

Desarrollo de PCR multiplex para detección y diferenciación de categorías de *Escherichia coli* diarreogénicos

Desenvolvimento de PCR multiplex para detecção e diferenciação de categorias de *Escherichia coli* diarreogênicas

Development of multiplex PCR to detect and differentiate the categories of diarrheagenic *Escherichia coli*

Ana Roberta Fusco da Costa
Laboratório de Biologia Molecular, Seção de Bacteriologia e Micologia,
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Cintya Oliveira de Sousa
Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas, Seção de Bacteriologia e
Micologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Karla Valéria Batista Lima
Laboratório de Biologia Molecular, Seção de Bacteriologia e Micologia,
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil
Centro de Ciências Sociais e Educação, Universidade do Estado do
Pará, Belém, Pará, Brasil

Edvaldo Carlos Brito Loureiro
Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas, Seção de Bacteriologia e
Micologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Las *Escherichia coli* diarreogénicas (DEC) son consideradas una importante causa de diarrea en los países en desarrollo. Para su correcta identificación, esos microorganismos deben ser diferenciados de los miembros no patogénicos de la microbiota intestinal. Las DEC pueden clasificarse en seis categorías, de acuerdo a su mecanismo de patogenicidad. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Se desarrollaron y evaluaron dos sistemas de PCR multiplex para la detección de *E. coli* enteropatógenicas (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasora (EIEC) y productora de toxina Shiga (STEC). **RESULTADOS:** Cuatro categorías diarreogénicas fueron detectadas entre los aislados de *E. coli* obtenidos de individuos infectados por HIV, con EIEC y EPEC representando los patotipos más frecuentes. Dos STEC *stx1* y *eae* positivas fueron identificadas, siendo este el primer relato de aislamiento de esa categoría en individuos infectados por HIV en el estado de Pará. La PCR multiplex se mostró como técnica eficiente, rápida y reproducible para la detección de los aislados de DEC. Los dos sistemas de PCR multiplex presentaron resultados 100% concordantes a los encontrados en la PCR simple. **CONCLUSIÓN:** Debido a su simplicidad, economía y eficiencia, se hace posible la aplicación de los protocolos multiplex para agilizar el diagnóstico molecular de las categorías de DEC, lo que promoverá la elaboración de nuevos proyectos de investigación y dará apoyo a las actividades de vigilancia epidemiológica desarrollados por los institutos de salud pública.

Palabras clave: Reacción en Cadena de la Polimerasa; *Escherichia coli*; Factores de Virulencia; Enfermedades Intestinales.

INTRODUCCIÓN

Las *Escherichia coli* diarreogénicas (*diarrheagenic E. coli* – DEC) representan importante causa de diarrea endémica y epidémica en el mundo²⁹. Sin embargo, es probable que la frecuencia de esos patógenos sea subestimada, debido a que su detección exige métodos diagnósticos específicos que no se utilizan en la práctica clínica.

La identificación de *E. coli* diarreogénica requiere su diferenciación de las especies no patogénicas de la microbiota intestinal⁴³. Las *E. coli* que causan diarrea se clasifican en categorías patogénicas de acuerdo a factores de virulencia específicos, codificados por cromosomas, plásmidos y DNA de bacteriófagos. Esos factores de virulencia suministran a cada categoría una capacidad de causar síndrome clínico con características epidemiológicas y patológicas distintas³⁸.

De acuerdo a sus mecanismos de patogenicidad las DEC pueden ser clasificadas en: *E. coli* enteropatógena (EPEC); *E. coli* enterotoxigénica (ETEC); *E. coli* enteroinvasora (EIEC); *E. coli* productora de toxina de Shiga (STEC); *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* difusamente adherente (DAEC)^{29,42,48}. Esas categorías pueden ser eventualmente identificadas a través de ensayos serotípicos, fenotípicos y moleculares²⁹. El primero

Correspondencia / Correspondência / Correspondence:

Ana Roberta Fusco da Costa
Laboratório de Biologia Molecular, Seção de Bacteriologia e Micologia
Instituto Evandro Chagas
BR 316, km 7, 67030-000 Ananindeua-Pará-Brasil
Tel.: 55 91 3214-2116 / Fax: 91 3214-2114
E-mail: anacosta@iec.pa.gov.br / robertafusco@gmail.com

requiere la identificación de antígenos somáticos (O) y flagelares (H). En la rutina de laboratorio, se realiza apenas la investigación de los serogrupos por determinación de los antígenos somáticos. Esto, sin embargo, no es suficiente para identificar una muestra como diarreogénica, debido a no estar correlacionado, en algunos casos, con la presencia de factores de virulencia²⁴. Por lo tanto, la identificación debe ser dirigida a las características que determinan la virulencia de esos microorganismos.

Los ensayos fenotípicos para la detección de toxinas, patrón de adherencia o invasión pueden identificar muestras de *E. coli* diarreogénicas, pero requieren, sin embargo, elevadas inversiones, técnicas especiales y aplicación de varios sistemas de detección (ej.: cultura de células, ensayos de citotoxicidad), además de consumo de largos períodos^{2,25}. Con la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) es posible detectar genes involucrados con la patogenicidad de diversos aislados bacterianos, permitiendo simple identificación³⁴.

En la investigación de patógenos la PCR es indicada para la amplificación de una región específica del DNA que permite la detección de determinado locus de virulencia. Técnicas de PCR convencionales para la investigación de *E. coli* diarreogénicas han sido relatadas, pero, la investigación de los aislados bacterianos requiere un gran número de reacciones individuales para la detección de varios factores de virulencia, lo que la vuelve laboriosa²⁰.

Para reducir el número de test necesarios para la identificación de DEC, han sido desarrollados varios sistemas de PCR de detección múltiple (multiplex) para la amplificación simultánea de dos o más loci en una única reacción^{25,27,50}. No obstante, usualmente se requiere más de una PCR multiplex⁴³. Para simplificar y disminuir el tiempo para el diagnóstico diferencial, en este estudio fueron desarrollados sistemas de PCR multiplex aplicados

para identificación de las siguientes categorías de DEC, cuyos marcadores de virulencia ya están bien definidos: ETEC, EPEC, EIEC y STEC.

MATERIALES Y MÉTODOS

ASLADOS BACTERIANOS

Este estudio incluyó 720 *E. coli* almacenadas en la bacterioteca de la Sección de Bacteriología y Micología del Instituto Evandro Chagas (IEC), caracterizadas por métodos fenotípicos tradicionales como descrito previamente⁵. Las *E. coli* fueron aisladas de muestras fecales de 181 individuos mayores de 18 años infectados por el HIV, durante los años de 2000 a 2002.

El proyecto que dio origen a este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación con Seres Humanos del IEC bajo parecer n° 02/2000 en 26 de mayo de 2000.

PCR

Para la investigación de los factores de virulencia, las muestras fueron repicadas para tubos de ensayo con agar TSI (Difco), incubadas a 37° C por 24 h y posteriormente repicadas para tubos con agar TSA (Difco) para extracción del DNA. Para la extracción del ADN bacteriano se utilizó la técnica de termo extracción, y el crecimiento bacteriano fue transferido para microtubos con 400 L de agua purificada esterilizada y sometido a 100° C por 10 min. Luego del hervido, la suspensión se congeló a -20° C. Después de esa etapa, la suspensión fue descongelada y centrifugada a 13.000 rpm (16845xg) en microcentrífuga (mod. NT-805, Nova Técnica).

Las categorías diarreogénicas EPEC, ETEC, EIEC y STEC fueron investigadas por medio de realización de PCR simple para siete diferentes marcadores moleculares, de acuerdo con condiciones establecidas en estudios anteriores (Cuadro 1).

Factores de virulencia (genes)	Iniciador	Secuencia (5' – 3')	Producto (pb)	Referencia
Toxina termoestable (<i>est</i>)	ST-1 ST-2	CTGTATTGCTTTTTACCT GCACCCGGTACAAGCAGGAT	182	Tornieporth ⁴⁴ (1995)
Toxina termolábil (<i>elt</i>)	LT-1 LT-2	GCGACAAATTATACCGTGCT CCGAATTCTGTTATATATGT	707	Tornieporth ⁴⁴ (1995)
Fimbria BFP (<i>bfpA</i>)	EP-1 EP-2	CAATGGTGCTTGCGCTTGCT GCCGCTTTATCCAACCTGGT	550	Donnenberg ⁸ (1992)
Intimina (<i>eae</i>)	EAE-1 EAE-2	AAACAGGTGAAACTGTTGCC CTCTGCAGATTAACCTCTGC	454	Yu ⁵² (1992)
Antígeno de invasión (<i>ipaH</i>)	EI-1 EI-2	GCTGGAAAACTCAGTGCCT CCAGTCCGTAATTCATTCT	424	Venkatesan ⁴⁷ (1989)
Toxina Shiga 1 (<i>stx1</i>)	STX-1A STX-1B	CAACACTGGATGATCTCAG CCCCCTCAACTGCTAATA	349	Pal ³² (1999)
Toxina Shiga 2 (<i>stx2</i>)	STX-2A STX-2B	ATCAGTCGTCACACTGCTGGT CTGCTGTACAGTGACAAA	110	Pal ³² (1999)

Cuadro 1 – Oligonucleótidos iniciadores utilizados en la PCR y sus respectivos blancos y productos de amplificación

Las *E. coli* diarregénicas fueron clasificadas según la presencia de genes de factores de virulencia, de acuerdo a criterios previamente publicados (Cuadro 2)⁷.

Categorías patogénicas	Genes de virulencia característicos
EPEC típica	<i>eae</i> (intimina) y <i>bfpA</i> (fimbria BFP), con ausencia de los genes <i>stx</i> (toxina Shiga)
EPEC atípica	<i>eae</i> (intimina) con ausencia de <i>stx</i> (toxina Shiga)
ETEC	<i>elt</i> y/o <i>est</i> (enterotoxinas)
EIEC	<i>ipaH</i> (antígeno de invasión)
STEC	<i>stx1/2</i> y/o <i>eae</i> (intimina)

Cuadro 2 – Clasificación molecular de las categorías diarregénicas de *E. coli*

Cada reacción presentó volumen final de 50 μ l conteniendo 1 mM de deoxinucleótidos (Invitrogen), 10 pmol de cada oligonucleótido (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), tampón de Taq ADN polimerasa 1 \times (Invitrogen), 0,25 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen), y 3 μ l de ADN. Las condiciones de amplificación comprendieron denaturación inicial a 94 $^{\circ}$ C por 5 min, 35 ciclos con 1,5 min a 94 $^{\circ}$ C, 1,5 min a 50/56 $^{\circ}$ C y 1,5 min a 72 $^{\circ}$ C y extensión final por 10 min a 72 $^{\circ}$ C. Las reacciones fueron realizadas en termociclador (mod. CE 3832, Thermo Hyband). Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa D-1 LE GQT a 2% (BioAmerica) conteniendo 1 μ g/mL de bromuro de etideo (Sigma) y visualizados en transiluminador UVP (BioImaging Systems).

Para desarrollar los ensayos de PCR multiplex se probaron varias temperaturas de anillamiento, concentraciones de reactivos e incorporación progresiva de los oligonucleótidos. La sensibilidad y la especificidad de la reacción fueron ensayadas con las cepas de referencias E2348/69 (EPEC), H10407 (ETEC LT-1/STa), EDL1284 (EIEC) y EDL933 (STEC). La cepa de *E. coli* K12 se usó como control negativo. Los oligonucleótidos utilizados están descritos en el cuadro 1.

RESULTADOS

Para identificación simultánea y diferenciación de cuatro categorías diarregénicas de *E. coli* se desarrollaron dos sistemas de PCR multiplex (Sistemas 1 y 2) conteniendo, respectivamente, tres y cuatro pares de iniciadores (Cuadro 3).

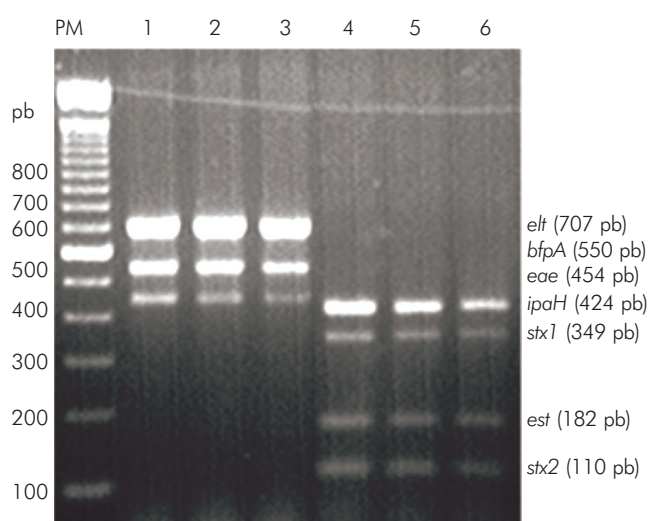
Sistemas	Genes*	Iniciadores	Anillamiento ($^{\circ}$ C)	Productos de PCR (pb)
PCR multiplex 1	<i>elt</i>	LT-1/LT-2	50	707
	<i>bfpA</i>	EP1-1/EP-2	50	550
	<i>eae</i>	EAE-1/EAE-2	50	454
PCR multiplex 2	<i>ipaH</i>	EI-1/EI-2-1	56	424
	<i>stx-1</i>	STX-1A/STX-1B	56	349
	<i>est</i>	ST1/ST2	56	182
	<i>stx-2</i>	STX-2A/STX-2B	56	110

* *lt*: gen de la toxina termolábil; *bfpA*: gen de fimbria BFP; *eae*: gen de proteína intimina; *ipaH*: gen del antígeno de invasión; *stx1*: gen de la toxina de Shiga 1; *stx2*: gen de la toxina de Shiga 2; *st*: gen de la toxina termoestable.

Cuadro 3 – Combinación de iniciadores en los sistemas de PCR multiplex para detección de las categorías diarregénicas de *E. coli*

Cuando los pares de oligonucleótidos fueron incorporados en los sistemas multiplex, se observó una interferencia. Este fue el caso de LT-1/LT-2 que a la concentración de 10 pmol/ μ l inhibió la amplificación de *eae*. En esta situación, la modificación de la concentración de LT-1/LT-2 para 5 pmol/ μ l fue suficiente para favorecer la amplificación del blanco esperado (*eae*).

Apenas los loci meta fueron detectados en los controles positivos, sin que aparecieran amplificaciones inespecíficas. Como control positivo de los sistemas de PCR multiplex se utilizó una mezcla conteniendo el ADN de las cepas de referencia, observándose reproductibilidad con los resultados obtenidos en la PCR simple. Las amplificaciones visualizadas en los sistemas 1 y 2 de PCR multiplex están demostradas en la figura 1.



PM: Marcador de peso molecular de 100 pb.

Figura 1 – Perfil electroforético de los loci característicos de *E. coli* diarregénicas amplificados en los sistemas de PCR-multiplex 1 (1 – 3) y 2 (4 – 6) en gel de agarosa a 2%

La especificidad de los productos obtenidos en las reacciones de PCR multiplex fue determinada por el estudio de las muestras de referencia. Para validar los sistemas de PCR multiplex desarrollados y para la demostración de la utilidad diagnóstica, se analizaron los 78 aislados caracterizados por PCR simple como DEC y el triple de muestras (234 aislados) con resultados de PCR negativos, comprendiendo el total de 312 test.

Entre las 720 *E. coli* testeadas por PCR simple 78 (10,8%) presentaron un o más genes característicos de DEC, siendo identificadas en: EIEC (n = 34), EPEC (n = 29), ETEC (n = 13) y STEC (n = 2). De las 29 EPEC encontradas 28 fueron clasificadas como EPEC atípicas, por la ausencia del gen *bfpA* (fimbria BFP). Las 13 ETEC fueron caracterizadas como LT-I (n = 2) y STa (n = 11). Un total de 34 aislados pertenecía a la categoría EIEC. Se identificaron dos STEC, siendo *stx1* y *eae* positivas. En el análisis comparativo de los datos obtenidos se encontró concordancia de 100% entre los resultados de PCR simple y multiplex.

DISCUSIÓN

Algunas DEC son genéticamente diferenciadas de las demás por la presencia de genes codificantes de factores de virulencia específicos que han sido utilizados en la identificación^{6,7,29,35,39}. Entre éstos, ha sido ejecutada la detección simultánea de múltiples genes de virulencia por medio de ensayos de PCR multiplex^{4,36,41}. Para reducir el número de PCR realizadas, nosotros desarrollamos dos sistemas de PCR multiplex para detección de siete genes de factores de virulencia, característicos de cuatro patotipos: EPEC, ETEC, EIEC y STEC. Aunque sean conocidas seis linajes de *E. coli* diarreogénicas, solamente esas cuatro presentaron marcadores de virulencia bien definidos²⁹.

Algunos estudios han sugerido blancos moleculares para caracterización de EAEC, como los genes *setBA*, *aa1A*, *astA* y *aat*. No obstante, se ha observado que algunos de estos marcadores no son exclusivos de esa categoría^{17,19}. Los genes *afa*, *dra* y *daa*, codificadores de una familia de adhesinas, han sido utilizados para la caracterización de DAEC, pero, los mismos pueden estar presentes en *E. coli* no patogénicas²². Por tanto, debido a esas peculiaridades, se recomienda la inclusión de ensayos de adherencias en cultivo de células HEp-2 o HeLa como método estándar de oro para definición de las categorías EAEC y DAEC²⁹.

Son crecientes las descripciones de sistemas de PCR para identificación simultánea de múltiples loci. Pass et al³³ realizaron PCR multiplex para detección de 11 diferentes factores de virulencia, sin embargo, utilizaron cuatro sistemas, lo que representa poca practicidad. Nguyen et al³¹ presentaron un ensayo de PCR-Multiplex para detección de ocho genes característicos de EPEC, ETEC, EIEC, STEC y EAEC, pero de baja capacidad resolutive entre ETEC-LT y EIEC (diferencias de 2 pb entre los fragmentos característicos de esas categorías). Müller et al²⁸ también desarrollaron un sistema de PCR multiplex para identificación de DEC, apenas aplicado, sin embargo, a las categorías EPEC y EIEC.

Otros estudios han relatado el uso de PCR multiplex para identificación de varios patotipos^{6,20,30,43,48}. Sin embargo, presentan como limitación la inhabilidad de diferenciar todas las categorías de DEC, principalmente en infecciones mixtas por EPEC atípicas y STEC, tornando necesaria la realización de otras PCR para verificar los resultados.

En este estudio se desarrollaron dos sistemas de PCR multiplex de rápida optimización, ejecución simple, fácil implantación en la rutina de los laboratorios de referencia, baratos – cuando comparados a los sistemas de PCR que utilizan marcadores fluorescentes – y que dispensan la realización de PCR adicionales para esclarecimiento de los resultados, como por ejemplo, en presencia de patotipos que compartan marcadores de virulencia. El método permitió la identificación de cuatro categorías diarreogénicas, representando un 10,8% de los aislados, con predominio de EIEC seguido de EPEC, con mayor prevalencia de la subcategoría atípica.

Las EIEC son capaces de invadir la mucosa intestinal causando ocasionalmente cuadro de disentería. Estudios relatan la muy baja incidencia para esa categoría, siendo la mayor ocurrencia relacionada a brotes y entre niños de países en desarrollo^{13,14,15,23,26}. Investigaciones realizadas en Brasil sobre enteropatógenos involucrados en diarrea infantil demostraron baja frecuencia de EIEC^{11,37}, contrastando con los hallazgos de este estudio. Sin embargo, tal diferencia puede estar asociada a la franja etaria y a la población analizada, siendo que en aquellos estudios fueron investigados niños y, en el presente trabajo, se evaluaron aislados provenientes de individuos adultos infectados por HIV. En estudio con individuos por HIV en Senegal, el patotipo EIEC representó la segunda categoría de *E. coli* más prevalente¹², semejante al encontrado en este trabajo.

De los 29 aislados de EPEC, 28 fueron clasificados como EPEC atípicas. La división de muestras de EPEC en típicas y atípicas tiene importante implicación clínico-epidemiológica, antes no valorizada. Por muchos años, algunos serotipos de EPEC típicas asociados a la diarrea infantil fueron aislados con frecuencia, pero ha sido observada la reducción de esta subcategoría y un aumento relativo del aislamiento de EPEC atípicas en muchos países^{1,18,21,40,45,46,49}. Algunos trabajos sugieren que las EPEC atípicas sean tan patogénicas como las típicas, aunque haya sido relatado que la diarrea provocada por esa subcategoría sea más suave⁵¹. Hay registros también de que las EPEC atípicas estén más significativamente asociadas a la diarrea endémica o como causa de brotes^{9,10,51}.

Dos STEC *stx1* y *eae* positivas fueron identificadas. Las infecciones debido a STEC son relatadas en casos esporádicos en Brasil^{3,6,11,16}, siendo este el primer relato de aislamiento de esa categoría en individuos infectados por HIV en el Estado de Pará.

CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio demostraron la diversidad de patotipos de *E. coli* aislados de individuos infectados por HIV, con predominio de EIEC y EPEC atípicas. Los sistemas de PCR-Multiplex se mostraron como una metodología simple, económica y eficiente para una rápida selección e identificación de aislados de DEC, y, de esta manera, pueden ser incorporados a la rutina de laboratorios de referencia, dando apoyo a las actividades de vigilancia epidemiológica desarrolladas por los institutos de salud pública.



Desenvolvimento de PCR multiplex para detecção e diferenciação de categorias de *Escherichia coli* diarreio gênicas

RESUMO

INTRODUÇÃO: As *Escherichia coli* diarreio gênicas (DEC) são consideradas importante causa de diarreia nos países em desenvolvimento. Para sua correta identificação, esses microrganismos devem ser diferenciados dos membros não patogênicos da microbiota intestinal. As DEC podem ser classificadas em seis categorias, de acordo com seu mecanismo de patogenicidade. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram desenvolvidos e avaliados dois sistemas de PCR multiplex para a detecção de *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasora (EIEC) e produtora da toxina de Shiga (STEC). **RESULTADOS:** Quatro categorias diarreio gênicas foram detectadas entre os isolados de *E. coli* obtidos de indivíduos infectados pelo HIV, com EIEC e EPEC representando os patótipos mais frequentes. Duas STEC *stx1* e *eae* positivas foram identificadas, sendo este o primeiro relato de isolamento dessa categoria em indivíduos infectados pelo HIV no estado do Pará. A PCR multiplex mostrou-se como técnica eficiente, rápida e reprodutível para detecção dos isolados de DEC. Os dois sistemas de PCR multiplex apresentaram resultados 100% concordantes com os encontrados na PCR simples. **CONCLUSÃO:** Devido sua simplicidade, economia e eficiência torna-se possível a aplicação dos protocolos multiplex para agilizar o diagnóstico molecular das categorias de DEC, o que promoverá a elaboração de novos projetos de pesquisa e darão suporte as atividades de vigilância epidemiológica desenvolvidos pelos institutos de saúde pública.

Palavras-chave: Reação em Cadeia da Polimerase; *Escherichia coli*; Fatores de Virulência; Enteropatias.

Development of multiplex PCR to detect and differentiate the categories of diarrheagenic *Escherichia coli*

ABSTRACT

INTRODUCTION: Diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) are considered an important cause of diarrhea in developing countries. The correct identification of these microorganisms depends on their differentiation from non-pathogenic members of the intestinal microbiota. DEC can be classified into one of six categories according to their mechanism of pathogenicity. **MATERIALS AND METHODS:** Two multiplex PCR systems used to detect enteropathogenic (EPEC), enterotoxigenic (ETEC), enteroinvasive (EIEC) and Shiga Toxin-producing (STEC) *E. coli* were evaluated and described. **RESULTS:** Four categories of DEC were detected among isolates of *E. coli* obtained from individuals infected with HIV. EIEC and EPEC were among the most prevalent pathotypes. Furthermore, two STEC strains that were both *stx1*- and *eae*- positive were identified. This is the first report of this kind of isolation in individuals infected with HIV in the State of Pará. Multiplex PCR proved to be an efficient, fast and reproducible technique for detection of DEC isolates. Both multiplex PCR systems described here produced results 100% similar to those obtained from individual PCR reactions. **CONCLUSION:** Given their simplicity, cost and efficiency, it is possible to use these protocols to expedite the molecular diagnosis of the distinct categories of DEC. In addition to facilitating the development of new research projects, these findings could support the epidemiological surveillance undertaken by public health agencies and institutes.

Keywords: Polymerase Chain Reaction; *Escherichia coli*; Virulence Factors; Intestinal Diseases.



REFERENCIAS

- 1 Afset JE, Bevanger L, Romundstad P, Bergh K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. J Med Microbiol. 2004 Nov;53(Pt 11):1137-44.
- 2 Aranda KR, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. J Clin Microbiol. 2004 Dec;42(12):5849-53.
- 3 Bastos FC, Vaz TM, Irino K, Guth BE. Phenotypic characteristics, virulence profile and genetic relatedness of O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated in Brazil and other Latin American countries. FEMS Microbiol Lett. 2006 Dec;265(1):89-97.
- 4 Brandal LT, Lindstedt BA, Aas L, Stavnes TL, Lassen J, Kapperud G. Octaplex PCR and fluorescence-based capillary electrophoresis for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* ssp. J Microbiol Methods. 2007 Feb;68(2):331-41.
- 5 Brenner DJ. Facultatively anaerobic Gram-negative rods. In: Krieg NR, Holt JG, editors. Bergey's manual of systematic bacteriology, 9th ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins; 1994. p. 175-290.
- 6 Bueris V, Sircili MP, Taddei CR, Santos MF, Franzolin MR, Martinez MB, et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007 Nov;102(7):839-44.

- 7 Campos LC, Franzolin MR, Trabulsi LR. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004 Oct;99(6):545-52.
- 8 Donnenberg MS, Girón JA, Nataro JP, Kaper JB. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. Mol Microbiol. 1992 Nov;6(22):3427-37.
- 9 Dulguer MV, Fabbriotti SH, Bando SY, Moreira-Filho CA, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. 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. 2003 Dec 1;188(11):1685-94.
- 10 Estrada-Garcia T, Lopez-Saucedo C, Thompson-Bonilla R, Abonce M, Lopez-Hernandez D, Santos JI, et al. Association of diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical Enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. J Clin Microbiol. 2009 Jan;47(1):93-8.
- 11 Franzolin MR, Alves RC, Keller R, Gomes TA, Beutin L, Barreto ML, et al. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005 Jul;100(4):359-63.
- 12 Gassama-Sow A, Sow PS, Guèye M, Guèye-N'diaye A, Perret JL, M'boup S, et al. Characterization of pathogenic *Escherichia coli* in human immunodeficiency virus-related diarrhea in Senegal. J Infect Dis. 2004 Jan 1;189(1):75-8.
- 13 Gomes TAT, Griffin PM, Ivey C, Trabulsi LR, Ramos SRTS. EPEC infections in São Paulo. Rev Microbiol. 1996;27:25-33.
- 14 Gomes TA, Rassi V, MacDonald KL, Ramos SR, Trabulsi LR, Vieira MA, et al. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. J Infect Dis. 1991 Aug;164(2):331-7.
- 15 Gordillo ME, Reeve GR, Pappas J, Mathewson JJ, DuPont HL, Murray BE. Molecular characterization of strains of enteroinvasive *Escherichia coli* O143, including isolates from a large outbreak in Houston, Texas. J Clin Microbiol. 1992 Apr;30(4):889-93.
- 16 Guth BE, Lopes de Souza R, Vaz TM, Irino K. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome in Brazil. Emerg Infect Dis. 2002 May;8(5):535-6.
- 17 Harrington SM, Dudley EG, Nataro JP. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. FEMS Microbiol Lett. 2006 Jan;254(1):12-8.
- 18 Hernandez RT, Elias WP, Vieira MA, Gomes TA. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. 2009 Aug;297(2):137-49.
- 19 Jenkins C, Tembo M, Chart H, Cheasty T, Willshaw GA, Phillips AD, et al. Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* in faecal samples from patients in the community with diarrhoea. J Med Microbiol. 2006 Nov;55(Pt 11):1493-7.
- 20 Kimata K, Shima T, Shimizu M, Tanaka D, Isobe J, Gyobu Y, et al. Rapid categorization of pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. Microbiol Immunol. 2005;49(6):485-92.
- 21 Knutton S, Shaw R, Phillips AD, Smith HR, Willshaw GA, Watson P, et al. Phenotypic and genetic analysis of diarrhea-associated *Escherichia coli* isolated from children in the United Kingdom. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2001 Jul;33(1):32-40.
- 22 Le Bouguéneq C, Servin AL. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. FEMS Microbiol Lett. 2006 Mar;256(2):185-94.
- 23 Levine MM, Ferreccio C, Prado V, Cayazzo M, Abrego P, Martinez J, et al. Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. Am J Epidemiol. 1993 Nov;138(10):849-69.
- 24 Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J Infect Dis. 1987 Mar;155(3):377-89.
- 25 López-Saucedo C, Cerna JF, Villegas-Sepulveda N, Thompson R, Velazquez FR, Torres J, et al. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis. 2003 Jan;9(1):127-31.
- 26 Moyo SJ, Maselle SY, Matee MI, Langeland N, Mylvaganam H. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from infants and children in Dar es Salaam, Tanzania. BMC Infect Dis. 2007 Aug;7:92.
- 27 Müller D, Greune L, Heusipp G, Karch H, Fruth A, Tschäpe H, et al. Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. Appl Environ Microbiol. 2007 May;73(10):3380-90.
- 28 Müller D, Hagedorn P, Brast S, Heusipp G, Bielaszewska M, Friedrich AW, et al. Rapid identification and differentiation of clinical isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), atypical EPEC, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by a one-step multiplex PCR method. J Clin Microbiol. 2006 Jul;44(7):2626-9.

- 29 Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998 Jan;11(1):142-201.
- 30 Nessa K, Ahmed D, Islam J, Kabir FML, Hossain MA. Usefulness of a Multiplex PCR for Detection of Diarrheagenic *Escherichia coli* in a Diagnostic Microbiology Laboratory Setting. Bangladesh J Med Microbiol 2007;1(2):38-42.
- 31 Nguyen TV, Le Van P, Le Huy C, Gia KN, Weintraub A. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. J Clin Microbiol. 2005 Feb;43(2):755-60.
- 32 Pal A, Ghosh S, Ramamurthy T, Yamasaki S, Tsukamoto T, Bhattacharya SK, et al. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* from healthy cattle in a semi-urban community in Calcutta, India. Indian J Med Res. 1999 Sep;110:83-5.
- 33 Pass MA, Odedra R, Batt RM. Multiplex PCRs for Identification of *Escherichia coli* virulence genes. J. Clin. Microbiol. 2000 May;38(5):2001-4.
- 34 Phantouamath B, Sithivong N, Insisiengmay S, Higa N, Toma C, Nakasone N, et al. The incidence of *Escherichia coli* having pathogenic genes for diarrhea: a study in the People's Democratic Republic of Lao. Jpn J Infect Dis. 2003 Jun;56(3):103-6.
- 35 Presterl E, Zwick RH, Reichmann S, Aichelburg A, Winkler S, Kremsner PG, et al. Frequency and virulence properties of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Gabon. Am J Trop Med Hyg. 2003 Oct;69(4):406-10.
- 36 Rappelli P, Maddau G, Mannu F, Colombo MM, Fiori PL, Cappuccinelli P. Development of a set of multiplex PCR assays for the simultaneous identification of enterotoxigenic, enteropathogenic, enterohemorrhagic, and enteroinvasive *Escherichia coli*. New Microbiol. 2001 Jan;24(1):77-83.
- 37 Regua-Mangia AH, Gomes TA, Vieira MA, Andrade JR, Irino K, Teixeira LM. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. J Infect. 2004 Feb;48(2):161-7.
- 38 Robins-Browne RM, Bordun AM, Tauschek M, Bennett-Wood VR, Russell J, Oppedisano F, et al. *Escherichia coli* and community acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. Emerg Infect Dis. 2004 Oct;10(10):1797-805.
- 39 Scaletsky IC, Fabbriotti SH, Silva SO, Morais MB, Fagundes-Neto U. HEp-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, São Paulo, Brazil. Emerg Infect Dis. 2002 Aug;8(8):855-8.
- 40 Scaletsky IC, Pedroso MZ, Oliva CA, Carvalho RL, Morais MB, Fagundes-Neto U. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. Infect Immun. 1999 Jul;67(7):3410-5.
- 41 Stacy-Phipps S, Mecca JJ, Weiss JB. Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during course of infection. J Clin Microbiol. 1995 May;33(5):1054-9.
- 42 Teng LJ, Hsueh PR, Liaw SJ, Ho SW, Tsai JC. Genetic detection of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with sporadic diarrhea. J Microbiol Immunol Infect. 2004 Dec;37(6):327-34.
- 43 Toma C, Lu Y, Higa N, Nakasone N, Chinen I, Baschkier A, et al. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2003 Jun;41(6):2669-71.
- 44 Torniepoth NG, John J, Salgado K, Jesus P, Latham E, Melo MC, et al. Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR. J Clin Microbiol. 1995 May;33(5):1371-4.
- 45 Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis. 2002 May;8(5):508-13.
- 46 Usein CR, Tatu-Chitoiu D, Ciontea S, Condei M, Damian M. *Escherichia coli* pathotypes associated with diarrhea in Romanian children younger than 5 Years of Age. Jpn J Infect Dis. 2009 Jul;62(4):289-93.
- 47 Venkatesan MM, Buysse JM, Kopecko DJ. Use of *Shigella flexneri ipaC* and *ipaH* gene sequences for the general identification of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 1989 Dec;27(12):2687-91.
- 48 Vidal M, Kruger E, Duran C, Lagos R, Levine M, Prado V, et al. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. J Clin Microbiol. 2005 Oct;43(10):5362-5.
- 49 Vieira MA, Andrade JR, Trabulsi LR, Rosa AC, Dias AM, Ramos SR, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry *eae* and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. J Infect Dis. 2001 Mar;183(5):762-72.
- 50 Yang JR, Wu FT, Tsai JL, Mu JJ, Lin LF, Chen KL, et al. Comparison between O serotyping method and multiplex real-time PCR to identify diarrheagenic *Escherichia coli* in Taiwan. J Clin Microbiol. 2007 Nov;45(11):3620-5.

- 51 Yatsuyanagi J, Saito S, Sato H, Miyajima Y, Amano K, Enomoto K. Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. J Clin Microbiol. 2002 Jan;40(1):294-7.
- 52 Yu J, Kaper JB. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Mol Microbiol. 1992 Feb;6(3):411-7.

Recibido en / Recebido em / Received: 31/7/2009
Aceito en / Aceito em / Accepted: 22/9/2010