

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

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

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

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

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.

INTRODUÇÃO

As *Escherichia coli* diarreio gênicas (diarrheagenic *E. coli* – DEC) representam importante causa de diarreia endêmica e epidêmica no mundo²⁹. Porém provavelmente a frequência desses patógenos é subestimada, devido sua detecção exigir métodos diagnósticos específicos que não são utilizados na prática clínica.

A identificação de *E. coli* diarreio gênica requer sua diferenciação das espécies não patogênicas da microbiota intestinal⁴³. As *E. coli* que causam diarreia são classificadas em categorias patogênicas de acordo com fatores de virulência específicos, codificados por cromossomos, plasmídios e DNA de bacteriófagos. Esses fatores de virulência fornecem a cada categoria uma capacidade de causar síndrome clínica com características epidemiológicas e patológicas distintas³⁸.

De acordo com seus mecanismos de patogenicidade as DEC podem ser classificadas em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC); *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* enteroinvasora (EIEC); *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC); *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC)^{29,42,48}. Essas categorias podem ser eventualmente identificadas através de ensaios sorotípicos, fenotípicos e moleculares²⁹. O primeiro requer

Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

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
Telefone : 55 91 3214-2116 / Fax: 91 3214-2114
E-mail: anacosta@iec.pa.gov.br / robertafusco@gmail.com

a identificação de antígenos somáticos (O) e flagelares (H). Na rotina laboratorial, é realizada apenas a pesquisa dos sorogrupos pela determinação dos antígenos somáticos. Este, porém, não é suficiente para identificar uma amostra como diarreio gênica, devido não estar correlacionado, em alguns casos, com a presença de fatores de virulência²⁴. Portanto, a identificação deve ser direcionada para as características que determinam a virulência desses microrganismos.

Os ensaios fenotípicos para a detecção de toxinas, padrão de aderência ou invasão podem identificar amostras de *E. coli* diarreio gênicas, porém requerem elevados investimentos, técnicas especiais e aplicação de vários sistemas de detecção (ex.: cultura de células, ensaios de citotoxicidade), além de consumo de longo tempo^{2,25}. Com a aplicação da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) é possível detectar genes envolvidos com a patogenicidade de diversos isolados bacterianos, permitindo simples identificação³⁴.

Na investigação de patógenos a PCR é indicada para a amplificação de uma região específica do DNA que permite a detecção de determinado *locus* de virulência. Técnicas de PCR convencionais para a pesquisa de *E. coli* diarreio gênicas tem sido relatadas, porém, a investigação dos isolados bacterianos requer um grande número de reações individuais para a detecção de vários fatores de virulência, o que a torna laboriosa²⁰.

Para reduzir o número de testes necessários para a identificação de DEC, vários sistemas de PCR de detecção múltipla (multiplex) para a amplificação simultânea de dois ou mais *loci* em uma única reação têm sido desenvolvidos^{25,27,50}. Entretanto, usualmente, mais de uma PCR multiplex é requerida⁴³. Para simplificar e diminuir o tempo para o diagnóstico diferencial, foram desenvolvidos neste estudo, sistemas de PCR multiplex aplicados para

identificação das seguintes categorias de DEC, cujos marcadores de virulência já estão bem definidos: ETEC, EPEC, EIEC e STEC.

MATERIAIS E MÉTODOS

ISOLADOS BACTERIANOS

Este estudo incluiu 720 *E. coli* estocadas na bacterioteca da Seção de Bacteriologia e Micologia do Instituto Evandro Chagas (IEC), caracterizadas por métodos fenotípicos tradicionais como descrito previamente⁵. As *E. coli* foram isoladas de amostras fecais de 181 indivíduos maiores de 18 anos de idade infectados pelo HIV, durante os anos de 2000 a 2002.

O projeto que deu origem a este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do IEC sob parecer n° 02/2000 em 26 de maio de 2000.

PCR

Para a investigação dos fatores de virulência, as amostras foram repicadas para tubos de ensaio com ágar TSI (Difco), incubadas a 37° C por 24 h e posteriormente repicadas para tubos com ágar TSA (Difco) para extração do DNA. Para a extração do DNA bacteriano utilizou-se a técnica de termo-extração, tendo o crescimento bacteriano sido transferido para microtubos com 400 µL de água purificada esterilizada e submetido a 100° C por 10 min. Após a fervura, a suspensão foi congelada a -20° C. Depois dessa etapa, a suspensão foi descongelada e centrifugada a 13.000 rpm (16845xg) em microcentrífuga (mod. NT-805, Nova Técnica).

As categorias diarreio gênicas EPEC, ETEC, EIEC e STEC foram investigadas através de realização de PCR simples para sete diferentes marcadores moleculares, de acordo com condições estabelecidas em estudos anteriores (Quadro 1).

Fatores de virulência (genes)	Iniciador	Sequência (5' – 3')	Produto (pb)	Referência
Toxina termoestável (<i>est</i>)	ST-1 ST-2	CTGTATTGCTTTTTACCT GCACCCGGTACAAGCAGGAT	182	Tornieporth ⁴⁴ (1995)
Toxina temolábil (<i>elt</i>)	LT-1 LT-2	GCGACAAATTATACCGTGCT CCGAATTCTGTTATATATGT	707	Tornieporth ⁴⁴ (1995)
Fímbria 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 invasão (<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)

Quadro 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR e seus respectivos alvos e produtos de amplificação

As *E. coli* diarréio-gênicas foram classificadas conforme a presença de genes de fatores de virulência, de acordo com critérios previamente publicados (Quadro 2)⁷.

Categorias patogênicas	Genes de virulência característicos
EPEC típica	<i>eae</i> (intimina) e <i>bfpA</i> (fímbria BFP), com ausência dos genes <i>stx</i> (toxina Shiga)
EPEC atípica	<i>eae</i> (intimina) com ausência de <i>stx</i> (toxina Shiga)
ETEC	<i>elt</i> e/ou <i>est</i> (enteroxinas)
EIEC	<i>ipaH</i> (antígeno de invasão)
STEC	<i>stx1/2</i> e/ou <i>eae</i> (intimina)

Quadro 2 – Classificação molecular das categorias diarréio-gênicas de *E. coli*

Cada reação apresentou volume final de 50 μ l contendo 1 mM de deoxinucleotídeos (Invitrogen), 10 pmol de cada oligonucleotídeo (Invitrogen), 1,5 mM de $MgCl_2$ (Invitrogen), tampão de Taq DNA polimerase 1 \times (Invitrogen), 0,25 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), e 3 μ l de DNA. As condições de amplificação compreenderam desnaturação inicial a 94° C por 5 min, 35 ciclos com 1,5 min a 94° C, 1,5 min a 50°/56° C e 1,5 min a 72° C e extensão final por 10 min a 72° C. As reações foram realizadas em termociclador (mod. CE 3832, Thermo Hyband). Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose D-1 LE GQT a 2% (BioAmerica) contendo 1 μ g/mL de brometo de etídeo (Sigma) e visualizados em transiluminador UVP (Biolmaging Systems).

Para desenvolver os ensaios de PCR multiplex foram testadas várias temperaturas de anelamento, concentrações de reagentes e incorporação progressiva dos oligonucleotídeos. A sensibilidade e a especificidade da reação foram ensaiadas com as cepas de referências E2348/69 (EPEC), H10407 (ETEC LT-1/STa), EDL1284 (EIEC) e EDL933 (STEC). A cepa de *E. coli* K12 foi usada como controle negativo. Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos no quadro 1.

RESULTADOS

Para identificação simultânea e diferenciação de quatro categorias diarréio-gênicas de *E. coli* foram desenvolvidos dois sistemas de PCR multiplex (Sistemas 1 e 2) contendo, respectivamente, três e quatro pares de iniciadores (Quadro 3).

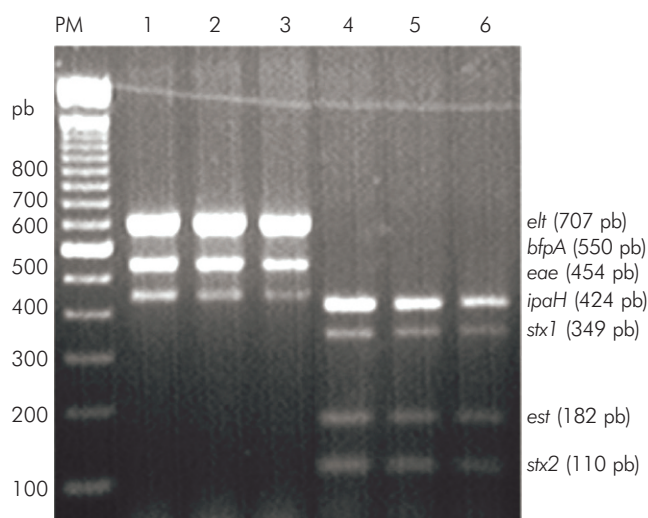
Sistemas	Genes*	Iniciadores	Anelamento (°C)	Produtos de PCR (pb)
PCR multiplex 1	<i>elt</i>	LT-1/LT-2	50	707
	<i>bfpA</i>	EP1-1/EP-2	50	550
	<i>eae</i>	EAE-1/EAE-2	50	454
PCR multiplex 2	<i>ipaH</i>	EI-1/EI-2-1	56	424
	<i>stx-1</i>	STX-1A/STX-1B	56	349
	<i>est</i>	ST1/ST2	56	182
	<i>stx-2</i>	STX-2A/STX-2B	56	110

* *lt*: gene da toxina termolábil; *bfpA*: gene da fímbria BFP; *eae*: gene da proteína intimina; *ipaH*: gene do antígeno de invasão; *stx1*: gene da toxina de Shiga 1; *stx2*: gene da toxina de Shiga 2; *st*: gene da toxina termoestável.

Quadro 3 – Combinação de iniciadores nos sistemas de PCR multiplex para de detecção das categorias diarréio-gênicas de *E. coli*

Quando os pares de oligonucleotídeos foram incorporados nos sistemas multiplex, uma interferência foi observada. Este foi o caso de LT-1/LT-2 que sob a concentração de 10 pmol/ μ L inibiu a amplificação de *eae*. Nesta situação, a modificação da concentração de LT-1/LT-2 para 5 pmol/ μ L foi suficiente para favorecer a amplificação do alvo esperado (*eae*).

Apenas os *loci* alvos foram detectados nos controles positivos, sem que houvesse o aparecimento de amplificações inespecíficas. Como controle positivo dos sistemas de PCR multiplex foi utilizada uma mistura contendo o DNA das cepas de referência, observando-se reprodutibilidade com os resultados obtidos na PCR simples. As amplificações visualizadas nos sistemas 1 e 2 de PCR multiplex estão demonstradas na figura 1.



PM: Marcador de peso molecular de 100 pb.

Figura 1 – Perfil eletroforético dos *loci* característicos de *E. coli* diarréio-gênicas amplificados nos sistemas de PCR multiplex 1 (1 – 3) e 2 (4 – 6) em gel de agarose a 2%

A especificidade dos produtos obtidos nas reações de PCR multiplex foi determinada pelo estudo das amostras de referência. Para validação dos sistemas de PCR multiplex desenvolvidos e demonstração da utilidade diagnóstica, foram analisados os 78 isolados caracterizados por PCR simples como DEC e o triplo de amostras (234 isolados) com resultados de PCR negativos, compreendendo o total de 312 testes.

Dentre as 720 *E. coli* testadas por PCR simples 78 (10,8%) apresentaram um ou mais genes característicos de DEC, sendo identificadas em: EIEC (n = 34), EPEC (n = 29), ETEC (n = 13) e STEC (n = 2). Das 29 EPEC encontradas 28 foram classificadas como EPEC atípicas, pela ausência do gene *bfpA* (fímbria BFP). As 13 ETEC foram caracterizadas como LT-1 (n = 2) e STa (n = 11). Um total de 34 isolados pertencem a categoria EIEC. Duas STEC foram identificadas, sendo *stx1* e *eae* positivas. Na análise comparativa dos dados obtidos foi encontrada concordância 100% entre os resultados de PCR simples e multiplex.

DISCUSSÃO

Algumas DEC são geneticamente diferenciadas das demais pela presença de genes codificantes de fatores de virulência específicos que têm sido utilizados na identificação^{6,7,29,35,39}. Dentre esses, a detecção simultânea de múltiplos genes de virulência através de ensaios de PCR multiplex tem sido executada^{4,36,41}. Para reduzir o número de PCR realizadas, nós desenvolvemos dois sistemas de PCR multiplex para detecção de sete genes de fatores de virulência, característicos de quatro patótipos: EPEC, ETEC, EIEC e STEC. Embora sejam conhecidas seis linhagens de *E. coli* diarreio gênicas, somente aquelas quatro apresentam marcadores de virulência bem definidos²⁹.

Alguns estudos têm sugerido alvos moleculares para caracterização de EAEC, como os genes *setBA*, *aaiA*, *astA* e *aat*. Entretanto, observou-se que alguns destes marcadores não são exclusivos dessa categoria^{17,19}. Os genes *afa*, *dra* e *daa*, codificadores de uma família de adesinas, têm sido utilizados para caracterização de DAEC, porém os mesmos podem estar presentes em *E. coli* não patogênicas²². Portanto, devido a essas peculiaridades, recomenda-se a inclusão de ensaios de aderências em cultura de células HEp-2 ou HeLa como método padrão-ouro para definição das categorias EAEC e DAEC²⁹.

São crescentes as descrições de sistemas de PCR para identificação simultânea de múltiplos *loci*. Pass et al³³ realizaram PCR multiplex para detecção de 11 diferentes fatores de virulência, entretanto utilizaram quatro sistemas, o que representa pouca praticidade. Nguyen et al³¹ apresentaram um ensaio de PCR multiplex para detecção de oito genes característicos de EPEC, ETEC, EIEC, STEC e EAEC, porém com baixa resolutividade entre ETEC-LT e EIEC (diferenças de 2 pb entre os fragmentos característicos dessas categorias). Müller et al²⁸ também desenvolveram um sistema de PCR multiplex para identificação de DEC, no entanto aplicado apenas às categorias EPEC e EIEC.

Outros estudos relataram o uso de PCR multiplex para identificação de vários patótipos^{6,20,30,43,48}. Entretanto, apresentam como limitação a inabilidade de diferenciar todas as categorias de DEC, principalmente em infecções mistas de por EPEC atípicas e STEC, tornando necessária a realização de outras PCR para verificação dos resultados.

Neste estudo foram desenvolvidos dois sistemas de PCR multiplex de rápida otimização, simples execução, fácil implantação na rotina de laboratórios de referência, baratos – quando comparados aos sistemas de PCR que utilizam marcadores fluorescentes – e que dispensam a realização de PCR adicionais para esclarecimento dos resultados, como por exemplo, na presença de patótipos que compartilhem marcadores de virulência. O método permitiu a identificação de quatro categorias diarreio gênicas, representando 10,8% dos isolados, com predomínio de EIEC seguido de EPEC, com maior prevalência da subcategoria atípica.

As EIEC são capazes de invadir a mucosa intestinal causando ocasionalmente quadro de disenteria. Estudos relatam a incidência muito baixa para essa categoria, sendo a maior ocorrência relacionada a surtos e entre crianças de países em desenvolvimento^{13,14,15,23,26}. Investigações realizadas no Brasil sobre enteropatógenos envolvidos com diarreia infantil demonstraram baixa frequência de EIEC^{11,37}, contrastando com os achados deste estudo. Entretanto, tal diferença pode estar associada à faixa etária e população pesquisada, sendo que naqueles estudos foram investigadas crianças e, no presente trabalho, se avaliou isolados provenientes de indivíduos adultos infectados pelo HIV. Em estudo com indivíduos infectados pelo HIV no Senegal, o patótipo EIEC representou a segunda categoria de *E. coli* mais prevalente¹², semelhante ao encontrado neste trabalho.

Dos 29 isolados de EPEC, 28 foram classificados como EPEC atípicas. A divisão de amostras de EPEC em típicas e atípicas tem importante implicação clínico-epidemiológica, antes não valorizada. Por muitos anos, alguns sorotipos de EPEC típicas associados à diarreia infantil foram isolados com frequência, mas tem sido observada a redução desta subcategoria e um aumento relativo do isolamento de EPEC atípicas em muitos países^{1,18,21,40,45,46,49}. Alguns trabalhos sugerem que as EPEC atípicas sejam tão patogênicas quanto às típicas, embora tenha sido relatado que a diarreia provocada por essa subcategoria seja mais branda⁵¹. Há registros também de que as EPEC atípicas estejam mais significativamente associadas à diarreia endêmica ou como causa de surtos^{9,10,51}.

Duas STEC *stx1* e *eae* positivas foram identificadas. As infecções devido a STEC são relatadas em casos esporádicos no Brasil^{3,6,11,16}, sendo este o primeiro relato de isolamento dessa categoria em indivíduos infectados pelo HIV no Estado do Pará.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram a diversidade de patótipos de *E. coli* isolados de indivíduos infectados pelo HIV, com predomínio de EIEC e EPEC atípicas. Os sistemas de PCR multiplex mostraram-se como metodologia simples, econômica e eficiente para rápida triagem e identificação de isolados de DEC, e desta forma podem ser incorporados à rotina de laboratórios de referência, dando suporte às atividades de vigilância epidemiológica desenvolvidas pelos institutos de saúde pública.



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.

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

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* enteropatogénicas (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.



REFERÊNCIAS

- 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.

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