of enteric *Escherichia coli* isolated from aboriginal children from the Kimberley region of Western Australia. **J. Infect. Dis.**, v. 167, n. 3, p. 755-758, 1993.
- GUTH, B.E. Enterotoxigenic *Escherichia coli*--an overview. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 95, p. 95-97, 2000.
- GUYER, D.M.; HENDERSON, I.R.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 38, n. 1, p. 53-66, 2000.
- HACKER, J.; KESTLER, H.; HOSCHÜTZKY, H.; JANN, K.; LOTTSPEICH, F.; KORHONEN, T.K. Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an *Escherichia coli* O18:K1 meningitis isolate. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 2, p. 544-550, 1993.
- HARADA, T.; HIROI, M.; KAWAMORI, F.; FURUSAWA, A.; OHATA, K.; SUGIYAMA, K.; MASUDA, T. A food poisoning diarrhea outbreak caused by enteroaggregative

- Escherichia coli serogroup O126:H27 in Shizuoka, Japan. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 60, n. 2-3, p. 154-155, 2007.
- HARRINGTON, S.M.; DUDLEY, E.G.; NATARO, J.P. Pathogenesis of enteroaggregative Escherichia coli infection. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 54, n. 1, p. 12-18, 2006.
- HASMAN, H.; CHAKRABORTY, T.; KLEMM, P. Antigen-43-mediated autoaggregation of Escherichia coli is blocked by fimbriation. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 16, p. 4834-4841, 1999.
- HEILMANN, C.; SCHWEITZER, O.; GERKE, C.; VANITTANAKOM, N.; MACK, D.; GÖTZ, F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming Staphylococcus epidermidis. **Mol. Microbiol.**, v. 20, n. 5, p. 1083-1091, 1996.
- HENDERSON, I.R.; MEEHAN, M.; OWEN, P. Antigen 43, a phase-variable bipartite outer membrane protein, determines colony morphology and autoaggregation in Escherichia coli K-12. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 149, n. 1, p. 115-120, 1997.
- HENDERSON, I.R.; CZECHULIN, J.; ESLAVA, C.; NORIEGA, F.; NATARO, J.P. Characterization of pic, a secreted protease of Shigella flexneri and enteroaggregative Escherichia coli. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 11, p. 5587-5596, 1999.
- HUANG, D.B.; JIANG, Z.D.; DUPONT, H.L. Association of virulence factor-positive and -negative enteroaggregative Escherichia coli and occurrence of clinical illness in travelers from the United States to Mexico. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 69, n. 5, p. 506-508, 2003.
- HUANG, D.B.; DUPONT, H.L. Enteroaggregative Escherichia coli: an emerging pathogen in children. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 15, n. 4, p. 266-271, 2004.
- HUANG, D.B.; NATARO, J.P.; DUPONT, H.L.; KAMAT, P.P.; MHATRE, A.D.; OKHUUSEN, P.C.; CHIANG, T. Enteroaggregative Escherichia coli is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, n. 5, p. 556-563, 2006.
- HUANG, D.B.; MOHAMED, J.A.; NATARO, J.P.; DUPONT, H.L.; JIANG, Z.D.; OKHUUSEN, P.C. Virulence characteristics and the molecular epidemiology of enteroaggregative Escherichia coli isolates from travellers to developing countries. **J. Med. Microbiol.** v. 56, n. 10, p. 1386-1392, 2007.
- ITOH, Y.; NAGANO, I.; KUNISHIMA, M.; EZAKI, T. Laboratory investigation of enteroaggregative Escherichia coli O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 10, p. 2546-2550, 1997.
- IWANAGA, M.; SONG, T.; HIGA, N.; KAKINOHANA, S.; TOMA, C.; NAKASONE, N. Enteroaggregative Escherichia coli: incidence in Japan and usefulness of the clump-formation test. **J. Infect. Chemother.**, v. 8, n. 4, p. 345-348, 2002.
- JENKINS, C.; CHART, H.; WILLSHAW, G.A.; CHEASTY, T.; TOMPKINS, D.S. Association of putative pathogenicity genes with adherence characteristics and fimbrial genotypes in typical enteroaggregative Escherichia coli from patients with and without diarrhoea in the United Kingdom. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 26, n. 12, p. 901-906, 2007.
- JIANG, Z.D.; GREENBERG, D.; NATARO, J.P.; STEFFEN, R.; DUPONT, H.L. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative Escherichia coli virulence factors in international travelers. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 11, p. 4185-4190, 2002.
- JOHNSON, J.R. Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4, n. 1, p. 80-128, 1991.

- JUSTICE, S.S.; HUNG, C.; THERIOT, J.A.; FLETCHER, D.A.; ANDERSON, G.G.; FOOTER, M.J.; HULTGREN, S.J. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 101, n. 5, p. 1333-8, 2004.
- KAHALI, S.; SARKAR, B.; RAJENDRAN, K.; KHANAM, J.; YAMASAKI, S.; NANDY, R.K.; BHATTACHARYA, S.K.; RAMAMURTHY, T. Virulence characteristics and molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 9, p. 4111-4120, 2004.
- KANG, G.; MATHAN, M.M.; MATHAN, V.I. Evaluation of a simplified HEp-2 cell adherence assay for *Escherichia coli* isolated from south Indian children with acute diarrhea and controls. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 8, p. 2204-2205, 1995.
- KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, n.2, p. 123-140, 2004.
- KARMALI, M.A.; STEELE, B.T.; PETRIC, M.; LIM, C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. **Lancet**. V. 1, n. 8325, p. 619-620, 1983.
- KJAERGAARD, K.; SCHEMBRI, M.A.; HASMAN, H.; KLEMM, P. Antigen 43 from *Escherichia coli* induces inter- and intraspecies cell aggregation and changes in colony morphology of *Pseudomonas fluorescens*. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 17, p. 4789-4796, 2000.
- KORHONEN, T.K.; VÄISÄNEN-RHEN, V.; RHEN, M.; PERE, A.; PARKKINEN, J.; FINNE, J. *Escherichia coli* fimbriae recognizing sialyl galactosides. **J. Bacteriol.**, v. 159, n. 2, p. 762-766, 1984.
- LE BOUGUENEC, C.; ARCHAMBAUD, M.; LABIGNE, A. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, n. 5, p. 1189-1193, 1992.
- LOPES, L.M.; FABBRICOTTI, S.H.; FERREIRA, A.J.; KATO, M.A.; MICHALSKI, J.; SCALETISKY, I.C. Heterogeneity among strains of diffusely adherent *Escherichia coli* isolated in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n.4, p. 1968-1972, 2005.
- LORENZO, V.; NEILANDS, J.B. Characterization of *iucA* and *iucC* genes of the aerobactin system of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 167, n. 1, p. 350-355, 1986.
- LUNA, M.G.; SCOTT-TUCKER, A.; DESVAUX, M.; FERGUSON, P.; MORIN, N.P.; DUDLEY, E.G.; TURNER, S.; NATARO, J.P.; OWEN, P.; HENDERSON, I.R. The *Escherichia coli* biofilm-promoting protein Antigen 43 does not contribute to intestinal colonization. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 284, n. 2, p. 237-246, 2008.
- LUND, B.; MARKLUND, B.I.; STRÖMBERG, N.; LINDBERG, F.; KARLSSON, K.A.; NORMARK, S. Uropathogenic *Escherichia coli* can express serologically identical pili of different receptor binding specificities. **Mol. Microbiol.**, v. 2, n. 2, p. 255-263, 1988.
- MARONCLE, N.M.; SIVICK, K.E.; BRADY, R.; STOKES, F.E.; MOBLEY, H.L. Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 11, p. 6124-6134, 2006.
- MARQUES, L.R.; ABE, C.M.; GRIFFIN, P.M.; GOMES, T.A. Association between alpha-hemolysin production and HeLa cell-detaching activity in fecal isolates of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 10, p. 2707-2709, 1995.

- 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, 1995.
- MENDEZ-ARANCIBIA, E.; VARGAS, M.; SOTO, S.; RUIZ, J.; KAHIGWA, E.; SCHELLENBERG, D.; URASSA, H.; GASCÓN, J.; VILA, J. Prevalence of different virulence factors and biofilm production in enteroaggregative *Escherichia coli* isolates causing diarrhea in children in Ifakara (Tanzania). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, n. 6, p. 985-989, 2008.
- MIQDADY, M.S.; JIANG, Z.D.; NATARO, J.P.; DUPONT, H.L. Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* with formalin-preserved HEp-2 cells. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 8, p. 3066-3067, 2002.
- MOBLEY, H.L.; GREEN, D.M.; TRIFILLIS, A.L.; JOHNSON, D.E.; CHIPPENDALE, G.R.; LOCKATELL, C.V.; JONES, B.D.; WARREN, J.W. Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. **Infect. Immun.**, v. 58, n. 5, p. 1281-1289, 1990.
- MOHAMED, J.A.; HUANG, D.B.; JIANG, Z.D.; DUPONT, H.L.; NATARO, J.P.; BELKIND-GERSON, J. OKHUYSEN, P.C. Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 1, p. 121-126, 2007.
- MOON, J.Y.; PARK, J.H.; KIM, Y.B. Molecular epidemiological characteristics of virulence factors on enteroaggregative *E. coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 253, n. 2, p. 215-220, 2005.
- MORENO, A.C.; FILHO, A.F.; GOMES, T.A.; RAMOS, S.T.; MONTEMOR, L.P.; TAVARES, V.C.; FILHO, L.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, 2010.
- MORIN, N.; TIRLING, C.; IVISON, S.M.; KAUR, A.P.; NATARO, J.P.; STEINER, T.S. Autoactivation of the AggR regulator of enteroaggregative *Escherichia coli* in vitro and in vivo. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 58, n. 3, p. 344-355, 2010.
- MOSS, J.E.; ALIPRANTIS, A.O.; ZYCHLINSKY, A. The regulation of apoptosis by microbial pathogens. **Int. Rev. Cytol.**, v. 187, p. 203-259, 1999.
- NATARO, J.P.; SCALETSKY, I.C.; KAPER, J.B.; LEVINE, M.M.; TRABULSI, L.R. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 48, n. 2, p. 378-383, 1985.
- 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, 1987.
- NATARO, J.P.; DENG, Y.; MANEVAL, D.R.; GERMAN, A.L.; MARTIN, W.C.; LEVINE, M.M. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 6, p. 2297-2304, 1992.
- 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, 1994.

- NATARO, J.P.; DENG, Y.; COOKSON, S.; CRAVIOTO, A.; SAVARINO, S.J.; GUERS, L.D.; LEVINE, M.M.; TACKET, C.O. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. **J Infect Dis.**, v. 171, n. 2, p. 465-468, 1995a.
- NATARO, J.P.; SERIWATANA, J.; FASANO, A.; MANEVAL, D.R.; GUERS, L.D.; NORIEGA, F.; DUBOVSKY, F.; LEVINE, M.M.; MORRIS, J.G. JR. Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 12, p. 4721-4728, 1995b.
- NATARO, J.P.; HICKS, S.; PHILLIPS, A.D.; VIAL, P.A.; SEARS, C.L. T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 11, p. 4761-4768, 1996.
- NATARO, J.P.; KAPER, J.B. **Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n.1, p. 142-201, 1998.
- NATARO, J.P.; STEINER, T.; GUERRANT, R.L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 4, n. 2, p. 251-61, 1998.
- NATARO, J.P.; MAI, V.; JOHNSON, J.; BLACKWELDER, W.C.; HEIMER, R.; TIRRELL, S.; EDBERG, S.C.; BRADEN, C.R.; GLENN MORRIS, J. JR.; HIRSHON, J.M. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, n. 4, p. 402-407, 2006.
- NATARO, J.P.; YIKANG, D.; GIRON, J.A.; SAVARINO, S.J.; KOTHARY, M.H.; HALL, R. Aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 3, p. 1126-1131, 1993.
- NAVARRO-GARCÍA, F.; ESLAVA, C.; VILLASECA, J.M.; LÓPEZ-REVILLA, R.; CZECZULIN, J.R.; SRINIVAS, S.; NATARO, J.P.; CRAVIOTO, A. In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun.**, v. 66, n. 7, p. 3149-3154, 1998.
- NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W.P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. **Gut Microbes.**, v. 2, n. 1, p. 13-24, 2011.
- NAVES, P.; DEL PRADO, G.; HUELVES, L.; GRACIA, M.; RUIZ, V.; BLANCO, J.; RODRÍGUEZ-CERRATO, V.; PONTE, M.C.; SORIANO, F. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. **J. Appl. Microbiol.**, v. 105, n. 2, p. 585-590, 2008.
- NGUYEN, T.V.; LE VAN, P.; LE HUY, C.; GIA, K.N.; WEINTRAUB, A. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 2, p. 755-760, 2005.
- NISHI, J.; SHEIKH, J.; MIZUGUCHI, K.; LUISI, B.; BURLAND, V.; BOUTIN, A.; ROSE, D.J.; BLATTNER, F.R.; NATARO, J.P. The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP-binding cassette transporter system. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 46, p. 45680-45689, 2003.
- OKEKE, I.N.; LAMIKANRA, A.; CZECZULIN, J.; DUBOVSKY, F.; KAPER, J.B.; NATARO, J.P. Heterogeneous virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children in Southwest Nigeria. **J. Infect. Dis.**, v. 181, n. 1, p. 252-260, 2000a.
- OKEKE, I.N.; LAMIKANRA, A.; STEINRÜCK, H.; KAPER, J.B. Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood diarrhea in provincial southwestern Nigeria. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 1, p. 7-12, Jan., 2000b.

- OKEKE, I.N.; NATARO, J.P. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Lancet Infect. Dis.**, v. 1, n.5, p. 304-313, 2001.
- OKEKE, I.N.; SCALETSKY, I.C.; SOARS, E.H.; MACFARLANE, L.R.; TORRES, A.G. Molecular epidemiology of the iron utilization genes of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 1, p. 36-44, 2004.
- OKEKE, I.N. Diarrheagenic *Escherichia coli* in sub-Saharan Africa: status, uncertainties and necessities. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 3, n. 11, p. 817-842, 2009.
- ONG, C.L.; ULETT, G.C.; MABBETT, A.N.; BEATSON, S.A.; WEBB, R.I.; MONAGHAN, W.; NIMMO, G.R.; LOOKE, D.F.; MCEWAN, A.G.; SCHEMBRI, M.A. Identification of type 3 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in biofilm formation. **J. Bacteriol.**, v. 190, n. 3, p. 1054-1063, 2008.
- OWEN, P.; MEEHAN, M.; LOUGHRY-DOHERTY, H.; HENDERSON, I. Phase-variable outer membrane proteins in *Escherichia coli*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 16, n. 2, p. 63-76, 1996.
- PABST, W.L.; ALTWEGG, M.; KIND, C.; MIRJANIC, S.; HARDEGGER, D.; NADAL, D. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* among children with and without diarrhea in Switzerland. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 6, p. 2289-2293, 2003.
- PAI, M.; KANG, G.; RAMAKRISHNA, B.S.; VENKATARAMAN, A.; MULIYIL, J. An epidemic of diarrhoea in south India caused by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Indian. J. Med. Res.**, v. 106, p. 7-12, 1997.
- PIVA, I.C.; PEREIRA, A.L.; FERRAZ, L.R.; SILVA, R.S.; VIEIRA, A.C.; BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; GIUGLIANO, L.G. Virulence markers of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children and adults with diarrhea in Brasília, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 5, p. 1827-1832, 2003.
- 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, 2005.
- RATLEDGE, C.; DOVER, L.G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 54, p. 881-941, 2000.
- REGUA-MANGIA, A.H.; GOMES, T.A.; VIEIRA, M.A.; IRINO, K.; TEIXEIRA, L.M. Molecular typing and virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro city, Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v. 58, p. 414-422, 2009.
- REN, D.; BEDZYK, L.A.; THOMAS, S.M.; YE, R.W.; WOOD, T.K. Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 64, n. 4, p. 515-524, 2004.
- RESTIERI, C.; GARRISS, G.; LOCAS, M.C.; DOZOIS, C.M. Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, n. 5, p. 1553-1562, 2007.
- RICH, C.; FAVRE-BONTE, S.; SAPENA, F.; JOLY, B.; FORESTIER, C. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 173, n. 1, p. 55-61, 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, 1983.
- ROCHE, A.; MCFADDEN, J.; OWEN, P. Antigen 43, the major phase-variable protein of the *Escherichia coli* outer membrane, can exist as a family of proteins encoded by multiple alleles. **Microbiology.**, v. 147, p. 161-169, 2001.
- ROHDE, H.; QIN, J.; CUI, Y.; LI, D.; LOMAN, N.J.; HENTSCHKE, M. et al. Open-source genomic analysis of Shiga-toxin-producing *E. coli* O104:H4. **N. Engl. J. Med.**, v. 365, n. 8, p. 718-724, 2011.
- RUIZ, J.; NAVIA, M.M.; VILA, J.; GASCÓN, J. Prevalence of the Sat gene among clinical isolates of *Shigella* spp. causing travelers' diarrhea: geographical and specific differences. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 4, p. 1565-1566, 2002.
- RÜTTLER, M.E.; YANZÓN, C.S.; CUITIÑO, M.J.; RENNA, N.F.; PIZARRO, M.A.; ORTIZ, A.M. Evaluation of a multiplex PCR method to detect enteroaggregative *Escherichia coli*. **Biocell.**, v. 30, n.2, p. 301-308, 2006.
- SARANTUYA, J.; NISHI, J.; WAKIMOTO, N.; ERDENE, S.; NATARO, J.P.; SHEIKH, J.; IWASHITA, M.; MANAGO, K.; TOKUDA, K.; YOSHINAGA, M.; MIYATA, K.; KAWANO, Y. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 1, p. 133-139, 2004.
- SAVARINO, S.J.; FASANO, A.; ROBERTSON, D.C.; LEVINE, M.M. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. **J. Clin. Invest.**, v. 87, n. 4, p. 1450-1455, 1991.
- SAVARINO, S.J.; FASANO, A.; WATSON, J.; MARTIN, B.M.; LEVINE, M.M.; GUANDALINI, S.; GUERRY, P. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 90, n. 7, p. 3093-3097, 1993.
- SAVARINO, S.J.; FOX, P.; DENG, Y.; NATARO, J.P. Identification and characterization of a gene cluster mediating enteroaggregative *Escherichia coli* aggregative adherence fimbria I biogenesis. **J. Bacteriol.**, v. 176, n. 16, p. 4949-4957, 1994.
- SAVARINO, S.J.; MCVEIGH, A.; WATSON, J.; CRAVIOTO, A.; MOLINA, J.; ECHEVERRIA, P.; BHAN, M.K.; LEVINE, M.M.; FASANO, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 173, n. 4, p. 1019-1022, 1996.
- SCALETSKY, 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, 1984.
- SCALETSKY, 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, 2002.
- SCHEMBRI, M.A.; KJAERGAARD, K.; KLEMM, P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. **Mol. Microbiol.**, v. 48, n.1, p. 253-267, 2003.
- SCHEUTZ, F.; NIELSEN, E.M.; FRIMODT-MØLLER, J.; BOISEN, N.; MORABITO, S.; TOZZOLI, R.; NATARO, J.P.; CAPRIOLI, A. Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of

haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. **Euro. Surveill.**, v. 16, n. 24, 2011.

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

SCHUBERT, S.; RAKIN, A.; KARCH, H.; CARNIEL, E.; HEESEMAN, J. Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 2, p. 480-485, 1998.

SHAH, N.; DUPONT, H.L.; RAMSEY, D.J. Global etiology of travelers' diarrhea: systematic review from 1973 to the present. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, n. 4, p. 609-614, 2009.

SHEIKH, J.; HICKS, S.; DALL'AGNOL, M.; PHILLIPS, A.D.; NATARO, J.P. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 41, n. 5, p. 983-997, 2001.

SHEIKH, J.; CZECZULIN, J.R.; HARRINGTON, S.; HICKS, S.; HENDERSON, I.R.; LE BOUGUÉNEC, C.; GOUNON, P.; PHILLIPS, A.; NATARO, J.P. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Invest.**, v. 110, n.9, p. 1329-1337, 2002.

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, p. 359-363, 2008.

STEINER, T.S.; LIMA, A.A.; NATARO, J.P.; GUERRANT, R.L. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. **J. Infect. Dis.**, v. 177, n. 1, p. 88-96, 1998.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIĆ, S.; CIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS.**, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.

SUH, J.D.; RAMAKRISHNAN, V.; PALMER, J.N. Biofilms. **Otolaryngol. Clin. North. Am.**, v. 43, n. 3, p. 521-530, 2010.

SUZART, S.; GUTH, B.E.; PEDROSO, M.Z.; OKAFOR, U.M.; GOMES, T.A. Diversity of surface structures and virulence genetic markers among enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains with and without the EAEC DNA probe sequence. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 201, n. 2, p. 163-168, 2001.

TOBE, T.; HAYASHI, T.; HAN, C.G.; SCHOOLNIK, G.K.; OHTSUBO, E.; SASAKAWA, C. Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 10, p. 5455-5462, 1999.

TOKUDA, K.; NISHI, J.; IMUTA, N.; FUJIYAMA, R.; KAMENOSONO, A.; MANAGO, K.; KAWANO, Y. Characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: biofilm formation and acid resistance. **Microbiol. Immunol.**, v. 54, n. 6, p. 320-329, 2010.

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, 2003.

- TORRES, A.G.; PAYNE, S.M. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Mol. Microbiol.**, v. 23, n. 4, p. 825-833, 1997.
- TORRES, A.G.; ZHOU, X.; KAPER, J.B. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 1, p. 18-29, 2005.
- TRIFILLIS, A.L.; DONNENBERG, M.S.; CUI, X.; RUSSELL, R.G.; UTSALO, S.J.; MOBLEY, H.L. WARREN, J.W. Binding to and killing of human renal epithelial cells by hemolytic P-fimbriated *E. coli*. **Kidney Int.**, v. 46, n. 4, p. 1083-1091, 1994.
- TSAI, C.C.; CHEN, S.Y.; TSEN, H.Y. Screening the enteroaggregative *Escherichia coli* activity and detection of the *aggA*, *aafA*, and *astA* genes with novel PCR primers for the *Escherichia coli* isolates from diarrhea cases in Taiwan. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 46, n. 3, p. 159-165, 2003.
- ULETT, G.C.; VALLE, J.; BELOIN, C.; SHERLOCK, O.; GHIGO, J.M.; SCHEMBRI, M.A. Functional analysis of antigen 43 in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-term persistence in the urinary tract. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 7, p. 3233-3244, 2007.
- UNICEF/WHO, **Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done**, 2009. Disponível em: <http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/9789241598415/en/index.html>.
- VAN HOUTT, R.; MICHIELS, C.W. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. **Res. Microbiol.**, v. 156, n. 5-6, p. 626-733, 2005.
- VASCONCELLOS, F.M. **Padrão de adesão agregativa e formação de biofilme em *Escherichia coli* enteroagregativa típica e atípica: papel da proteína Shf**. São Paulo, SP, 2009. 96f. Dissertação (mestrado em Ciências/Microbiologia). Universidade de São Paulo. USP
- VELARDE, J.J.; VARNEY, K.M.; INMAN, K.G.; FARFAN, M.; DUDLEY, E.; FLETCHER, J.; WEBER, D.J.; NATARO, J.P. Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 66, n. 5, p. 1123-1135, 2007.
- VERNACCHIO, L.; VEZINA, R.M.; MITCHELL, A.A.; LESKO, S.M.; PLAUT, A.G.; ACHESON, D.W. Diarrhea in American infants and young children in the community setting: incidence, clinical presentation and microbiology. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 25, n. 1, p. 2-7, 2006.
- VIAL, P.A.; ROBINS-BROWNE, R.; LIOR, H.; PRADO, V.; KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MANEVAL, D.; ELSAYED, A.; LEVINE, M.M. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. **J. Infect. Dis.**, v. 158, n.1, p. 70-79, 1988.
- VIDAL, J.E.; CANIZÁLEZ-ROMÁN, A.; GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ, J.; NAVARRO-GARCÍA, F. Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Salud. Pública. Mex.**, v. 49, n. 5, p. 376-386, 2007.
- VILA, J.; VARGAS, M.; HENDERSON, I.R.; GASCÓN, J.; NATARO, J.P. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in traveler's diarrhea strains. **J. Infect. Dis.**, v. 182, N. 6, p. 1780-1783, 2000.
- VILLASECA, J.M.; NAVARRO-GARCÍA, F.; MENDOZA-HERNÁNDEZ, G.; NATARO, J.P.; CRAVIOTO, A.; ESLAVA, C. Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 10, p. 5920-5927, 2000.

- VOKES, S.A.; REEVES, S.A.; TORRES, A.G.; PAYNE, S.M. The aerobactin iron transport system genes in *Shigella flexneri* are present within a pathogenicity island. **Mol. Microbiol.**, v. 33, n. 1, p. 63-73, 1999.
- WAKIMOTO, N.; NISHI, J.; SHEIKH, J.; NATARO, J.P.; SARANTUYA, J.; IWASHITA, M.; MANAGO, K.; TOKUDA, K.; YOSHINAGA, M.; KAWANO, Y. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 71, n. 5, p. 687-690, 2004.
- WANG, X.; PRESTON, J.F. 3rd.; ROMEO, T. The pgaABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 9, p. 2724-2734, 2004.
- WANKE, C.A.; MAYER, H.; WEBER, R.; ZBINDEN, R.; WATSON, D.A.; ACHESON, D. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a potential cause of diarrheal disease in adults infected with human immunodeficiency virus. **J. Infect. Dis.**, v. 178, n. 1, p. 185-190, 1998.
- WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p. 4-8, 2007.
- WELCH, R.A. Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. **Mol. Microbiol.**, v. 5, n. 3, p. 521-528, 1991.
- WHO. **Diarrhoea**. Disponível em: <http://www.who.int/topics/diarrhoea/en/> Acessado em: 18 2012.
- YAMAMOTO, T.; ENDO, S.; YOKOTA, T.; ECHEVERRIA, P. Characteristics of adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to human and animal mucosa. **Infect. Immun.**, 59, n. 10, p. 3722-3739, 1991.
- YAMAMOTO, T.; KOYAMA, Y.; MATSUMOTO, M.; SONODA, E.; NAKAYAMA, S.; UCHIMURA, M.; PAVEENKITTIPORN, W.; TAMURA, K.; YOKOTA, T.; ECHEVERRIA, P. Localized, aggregative, and diffuse adherence to HeLa cells, plastic, and human small intestines by *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. **J. Infect. Dis.**, v. 166, n. 6, p. 1295-1310, 1992.
- YOUSSEF, M.; SHURMAN, A.; BOUGNOUX, M.; RAWASHDEH, M.; BRETAGNE, S.; STROCKBINE, N. Bacterial, viral and parasitic enteric pathogens associated with acute diarrhea in hospitalized children from northern Jordan. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 28, n.3, p. 257-263, 2000.
- 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, 2004.
- ZOJA, C.; BUELLI, S.; MORIGI, M. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: pathophysiology of endothelial dysfunction. **Pediatr. Nephrol.**, v. 25, n. 11, p. 2231-2240, 2010.

ANEXO 1 – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Vitória-ES, 21 de dezembro de 2006

Do: Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde

Para: Prof^a. Sônia Maria de Souza Kitagawa
Pesquisadora Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado:
“Enteropatógenos bacterianos em diarreia aguda de crianças quilombolas e da periferia urbana de São Mateus, ES.”

Senhora Pesquisadora,

Informamos à Vossa Senhoria, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Projeto de Pesquisa, N^o Registro no CEP-129/06, intitulado: **“Enteropatógenos bacterianos em diarreia aguda de crianças quilombolas e da periferia urbana de São Mateus, ES”**, e o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, APROVOU o referido projeto, em Reunião Ordinária realizada em 20 de dezembro de 2006,

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde n^o 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra “c”.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa
Centro Biomédico / UFES

ANEXO 2 – Meios de cultura e soluções utilizados

PBS (Tampão-fosfato-salino) 0,2M

Solução A:

NaH₂PO₄.H₂O (Reagen).....2,76 g
 H₂O destilada.....100 mL

Solução B:

Na₂HPO₄.H₂O (Carlo Erba).....5,365 g
 H₂O destilada.....100 mL

Solução A.....14 mL
 Solução B36 mL
 NaCl (Vetec).....8,5 g
 H₂O destilada.....qsp. 1000 mL
 pH 7,2

Safranina 0,1%

Safranina (Reagen).....0,1 g
 H₂O destilada.....100 mL

Álcool 97% em éter

Etanol PA (Biotec).....97 mL
 Éter etílico PA (Isofar).....3 mL

Luria Bertani (LB) (Naves et al., 2008)

Triptona (Difico).....10 g
 Extrato de levedura (Vetec).....5 g
 NaCl (Vetec).....5 g
 Glicose (Merck).....5 g
 H₂O destilada.....1000 mL

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) Hepes 10% SFB (pH 7,4)

DMEM em pó para 1 litro (Cultilab)

Hepes (Sigma).....3,5 g
 NaHCO₃ (Merck).....0,2%
 SFB (Cultilab).....10%
 Água deionizada.....qsp 1000

Salina

NaCl (Vetec).....8,5 g
 H₂O destilada.....qsp. 1000 mL

Tampão Tris Borato-EDTA (TBE) 10X

Tris hidiximetil amino metano (Vetec).....121,14 g (1M)
 Ácido bórico (Proquimios).....61,83 g (1M)
 EDTA(PM 372,42) (Proquimios).....7,45 g (0,02M)
 H₂O MilliQ.....qsp. 1000 mL

Dissolver em Banho-Maria 37°C

Autoclavar

Guardar em geladeira

Para preparar TBE 5X, medir 50 mL do TBE 10X, completar o volume para 1000 mL e hoogeneizar.

Loading

Azul de bromofenol (Vetec).....0,05%
 Sacarose (Invitrogen).....40%
 Lauril sulfato de sódio (Sigma).....0,5%
 EDTA (Reagen)..... 0,1 M pH8,0

Brometo de etídio (0,05%)

Brometo etídio(10mg/mL) (Ameresco).....15 µL
 H₂O destilada.....300 mL

Cristal Violeta 1%

Cristal Violeta (Proquimios).....20 g
 Álcool 95% (Biotec).....200 mL
 Fenol fundido (Synth).....40 g
 H₂O destilada.....2000 mL

Dissolver em gral o corante no álcool.

Juntar aos poucos o fenol, misturando sempre, de modo a obter uma mistura homogênea.

Juntar a água pouco a pouco, lavando o gral.

Deixar em repouso 24 horas.

Filtrar com papel filtro e algodão hidrófilo.

Para preparar a solução de corante 0,5%, medir 100 mL do corante a 1% e misturar bem com 100 mL de água destilada. Homogeneizar bem e filtrar com papel filtro e algodão hidrófilo.