

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

***“Marcadores de enteropatogenicidade em amostras de Escherichia coli isoladas de crianças indígenas - etnia Guarani, Sul do estado do Rio de Janeiro”***

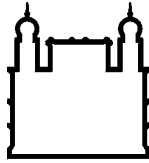
*por*

***Carla Verçoza Lopes Coelho***

*Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Saúde Pública.*

*Orientadora principal: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Hamond Regua Mangia  
Segundo orientador: Prof. Dr. André Reynaldo Santos Périssé*

*Rio de Janeiro, março de 2013.*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



*Esta dissertação, intitulada*

***“Marcadores de enteropatogenicidade em amostras de Escherichia coli isoladas de crianças indígenas - etnia Guarani, Sul do estado do Rio de Janeiro”***

*apresentada por*

***Carla Verçoza Lopes Coelho***

*foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:*

Prof. Dr. Andrey Moreira Cardoso

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Sotero Martins

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Hamond Regua Mangia – Orientadora principal

**Este trabalho foi realizado no Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca/Fundação Oswaldo Cruz.**

**Aos meus avôs maternos Maria Eugênia Maia Verçoza e Jorge Franklin Verçoza com todo meu amor.**

## **AGRADECIMENTOS**

A minha Orientadora da Dissertação de Mestrado Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Hamond Regua Mangia, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (Ensp/Fiocruz), por todos os ensinamentos, por sua confiança e dedicação.

Ao meu segundo orientador Prof. Dr. André Reynaldo Santos Périssé, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (Ensp/Fiocruz), também por todos os seus muitos ensinamentos durante meu percurso pelo Mestrado.

Aos professores do Programa de Saúde Pública Adriana Hamond Regua Mangia, André Reynaldo Santos Périssé, Antonio Nascimento Duarte, Elvira Maria Godinho de Seixas Maciel, Joseli Maria da Rocha Nogueira, Rosemere Duarte, Sonia Duarte de Azevedo Bittencourt e Valmir Laurentino Silva entre outros pelas disciplinas ministradas e pela dedicação ao compartilhar seus conhecimentos com os alunos.

A todos os componentes do Departamento de Ciências Biológicas (DCB) agradeço de coração pelo acolhimento e colaboração durante esses anos. Agradeço especialmente a técnica Rose Mary Pimentel Bezerra pelos auxílios prestados durante o desenrolar da Dissertação.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia Paula Rosa do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Faculdade de Ciência Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) por ter permitido o desenvolvimento de uma parte de minha Dissertação em seu laboratório.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tânia Tardelli, Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), por ter colaborado gentilmente com o trabalho, cedendo resultados obtidos pela sua equipe na realização de umas das técnicas do estudo.

A Tecnologista e Mestre Diana Marinho por fornecer dados e imagens sobre a população do estudo.

Ao aluno da Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia Paula Rosa, Ricardo Braga (Mestrando) pelos ensinamentos, conversas, amizade e auxílio indispensável no desenvolvimento de uma das técnicas da minha pesquisa de Mestrado.

Aos Professores doutores Adriana Sotero Martins, Andrey Moreira Cardoso, Fernanda Nunes Santos e Ana Paula DALincourt Carvalho Asséf por participarem como componentes da banca de defesa da minha dissertação de mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido durante o mestrado.

A minha companheira de subárea que se tornou uma grande amiga Amanda Codeço, que por muitas vezes me deu apoio nos momentos mais difíceis enfrentados para concluir a Dissertação.

A todos os meus colegas de subárea, pelos conselhos e amizade.

Aos meus familiares, principalmente a minha mãe, Rosane Maia Verçoza e meu pai Carlos Antônio Almeida Lopes Coelho pelo auxílio de conhecimentos. Aos meus avós maternos e paternos por nutrirem os valores morais da minha família. Aos meus primos queridos, que além de me apoiarem nas horas difíceis, estão comigo nas horas alegres. Ao meu irmão, que é uma das pessoas que mais me conhece.

As amigas Esther Padilha, Julia Queiroz, Karina Menezes, Letícia Wolowski, Leila Spelta, Luiza Xavier, Maria Isabel MacDowell, Marcela Antunes, Mariana Azpiazu, Mariana Gonçalves e Marianna Borges pelos muitos momentos de descontração.

***“Aprendi que são os pequenos acontecimentos diários que tornam a vida espetacular.”***  
**(William Shakespeare)**

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	01
1.1	<i>Escherichia coli: potencialidades da espécie bacteriana</i>	01
1.2	<i>Patotipos intestinais de Escherichia coli</i>	02
1.2.1	<i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC)	03
1.2.2	<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	04
1.2.3	<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga (STEC)	06
1.2.4	<i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	06
1.2.5	<i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	08
1.2.6	<i>E. coli</i> de aderência difusa (DAEC)	08
1.3	<i>Aspectos de resistência a antimicrobianos</i>	09
1.4	<i>Escherichia coli ambiental</i>	10
1.5	<i>Métodos laboratoriais de caracterização de populações de E. coli</i>	10
1.5.1	Métodos moleculares de detecção dos patotipos de <i>E. coli</i>	11
1.5.2	Agrupamento filogenético de <i>E. coli</i>	11
1.5.3	Diversidade genética	12
1.5.4	Aderência em <i>E. coli</i>	13
1.6	<i>Aspectos da saúde indígena no Brasil</i>	13
1.7	<i>Etnia Guarani</i>	14
1.7.1	Aldeias Guarani no sul do estado do Rio de Janeiro	15
<b>2.</b>	<b>OBJETIVO</b>	17
2.1	<i>Objetivo geral</i>	17
2.2	<i>Objetivos específicos</i>	17
<b>3.</b>	<b>METODOLOGIA</b>	18
3.1	<i>Desenho do estudo e amostras bacterianas</i>	18
3.2	<i>População de estudo</i>	18
3.3	<i>Aspectos éticos</i>	21
3.4	<i>Métodos laboratoriais de investigação: Métodos genotípicos</i>	21
3.4.1	Ensaio de amplificação para a detecção de genes de enteropatogenicidade (PCR-Multiplex)	21
3.4.2	Ensaio de hibridização em colônias para a detecção de genes de enteropatogenicidade	23
3.4.3	Diversidade genética	24



3.4.4	Tipagem filogenética -----	25
3.5	<i>Métodos laboratoriais de investigação: Métodos fenotípicos</i> -----	26
3.5.1	Ensaio de aderência empregando células epiteliais em cultura -----	26
3.5.2	Testes de suscetibilidade a antimicrobianos-----	27
3.6	<i>Análises estatísticas</i> -----	27
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> -----	29
4.1	<i>Isolamento e identificação de E. coli</i> -----	30
4.2	<i>PCR-Multiplex para a detecção de genes de enteropatogenicidade</i> -----	30
4.2.1	Distribuição dos genes de enterovirulência detectados por PCR-Multiplex por aldeia indígena-----	31
4.3	<i>Ensaio de hibridização em colônias para a detecção de genes de enteropatogenicidade</i> -----	33
4.3.1	Distribuição dos genes de enterovirulência detectados por hibridização em colônias por aldeia indígena -----	33
4.4	<i>PCR-Multiplex e hibridização em colônias: sensibilidade para a detecção dos patótipos</i> -----	34
4.4.1	Distribuição das amostras potencialmente enterovirulentas-----	35
4.5	<i>PCR-Triplex para agrupamento filogenético de E. coli</i> -----	37
4.5.1	Filotipagem por aldeia indígena-----	38
4.6	<i>Método fenotípico: Aderência em células HEp-2 em cultura para amostras potencialmente enterovirulentas</i> -----	39
4.6.1	Distribuição por aldeia indígena dos padrões fenotípicos de aderência em células de cultura para amostras potencialmente enterovirulentas -----	43
4.7	<i>Método fenotípico: Aderência em células HEp-2 em cultura para amostras carreadoras dos genes ast e pic</i> -----	44
4.7.1	Distribuição por aldeia indígena dos padrões fenotípicos de aderência em células de cultura para amostras carreadoras dos genes ast e pic -----	46
4.8	<i>Método fenotípico: Resistência a antimicrobianos</i> -----	47
4.8.1	Padrão de resistência a antimicrobianos por aldeia indígena-----	50
4.9	<i>Método fenotípico: Padrão de resistência intermediária a antimicrobianos</i> ---	54
4.10	<i>Padrão de multirresistência a antimicrobianos e suas classificações</i> -----	59
4.11	<i>Padrão de resistência a antimicrobianos nas amostras potencialmente enterovirulentas por aldeia indígena</i> -----	61
4.12	<i>Amplificação randômica do DNA polimórfico (RAPD-PCR)</i> -----	61

4.12.1	Análise da relação de identidade genética-----	63
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> -----	<b>68</b>
5.1	<i>Propriedades e potencialidades de virulência das amostras bacterianas isoladas nas diferentes aldeias indígenas</i> -----	69
5.2	<i>Prevalência dos patotipos intestinais de E. coli (DEC)</i> -----	70
5.2.1	<i>Escherichia coli enteropatogênica atípica (aEPEC)</i> -----	70
5.2.2	<i>Escherichia coli enteroagregativa (EAEC)</i> -----	70
5.2.3	<i>Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC)</i> -----	72
5.3	<i>Agrupamento filogenético das amostras potencialmente enterovirulentas</i> -----	72
5.4	<i>Amplificação randômica do DNA polimórfico</i> -----	73
5.5	<i>Heterogeneidade genética e seu papel na gênese da diarreia</i> -----	73
5.6	<i>Análises estatísticas: ocorrência dos patotipos intestinais entre crianças de aldeias indígenas</i> -----	74
5.7	<i>Padrões fenotípicos de aderência em células epiteliais HEp-2 em cultura nas amostras potencialmente enterovirulentas</i> -----	74
5.8	<i>Padrões fenotípicos de aderência em células epiteliais HEp-2 em cultura nas amostras carreadoras dos genes astA e pic</i> -----	75
5.9	<i>Perfil de resistência a antimicrobianos nas amostras bacterianas incluídas no estudo</i> -----	76
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> -----	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>COLABORADORES</b> -----	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> -----	<b>81</b>
ANEXO 1	-----	91
ANEXO 2	-----	92

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Isolamento de <i>E. coli</i> a partir da população do estudo-----	30
<b>Tabela 2.</b> Distribuição por aldeia indígena de amostras carreadoras dos genes de enterovirulência obtidas a partir do ensaio PCR-Multiplex-----	32
<b>Tabela 3.</b> Distribuição por aldeia indígena de amostras carreadoras dos genes de enterovirulência obtidas a partir do ensaio Hibridização -----	34
<b>Tabela 4.</b> Amostras potencialmente enterovirulentas definidas como patotipos pelos ensaios de amplificação e hibridização -----	35
<b>Tabela 5.</b> Distribuição por aldeia indígena de marcadores genéticos de enterovirulência investigados nas amostras de <i>E. coli</i> a partir dos ensaios de amplificação e de hibridização -----	37
<b>Tabela 6.</b> Grupo e perfil filogenético das amostras de <i>E. coli</i> potencialmente enterovirulentas incluídas no estudo-----	38
<b>Tabela 7.</b> Distribuição por aldeia indígena das amostras potencialmente enterovirulentas entre os filogrupos -----	39
<b>Tabela 8.</b> Distribuição dos perfis de aderência entre as amostras potencialmente enterovirulentas -----	42
<b>Tabela 9.</b> Distribuição por aldeia indígena dos perfis de aderência entre as amostras potencialmente enterovirulentas -----	43
<b>Tabela 10.</b> Distribuição dos perfis de aderência entre as amostras carreadoras dos genes <i>astA</i> e/ou <i>pic</i> -----	45
<b>Tabela 11.</b> Distribuição por aldeia indígena dos perfis de aderência entre as amostras carreadoras dos genes <i>astA</i> e/ou <i>pic</i> -----	47
<b>Tabela 12.</b> Perfis de resistência a antimicrobianos encontrados nas amostras de <i>E. coli</i> incluídas no estudo-----	48

<b>Tabela 13.</b> Distribuição das amostras de <i>E. coli</i> resistentes aos antimicrobianos conforme classe e grupo de antimicrobianos -----	49
<b>Tabela 14.</b> Perfis de resistência a antimicrobianos encontrados nas amostras de <i>E. coli</i> isoladas da aldeia Sapukai-----	51
<b>Tabela 15.</b> Perfis de resistência a antimicrobianos encontrados nas amostras de <i>E. coli</i> isoladas da aldeia Paraty Mirim-----	52
<b>Tabela 16.</b> Perfis de resistência a antimicrobianos encontrados nas amostras de <i>E. coli</i> isoladas da aldeia Araponga -----	53
<b>Tabela 17.</b> Perfis de resistência a antimicrobianos encontrados nas amostras de <i>E. coli</i> isoladas da aldeia Mamanguá -----	53
<b>Tabela 18.</b> Perfis de resistência a antimicrobianos encontrados nas amostras de <i>E. coli</i> isoladas da aldeia Rio Pequeno -----	53
<b>Tabela 19.</b> Perfis de resistência intermediária a antimicrobianos encontrados nas amostras <i>E. coli</i> incluídas no estudo-----	55
<b>Tabela 20.</b> Perfis de resistência intermediária a antimicrobianos encontrados nas amostras de <i>E. coli</i> isoladas da aldeia Sapukai-----	56
<b>Tabela 21.</b> Perfis de resistência intermediária a antimicrobianos encontrados nas amostras de <i>E. coli</i> isoladas da aldeia Mamanguá-----	57
<b>Tabela 22.</b> Perfis de resistência intermediária a antimicrobianos encontrados nas amostras de <i>E. coli</i> isoladas da aldeia Rio Pequeno-----	57
<b>Tabela 23.</b> Perfis de resistência intermediária a antimicrobianos encontrados nas amostras de <i>E. coli</i> isoladas da aldeia Araponga-----	57
<b>Tabela 24.</b> Perfis de resistência intermediária a antimicrobianos encontrados nas amostras de <i>E. coli</i> isoladas da aldeia Paraty Mirim -----	58
<b>Tabela 25.</b> Classificação de todas as amostras incluídas no estudo quanto ao fenótipo de resistência segundo a literatura atual-----	59

<b>Tabela 26.</b> Classificação das amostras bacterianas potencialmente enterovirulentas quanto ao fenótipo de multirresistência segundo literatura atual-----	60
<b>Tabela 27.</b> Distribuição por aldeia indígena dos perfis de resistência a antimicrobianos entre as amostras potencialmente enterovirulentas -----	61
<b>Tabela 28.</b> Representação numérica dos perfis de RAPD-PCR das amostras potencialmente enterovirulentas de <i>E. coli</i> a partir dos iniciadores utilizados -----	63

## LISTA DE QUADROS, GRÁFICOS E FIGURAS

### Quadros

<b>Quadro 1.</b> População de crianças indígenas da etnia Guarani incluídas no estudo ----	20
<b>Quadro 2.</b> Iniciadores de PCR-multiplex para amplificação simultânea de genes específicos relacionados à enterovirulência de <i>E. coli</i> . -----	22
<b>Quadro 3.</b> Sequências utilizadas como sondas radioativas no ensaio de hibridização para a detecção dos patótipos de <i>E. coli</i> -----	23
<b>Quadro 4.</b> Iniciadores utilizados para a amplificação randômica do DNA polimórfico em amostras de <i>E. coli</i> -----	24
<b>Quadro 5.</b> Iniciadores utilizados para o agrupamento filogenético de <i>E. coli</i> (PCR – Triplex) -----	25
<b>Quadro 6.</b> Características genóticas e fenóticas investigadas nas amostras de <i>E. coli</i> potencialmente enterovirulentas -----	65

### Gráficos

<b>Gráfico 1.</b> Representação gráfica geral da incidência da resistência a antimicrobianos -- -----	48
----------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

### Figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema geral dos patótipos intestinais de <i>Escherichia coli</i> definidos conforme seus fatores específicos de enterovirulência -----	03
<b>Figura 2.</b> Padrão de aderência localizada (AL) em <i>E. coli</i> para o patótipo EPEC em ensaio de aderência de 6 horas-----	04

<b>Figura 3.</b> Padrão de aderência agregativa (AA) em <i>E. coli</i> para o patotipo EAEC em ensaio de aderência de 3 horas-----	05
<b>Figura 4.</b> Padrão de aderência difusa em <i>E. coli</i> para o patotipo ETEC em ensaio de aderência de 3 horas -----	07
<b>Figura 5.</b> Padrão de aderência invasiva em <i>E. coli</i> para o patotipo EIEC em ensaio de aderência de 3 horas -----	08
<b>Figura 6.</b> Mapa com a localização das aldeias Araponga, Rio Pequeno, Mamanguá, Sapukai e Paraty Mirim nos municípios de Angra dos Reis e Paraty-----	15
<b>Figura 7.</b> Aldeia Araponga (Esquerda) e aldeia Sapukai (Direita) -----	19
<b>Figura 8.</b> Agrupamento filogenético de <i>E. coli</i> -----	26
<b>Figura 9.</b> Esquema geral de caracterização realizada para as amostras de <i>E. coli</i> incluídas neste estudo -----	28
<b>Figura 10.</b> Perfis eletroforéticos obtidos a partir da amplificação simultânea dos genes de enterovirulência -----	31
<b>Figura 11.</b> Autorradiografia ilustrando filtro hibridizado com fragmentos para o marcador <i>eae</i> -----	33
<b>Figura 12.</b> Perfis eletroforéticos de amostras de <i>E. coli</i> carreadoras dos marcadores filogenéticos -----	38
<b>Figura 13.</b> Fenótipo agregativo exibido por amostra de EAEC em ensaio de aderência de 3 horas -----	39
<b>Figura 14.</b> Fenótipo agregativo exibido por amostra de EAEC em ensaio de aderência de 6 horas -----	40
<b>Figura 15.</b> Fenótipo agregativo exibido por amostra de ETEC em ensaio de aderência de 3 horas -----	40
<b>Figura 16.</b> Fenótipo sem padrão típico exibido por amostra ETEC em ensaio de aderência de 3 horas -----	40

<b>Figura 17.</b> Fenótipo sem padrão típico exibido por amostra ETEC em ensaio de aderência de 6 horas -----	41
<b>Figura 18.</b> Fenótipo agregativo exibido por amostra aEPEC em ensaio de aderência de 3 horas -----	41
<b>Figura 19.</b> Fenótipo agregativo exibido por amostra aEPEC em ensaio de aderência de 6 horas -----	41
<b>Figura 20.</b> Fenótipo sem padrão típico exibido por amostra aEPEC em ensaio de aderência de 3 horas -----	42
<b>Figura 21.</b> Fenótipo sem padrão típico exibido por amostra aEPEC em ensaio de aderência de 6 horas -----	42
<b>Figura 22.</b> Fenótipo agregativo exibido por amostra carreadora do gene <i>pic</i> em ensaio de aderência de 6 horas-----	44
<b>Figura 23.</b> Fenótipo localizado exibido por amostra carreadora do gene <i>astA</i> em ensaio de aderência de 6 horas -----	44
<b>Figura 24.</b> Fenótipo agregativo exibido por amostra carreadora do gene <i>astA</i> em ensaio de aderência de 6 horas-----	45
<b>Figura 25.</b> Fenótipo sem padrão típico exibido por amostra carreadora do gene <i>astA</i> em ensaio de aderência de 6 horas -----	45
<b>Figura 26.</b> Perfis eletroforéticos de amostras potencialmente enterovirulentas de <i>E. coli</i> obtidos a partir da amplificação randômica do DNA polimórfico utilizando os iniciadores 1254, A04 e M13-----	60
<b>Figura 27.</b> Dendrograma gerado a partir da técnica de RAPD-PCR utilizando o iniciador M13 para as amostras definidas como ETEC-----	62
<b>Figura 28.</b> Dendrograma gerado a partir da técnica de RAPD-PCR utilizando o iniciador M13 para as amostras definidas como EAEC-----	63
<b>Figura 29.</b> Dendrograma gerado a partir da técnica de RAPD-PCR utilizando o iniciador M13 para as amostras definidas como aEPEC-----	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

A/E: Efeito *attaching effacing*  
AA: Adesão agregativa  
AD: Adesão difusa  
aEPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica atípica  
AL: Adesão localizada  
ALL: Adesão localizada-*like*  
BFP: Gene pillus estrutural  
CDEC: *cell detaching Escherichia coli*  
CEP: Comitê de Ética em Pesquisa  
CFA: Antígenos de fatores de colonizações  
CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*  
CNS: Conselho Nacional de Saúde  
DAEC: *Escherichia coli* de aderência difusa  
DEC: *Escherichia coli* diarreio gênica  
DNA: Ácido desoxirribonucleico  
EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativa  
EAF: Fator de aderência da EPEC  
EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica  
EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasora  
ENSP: Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca  
EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica  
EPECt: *Escherichia coli* enteropatogênica típica  
ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica  
ExPEC: *Escherichia coli* extraintestinal  
FAS: Coloração de actina por fluorescência  
FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz  
FUNASA: Fundação Nacional de Saúde  
HIV: Vírus da imunodeficiência humana  
HUS: Síndrome hemolítica-urêmica  
LEE: Locus of enterocyte effacement  
LT: Termo-Lábil  
NMEC: *Escherichia coli* causadora de meningite neonatal  
NTEC: *Escherichia coli* necrotoxigênica  
OMS: Organização Mundial de Saúde  
PAI: Ilha de patogenicidade  
PCR: Reação em cadeia da Polimerase  
SESAI: Secretária Especial de Saúde Indígena  
SHU: Síndrome Hemolítica Urêmica  
ST: Termo-Estável  
STEC: *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga  
SUS: Sistema Único de Saúde  
UNICEF: Fundo das Nações Unidas para a Infância  
UPEC: *Escherichia coli* uropatogênica



## RESUMO

As doenças diarreicas constituem um dos mais significativos agravos de saúde pública, principalmente, entre crianças de países em desenvolvimento. Nas populações indígenas a doença diarreica contribui significativamente para elevadas taxas de morbimortalidade infantil. Estudos epidemiológicos conduzidos em todo o mundo reconhecem e destacam a importância da *Escherichia coli* na patogenia destas enteroinfecções, entretanto, não existem informações sobre a circulação desses microrganismos na população em estudo. O objetivo desse estudo consiste em investigar marcadores genotípicos e fenotípicos em amostras de *E. coli* isoladas de crianças de diferentes aldeias Guarani localizadas no sul do estado do Rio de Janeiro, com base nas características de virulência e de resistência aos antimicrobianos. Foram incluídas 314 amostras de *E. coli* provenientes de 57 crianças de 0 a 5 anos de idade, com ou sem diarreia, moradoras das aldeias Araponga, Mamanguá, Rio Pequeno, Sapukai e Paraty Mirim. Para atingir a presente proposta os isolados de *E. coli* foram caracterizados conforme padrão de aderência, sensibilidade a antimicrobianos, diversidade genética e presença de marcadores diarreogênicos. Os resultados obtidos a partir dos ensaios de amplificação e hibridização em colônias categorizaram os isolados como pertencentes aos patótipos diarreogênicos (DEC): aEPEC (56%, 27/48), EAEC (36%, 17/48) e ETEC (8%, 4/48). As amostras DEC foram classificadas nos quatro principais grupos filogenéticos: A (56%; 27/48), B1 (26%; 13/48), B2 e D, 9% cada (4/48). Ensaio de aderência em células epiteliais HEp-2, as amostras ETEC (100%; 4/4) exibiram aderência sem padrão típico, EAEC (100%; 17/17) exibiu o padrão agregativo e as amostras aEPEC o padrão agregativo em 11% (3/27) e o indefinido em 89% (24/27). A resistência a antimicrobianos determinada pelo teste de difusão em ágar, detectou resistência em 88% das amostras (276/314), definindo 72 perfis sendo 8 para padrões isolados de antimicrobianos (AMI, AMP, CFL, CPM, GEN, NIT, NOR e SUT) e 64 de multirresistência para até 11 antimicrobianos. A análise do genoma total investigada pela amplificação randômica do DNA polimórfico revelou uma elevada diversidade entre as amostras de *E. coli* carreadoras dos marcadores de enteropatogenicidade caracterizando populações bacterianas de origem não-clonal. A detecção de patótipos intestinais e a circulação de amostras multirresistentes alerta para ações específicas na área de vigilância em saúde indígena.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli* ; virulência; doença diarreica ; população indígena

## ABSTRACT

Diarrhea disease is an important public health problem, especially among children in developing countries. In the indigenous population, diarrheal disease contributes to high rates of morbidity and mortality among children. Epidemiological studies conducted worldwide recognize and highlight the role of *Escherichia coli* in the pathogenesis of these infections, however there are no reports of these microorganisms in the indigenous population. The aim of this study was to investigate genotypic and phenotypic traits in *E.coli* isolates obtained from children living in different Guarani villages in the southern state of Rio de Janeiro state. The study included 314 *E. coli* isolates recovered from 57 indigenous children up to 5 years old, with and without diarrhea, living in Araponga Mamanguá, Rio Pequeno, Sapukai and Paraty Mirim villages. To achieve this proposal, *E. coli* isolates were characterized according to adherence patterns, antimicrobial susceptibility, genetic diversity and the presence of diarrheagenic *E. coli* group markers. Based on the results from amplification and colony blot hybridization assays, *E. coli* strains were categorized as belonging to diarrheagenic pathotypes (DEC): aEPEC (56%, 27/48), EAEC (36%, 17/48), and ETEC (8%, 4/48). *E. coli* strains were categorized into the four major phylogenetic groups: A (56%, 27/48), B1 (26%, 13/48), B2 and D (each 9%, 4/48). Adherence assays on HEp-2 epithelial cells, revealed that ETEC strains were adherent but exhibited no typical pattern (100%, 4/4), EAEC exhibited the aggregative phenotype (100%, 17/17) and, aEPEC strains were adherent expressing the aggregative (11%, 3/27) and undefined patterns (89%, 24/27). Antimicrobial resistance determined by the disk diffusion technique detected the resistance phenotype in 88% (276/314) of the studied population, defining 72 resistant profiles, 8 resistant patterns to single antibiotics (AMI, AMP, CFL, CPM, GEN, NIT, NOR and SUT) and 64 multidrug-resistant patterns to up 11 to antimicrobials. Random amplification of polymorphism DNA profiles (RAPD-PCR) used to investigate the variability and relatedness among DEC strains revealed a high degree of polymorphism suggesting that these microorganisms have a non-clonal origin. The detection of *E. coli* strains carrying diarrheagenic markers and high rates of multidrug- resistance alerts for specific actions in indigenous health surveillance.

**Key-words:** *Escherichia coli* ; virulence; diarrheal disease ; indigenous population

# 1 INTRODUÇÃO

---

As infecções diarreicas são reconhecidas como um relevante problema de saúde pública impactando significativamente nas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente, de países em desenvolvimento. Anualmente são estimadas aproximadamente 840 mil mortes no mundo associadas com a doença diarreica em crianças abaixo de cinco anos (WHO, 2011). O grau de desenvolvimento de um país está relacionado, dentre outras condições, à disponibilidade de água potável, saneamento básico, acesso aos serviços de saúde e estado nutricional da população (Wenneras & Erling, 2004). Estes aspectos estão intimamente ligados à incidência da doença diarreica em países em desenvolvimento, onde há alta prevalência de diversos patógenos intestinais de etiologia viral, bacteriana e parasitária. Dentre os patógenos bacterianos de maior distribuição mundial, destaca-se a espécie *Escherichia coli*, cujas linhagens patogênicas (ou patotipos) são diferenciadas basicamente pelos sorotipos, manifestações clínico-epidemiológicas, e principalmente, pelos seus fatores específicos de virulência (Clarke, 2001; Walker *et al*, 2010). Na América Latina, a gastroenterite aguda permanece como uma das principais causas de morbimortalidade em crianças e uma das mais importantes em adultos (Sanchez & Holmgren, 2005; Walker *et al*, 2010). A gastroenterite nos povos indígenas é a segunda maior causa de morbimortalidade entre crianças abaixo de 5 anos de idade, apenas menor do que a incidência das infecções respiratórias agudas (Cardoso, 2010).

## 1.1. *Escherichia coli*: potencialidades da espécie bacteriana

Esta espécie bacteriana foi primeiramente descrita pelo pediatra alemão Theodor Escherich em 1885, que observou sua alta prevalência na microbiota intestinal de indivíduos saudáveis, bem como seu potencial para causar doença quando inoculadas diretamente em sítios extraintestinais (Robins-Browne & Hartland, 2002; Kaper, 2005). *Escherichia coli* é uma espécie do gênero *Escherichia* juntamente com *E. blattae*, *E. fergussonii*, *E. vulneris*, *E. albertii* e *E. hermannii*, sendo a *E. coli* a espécie mais comumente isolada de infecções em humanos (Huys *et al*, 2003; Torres, 2010). *E. coli* pertence a família *Enterobacteriaceae*, constituída por bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos, oxidase negativas, catalase positivas, que reduzem nitrato em nitrito e são fermentadores de glicose (Torres, 2010 Belkum *et al*, 2012).

Embora a maioria dessas subpopulações seja comensal, a espécie também pode incluir micro-organismos oportunistas, os quais podem carrear fatores de enterovirulência, como a produção de toxinas e de adesinas diversas que participam mediando a aderência e a colonização bacteriana no trato gastrointestinal (Torres, 2010). Um dos primeiros relatos de seu papel enteropatogênico foi em 1945, quando John Bray demonstrou que bactérias pertencentes a essa espécie, denominada na época por Theodor Escherich de *Bacterium coli*, era frequentemente isolada de surtos epidêmicos de diarreia infantil e raramente encontrada em crianças saudáveis (Robins-Browne & Hartland, 2002). Atualmente, *Escherichia coli* é genericamente classificada como comensal (colonizadores intestinais não-patogênicos) ou categorizada em linhagens patogênicas, incluindo os patotipos diarreio gênicos de *E. coli* (DEC) e as linhagens envolvidas em infecções de sítios extraintestinais (ExPEC), que inclui a *E. coli* uropatogênica (UPEC) e a *E. coli* meningite neonatal (NMEC) (Kaper *et al.*, 2004; Johnson & Russo, 2005; Torres, 2010).

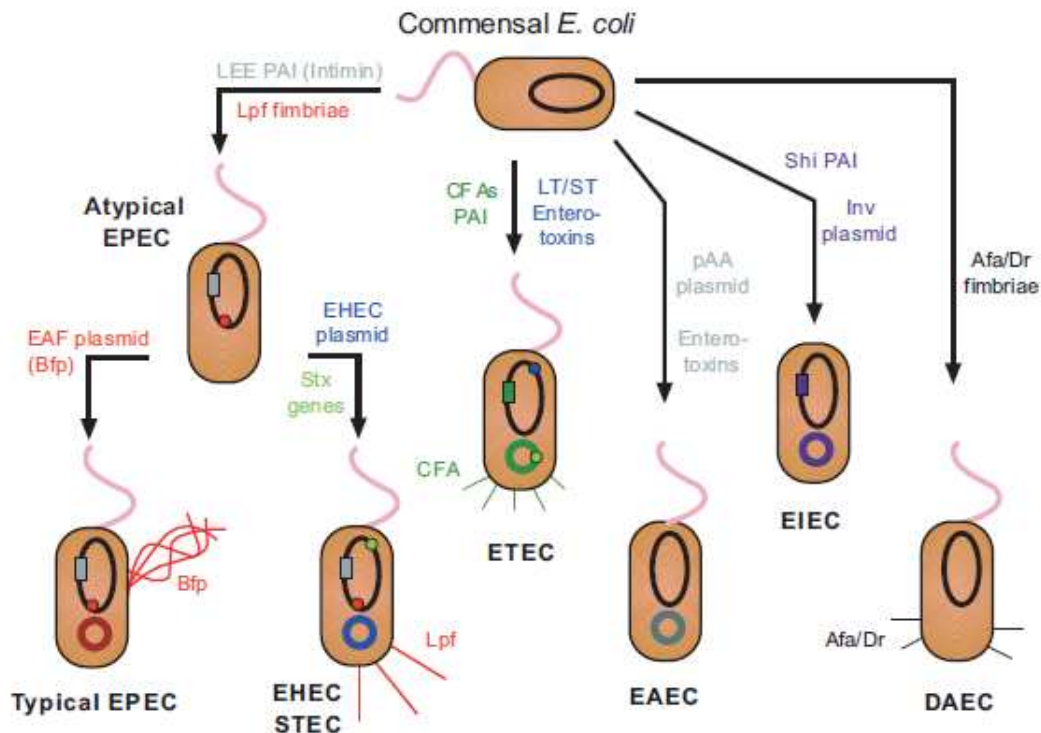
## 1.2. Patotipos intestinais de *Escherichia coli*

A transmissão clássica dos patotipos DEC é sempre fecal-oral. O quadro infeccioso pode ser assintomático ou sintomático, se manifestando de forma aguda ou persistente, com amplo espectro clínico, apresentando desde quadros leves até mais graves, podendo evoluir para sequelas e até mesmo a morte (Robins-Browne & Hartland, 2002; Torres, 2010).

A identificação laboratorial de *E. coli* é baseada em características bioquímicas, entretanto, a detecção de suas linhagens diarreio gênicas requer a complementação da caracterização bacteriana baseada em propriedades fenotípicas e genotípicas. Para isso, alguns testes podem ser utilizados como: sorotipagem, ensaios de adesão empregando células epiteliais em cultura e diferentes técnicas de biologia molecular para a detecção do potencial de enterovirulência (Marshall *et al.*, 2009; Regua-Mangia *et al.*, 2009b).

Seis categorias diarreio gênicas (DEC) ou patotipos são atualmente reconhecidos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* que adere difusamente (DAEC) (Figura 1). A diferença entre os patotipos se dá conforme os fatores específicos de enterovirulência, o que permitiu o desenvolvimento de técnicas diagnósticas para a busca dos genes codificados em elementos genéticos, como plasmídeos, cromossomos e ilhas de patogenicidade (Foley *et al.*, 2009; Belkum *et al.*, 2012). Outros grupos potencialmente patogênicos são descritos como, por exemplo, *cell detaching E. coli* (CDEC) e

*neurotoxicogenic E. coli* (NTEC) mas ainda requerem estudos mais detalhados para o reconhecimento de sua enteropatogenicidade (Clarke, 2001; Croxen & Finlay, 2010).

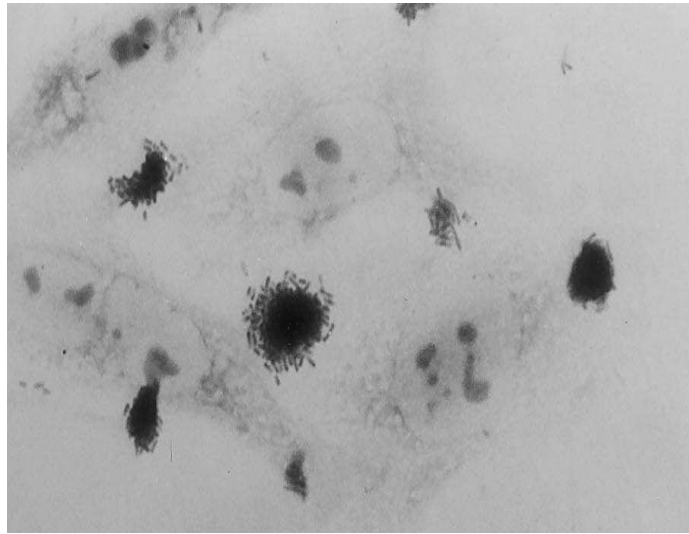


**Figura 1.** Esquema geral dos patótipos intestinais de *Escherichia coli* definidos conforme seus fatores específicos de enterovirulência. FONTE: Torres, 2010.

### 1.2.1 *E. coli* enteropatogênica (EPEC)

A EPEC foi a primeira categoria diarreio gênica a ser descrita e os sinais e sintomas clássicos podem incluir diarreia líquida, febre, náuseas e vômito (Torres, 2010). EPEC pode estar associada com quadro persistente, geralmente comprometendo crianças abaixo de 2 anos de idade e moradoras de países em desenvolvimento (Ochoa *et al*, 2008). As EPEC carregam o gene *eae*, localizado na ilha de patogenicidade (PAI) conhecida como LEE (*locus of enterocyte effacement*), que codifica a intimina, que é a adesina que promove a adesão íntima levando a formação da lesão A/E (*attaching effacing*). Ensaios com células epiteliais em cultura revelaram que as EPEC típicas (EPECt) exibem um padrão de aderência localizada em ensaios de 3 e 6 horas (AL ou LA- *localized adherence*), caracterizado pela formação de microcolônias (Figura 2). Variantes no fenótipo AL têm sido observadas caracterizando o padrão LAL (*localized adherence like*). O fenótipo AL está associado com a expressão da fímbria BFP (*bundle forming pillus*), codificada no gene *bfpA* e as EPEC são classificadas

como típicas ou atípicas, baseada na presença (típica) ou na ausência (atípica) do gene *bfpA* (Yamamoto *et al*, 2009; Torres, 2010).



**Figura 2.** Padrão de aderência localizada (AL) em *E. coli* patotipo EPEC em ensaio de aderência de 6 horas.

Fonte: Vieira *et al*, 2001.

A EPEC atípica (aEPEC) vem sendo reconhecida como um enteropatógeno emergente de países em desenvolvimento (Hernandes *et al*, 2009). Casos esporádicos, geralmente, são detectados em crianças, mas epidemias acometem tanto crianças, quanto adultos (Kaper *et al*, 2004). A EPECt é raramente detectada em países desenvolvidos, mas alguns casos de diarreia por aEPEC já foram detectados nos Estados Unidos, Finlândia e Japão (Frazolin *et al*, 2005). Esses animais talvez sirvam como reservatório para as cepas atípicas que acometem os humanos. A aEPEC pode exibir um padrão localizado de aderência (LAL), difuso (AD) ou agregativo (AA), geralmente observados em ensaios de 6 horas (Rosa *et al*, 1998; Afset *et al*, 2003; Torres, 2010).

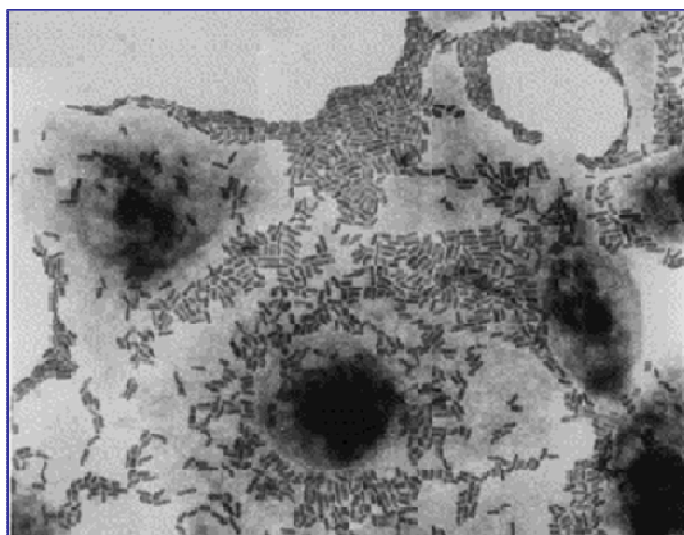
### 1.2.2 *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

EAEC é um enteropatógeno emergente que vem sendo reconhecido como causa de diarreia em crianças e adultos de países em desenvolvimento (Okeke & Nataro, 2001; Torres, 2010). O patotipo pode causar um quadro agudo, mas geralmente está associado com quadro persistente e desnutrição, assumindo um papel mais relevante ainda no âmbito de saúde pública de países em desenvolvimento. Relatos correlacionaram a EAEC com diarreia de crianças e adultos de países desenvolvidos, adultos HIV-positivos de países em

desenvolvimento e viajantes. É uma categoria que se caracteriza pela elevada heterogeneidade quanto aos aspectos genéticos e fenotípicos (Nataro, 2005; Walker *et al*, 2010).

Variantes na categoria têm possibilitado definir linhagens típicas e atípicas. Sabe-se que a maioria das cepas de EAEC são carreadoras do plasmídeo pAA que alberga genes necessários ao fenótipo de aderência agregativa. Neste plasmídeo, está localizado o gene regulador de genes de virulência *aggR*. Variantes atípicas são carreadoras de apenas alguns marcadores genéticos como *ast* e *pic* (Okeke & Nataro, 2001; Liberatore *et al*, 2007; Regua-Mangia *et al*, 2010).

A heterogeneidade da categoria EAEC define subpopulações que podem exibir potenciais de patogenicidade e estarem associadas com quadros clínicos, agudos ou persistentes, acompanhados de sintomas como inflamação intestinal, dor abdominal, náuseas, vômito, febre baixa e fezes com muco e/ou sangue (Okeke & Nataro, 2001). Em ensaios empregando células epiteliais em cultura, as EAEC expressam um fenótipo característico revelando células bacterianas dispostas como tijolos empilhados, por isso, denominado padrão agregativo (Figura 3). Variações nesse fenótipo de aderência têm sido descritas com bactérias aderindo predominantemente sobre as células epiteliais e/ou sobre as lamínulas (Nataro *et al*, 1987; Nataro & Kaper, 1998; Torres *et al*, 2010).



**Figura 3.** Padrão de aderência agregativa (AA) em *E. coli* patotipo EAEC em ensaio de aderência de 3 horas.

Fonte: Nataro & Kaper, 1998.

### **1.2.3 *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC)**

As STEC podem também causar lesões no intestino pela expressão das proteínas codificadas pela região LEE (gene *eae*), mas é a produção da toxina Shiga (*STx*) expressa pela presença do gene *stx*, que a define como pertencente ao patotipo (Castro *et al*, 2011). A infecção por STEC pode estar associada com quadros de diarreias leves até severas e sanguinolentas. A infecção por STEC pode progredir para a síndrome hemolítica urêmica (SHU), caracterizada pela falência renal e a púrpura trombocitopênica, com possível envolvimento do sistema nervoso central. O gado bovino infectado, geralmente saudável, representa o principal reservatório de STEC. A transmissão de STEC ocorre por ingestão de água ou alimentos contaminados diretamente ou indiretamente por fezes bovinas, contato de pessoa-pessoa ou pessoa-animal (Torres, 2010).

Atualmente a STEC é considerada uma categoria que engloba a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), cujo representante clássico é o sorotipo O157:H7 mas sorogrupos/sorotipos têm sido descritos e estão associados a uma diversidade de manifestações clínicas (Feng *et al*, 1998; Bugarel *et al*, 2011). As infecções por STEC são relativamente raras nos países em desenvolvimento (Torres, 2010), mas nos países desenvolvidos, muitos surtos são relatados, como o surto que ocorreu em 2011 na Alemanha. Segundo o Centro Europeu para a Prevenção e Controle de Doenças, que registrou diversos casos e óbitos, essa epidemia foi causada por um híbrido STEC-EAEC, associado com quadro diarreico sanguinolento e evolução para a síndrome hemolítica urêmica (Frank *et al*, 2011; Makobe *et al*, 2012).

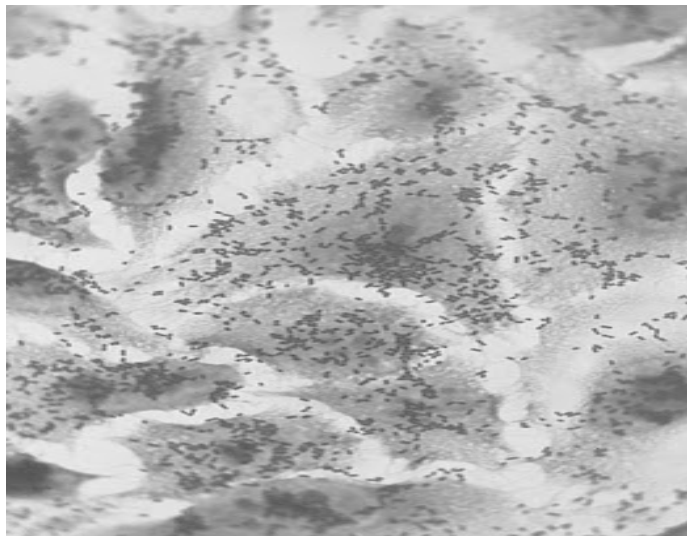
### **1.2.4 *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)**

ETEC é um patotipo classicamente associado com a diarreia infantil e de viajantes em países em desenvolvimento, havendo também alta incidência em hospedeiros assintomáticos (Sánchez & Holmgren, 2005; Qadri *et al*, 2005). Surtos de ETEC ocorrem também em países desenvolvidos, e casos isolados e esporádicos são mais raros (Wenneras & Erling, 2004; Regua-Mangia *et al*, 2004a). Contaminação de água e alimentos constitui a forma mais comum de infecção e, por isso, a característica sanitária e de higiene do ambiente tem uma forte influência para o estabelecimento da doença, entretanto, há proteção quando o contato entre o indivíduo e a bactéria ocorre desde a infância. ETEC causa quadro diarreico também em diversos animais, mas as cepas geralmente carregam toxinas e fatores de colonização distintas das amostras isoladas de humanos (Qadri *et al*, 2005).



Os sintomas clássicos associados com a infecção por ETEC podem incluir: dores violentas abdominais, vômitos, náuseas e febre baixa. A infecção ocorre, principalmente, no intestino delgado. Há a produção de enterotoxinas semelhantes à toxina da Cólera, causando aumento da secreção de eletrólitos, como cloro e sódio para o lúmen intestinal, seguidos de água por osmose. A diarreia pode ser profusa aquosa, tipo água de arroz, sem sangue (Sack *et al*, 1975; Torres, 2010).

As cepas de ETEC expressam antígenos para a fixação de microorganismos no lúmen intestinal como os fatores de colonização (CFAs) que mediam a aderência ao intestino delgado e inúmeras CFAs foram descritas, mas aproximadamente 75% das ETECs são carreadoras dos CFA/I, CFA/II ou CFA/IV (Sánchez & Holmgren, 2005). A ETEC pode produzir toxinas termo-lábeis (LT) e/ou termo-estáveis (ST), codificadas, respectivamente, pelos genes *st* e *lt*. Variantes toxigênicas têm sido descritas causando infecções em humanos e em animais. As ETECs estão geralmente associadas com a expressão do fenótipo de aderência difuso em células epiteliais em cultura, que se caracteriza por bactérias aderidas ao acaso, por toda a superfície celular (Figura 4) (Feng *et al*, 1998; Kaper *et al*, 2004).

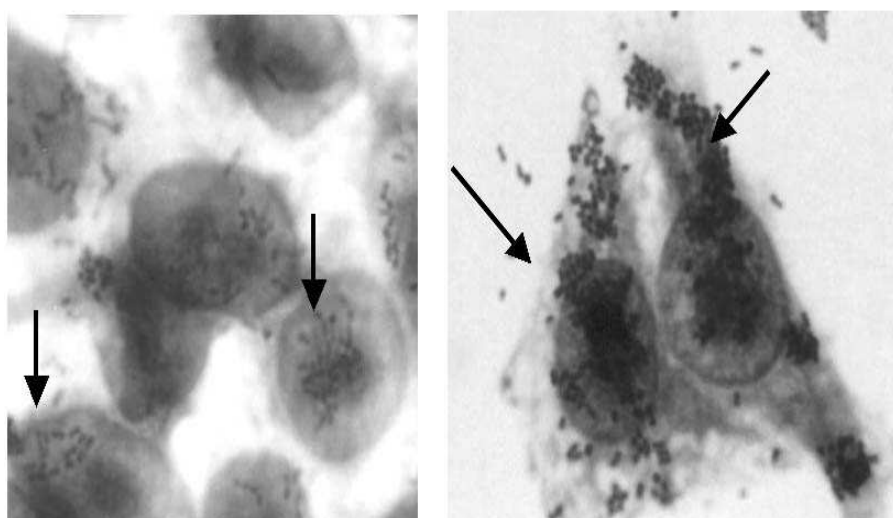


**Figura 4.** Padrão de aderência difusa em *E. coli* para o patotipo ETEC em ensaio de aderência de 3 horas .

**Fonte:** Nataro *et al* (1987)

### 1.2.5 *E. coli* enteroinvasora (EIEC)

As EIEC se caracterizam por invadir e destruir as células epiteliais intestinais (Figura 5), podendo causar úlceras e inflamação. A diarreia geralmente é aquosa podendo apresentar em alguns casos, sangue e muco. A EIEC é bioquimicamente, geneticamente e patogenicamente semelhante à espécie *Shigella*. A EIEC difere dos outros patotipos de *E. coli* por ser um micro-organismo intracelular e que não possui flagelos. O gene necessário para o processo de invasão das EIEC é codificado em um plasmídeo 140-MD denominado *inv*. As infecções são mais frequentes em crianças maiores de dois anos e em adultos e pode evoluir para um quadro de desintéria. Relatos de surtos envolvendo o patotipo são geralmente relacionados à transmissão de água e/ou alimentos contaminados em países em desenvolvimento (Robins-Browne & Hartland, 2002; Torres, 2010).



**Figura 5.** Padrão de aderência invasiva em *E. coli* para o patotipo EIEC em ensaio de aderência de 3 horas.

**Fonte:** Nakano & Avila-Campos (2004)

### 1.2.6 *E. coli* de aderência difusa (DAEC)

A categoria inclui amostras de *E. coli* que expressam padrão de adesão difusa em células epiteliais em cultura e cujos mecanismos de virulência não estão observados nos outros patotipos (Kaper *et al*, 2004). Normalmente, está associada com diarreia aquosa em crianças até um ano de idade, porém seu papel na gênese de diarreia é controverso. DAEC é categorizada pela expressão da aderência difusa em culturas de células mas pouco se sabe sobre os mecanismos de enteropatogenicidade e marcadores genéticos (Robins-Browne & Hartland, 2002; Torres, 2010).

### 1.3 Aspectos de resistência a antimicrobianos

A resistência a antimicrobianos é uma característica que também vem sendo amplamente investigada nessa espécie bacteriana (Garcia *et al.*, 2011). Embora não esteja diretamente relacionada com a patogenicidade destes microorganismos, os seus determinantes genéticos são geralmente localizados em elementos genéticos móveis, como os plasmídeos, que podem também carrear fatores de enterovirulência, favorecendo assim a ampla disseminação dessas propriedades entre organismos diversos e no ambiente (Regua-Mangia *et al.*, 2009b; Idress *et al.*, 2010). Particularmente para populações de *E. coli*, é comum a característica de resistência a múltiplos antimicrobianos em amostras clínicas de origem diversa (Esparis *et al.*, 2006). A co-localização de marcadores genéticos de patogenicidade com genes codificadores de resistência aos antimicrobianos vem sugerir, cada vez mais, que esta propriedade possa desempenhar uma função adicional na virulência destes microorganismos (Esparis *et al.*, 2006; Jafari *et al.*, 2009; Regua-Mangia *et al.*, 2009b ; Idress *et al.*, 2010).

Os determinantes genéticos codificadores destas propriedades são transmitidos verticalmente entre microorganismos pertencentes à mesma linhagem e também horizontalmente, por meio de elementos genéticos móveis entre linhagens evolucionariamente independentes. Dentro deste panorama e considerando as características destes enteropatógenos como microorganismos circulantes em ambientes diversos e com elevada capacidade de intercâmbio genético, deve ser destacado o seu importante papel na disseminação de resistência aos antimicrobianos entre microorganismos que circulam amplamente nas populações humanas e no ambiente (Hacker & Kaper, 2000; Foley *et al.*, 2009).

Estudos epidemiológicos têm revelado que, de um modo geral, não existem diferenças significativas no padrão de resistência a antimicrobianos em amostras pertencentes aos diferentes patótipos de *E. coli* isolados tanto de casos clínicos quanto provenientes de grupos controle. O fenótipo de resistência detectado em um dado patótipo de *E. coli* tem sido, principalmente, relacionado a conduta terapêutica no que diz respeito ao uso indiscriminado de antimicrobianos e a antibioticoterapia empírica e, por isso, o padrão e as características geralmente refletem condutas terapêuticas locais (Garcia *et al.*, 2011; Llanes *et al.*, 2012). Embora os padrões de resistência e de multirresistência sejam amplamente descritos para os patótipos diarreiogênicos de *E. coli*, baixos níveis ainda têm sido observados para as cefalosporinas de terceira geração como ceftriaxona e cefepima, principalmente, em amostras isoladas de comunidade (Bartoloni *et al.*, 2012). Apesar de diversos padrões de resistência

serem descritos para EAEC, EPEC e ETEC, para STEC, DAEC e EIEC as informações são mais limitadas em função da restrita representatividade desses patótipos como agentes de enteroinfecção em diversas regiões geográficas (Regua-Mangia *et al*, 2004b; Regua-Mangia *et al*, 2009a; Jafari *et al*, 2009). A literatura atual busca novas classificações quanto aos padrões de resistência a antimicrobianos, considerando então suas classes e grupos farmacológicos. Fenótipos foram criados pelos comitês ECDC (Europe Centre of Disease Prevention and Control) e CDC (Centers for Disease Control and Prevention) em um encontro que ocorreu em 2008 em Estocolmo (Suécia), sendo eles: MDR (resistente a três ou mais classes de antimicrobianos); XDR (resistente a quase todas as classes de antimicrobianos); e PDR (resistente a todas as classes de antimicrobianos) (Magiorakos *et al*, 2012).

#### **1.4 *Escherichia coli* ambiental**

Por ser uma espécie bacteriana encontrada no trato intestinal do homem e de outros animais homeotérmicos, a contaminação de ambientes terrestres ou aquáticos por *E. coli* é comum, geralmente, sendo ocasionada pelo lançamento de esgotos domésticos e de efluentes de origens diversas (Brennan *et al*, 2010). Além disso, a sua versatilidade metabólica, parece permitir que estes micro-organismos se tornem membros de comunidades microbianas distintas, mesmo em condições adversas de seu habitat primário, o hospedeiro. Pesquisas recentes indicam que a *E. coli* sobrevive durante longos períodos após sua deposição no ambiente e também se multiplica na água, em algas e no solo em ambientes tropicais, subtropicais e temperados (Solo-Gabriele *et al*, 2000; Byappanahalli *et al*, 2006; Fremaux *et al*, 2008).

#### **1.5 Métodos laboratoriais de caracterização de populações de *E. coli***

A investigação de características fenotípicas e genotípicas em amostras diarreio gênicas de *E. coli* tem revelado que a enteropatogenicidade é um atributo de subpopulações bacterianas dentro de cada categoria (Regua-Mangia *et al.*, 2004a; Regua-Mangia *et al.*, 2009b). Tal abordagem tem sido extremamente útil para a elucidação de aspectos da epidemiologia molecular auxiliando, principalmente, no delineamento de estratégias de diagnóstico e monitoramento destas infecções. Esses estudos têm possibilitado a detecção de variantes virulentas assim como a detecção de novos grupos, os quais vêm possibilitando verificar possíveis associações com a doença diarreica (Estrada-Garcia & Martin, 2011).

A identificação e a caracterização convencional de populações de *E. coli* consiste do uso de ensaios laboratoriais como sorotipagem e aderência empregando células epiteliais em cultura. Durante muitos anos, estudos epidemiológicos fizeram uso da sorotipagem como a única ferramenta para diferenciar as linhagens patogênicas uma vez que as mesmas pertenciam a sorotipos específicos. Atualmente, a sorotipagem é utilizada como uma caracterização de tipagem complementar e estes antígenos são reconhecidos como marcadores estáveis de clones de virulência, uma vez que linhagens patogênicas pertencem a um número limitado de sorotipos (Feng *et al.*, 1998).

Os ensaios de aderência empregando células epiteliais em cultura é uma caracterização fenotípica que permite a detecção da expressão de padrões específicos de aderência bacteriana. O teste fenotípico FAS (*Fluorescence Actin Staining*), também usa células epiteliais em cultura, mas consiste de uma técnica de microscopia ótica de fluorescência que permite detectar o acúmulo de actina no citoesqueleto do citoplasma das células epiteliais infectadas em decorrência da adesão íntima dos patotipos intestinais que expressam a intimina (Torres, 2010).

### **1.5.1 Métodos moleculares de detecção dos patotipos de *E. coli***

Nas últimas décadas de pesquisa o desenvolvimento e o uso extensivo de métodos moleculares de diagnóstico e caracterização de populações de *E. coli* têm possibilitado elucidar mecanismos de virulência, criar bancos de dados, estudar a diversidade e a estrutura genética desses microrganismos, contribuindo assim com informações relevantes sobre os seus aspectos biológicos e epidemiológicos (Regua-Mangia *et al.*, 2008; Regua-Mangia *et al.*, 2009a). A caracterização molecular de populações bacterianas é realizada por uma variedade de técnicas, dentre as quais se incluem os ensaios de hibridização e de amplificação de sequências genéticas. Essas metodologias têm se mostrado altamente específicas para detectar os marcadores genéticos que definem os patotipos da espécie, atendendo também aos critérios de estabilidade e reprodutibilidade, entretanto, podem diferir em sensibilidade conforme os protocolos experimentais utilizados e os alvos genéticos (Pacheco *et al.*, 1997; Gürtler & Mayall, 2001; Esparis *et al.*, 2006; Regua-Mangia *et al.* 2004b; Regua-Mangia *et al.*, 2010; Belkun *et al.*, 2012).

### **1.5.2 Agrupamento filogenético de *E. coli***

Os estudos filogenéticos em populações de *E. coli* contribuem para pesquisas de evolução e diversidade, auxiliando na elucidação do potencial de virulência de populações

microbianas. Para populações de *E.coli* foi desenvolvido um método alternativo cujos resultados têm permitido classificar subpopulações da espécie em quatro principais filogrupos denominados A, B1, B2 e D. Essa categorização se deve a presença ou ausência de três marcadores genéticos: genes *chuA* e *yjaA* e o fragmento de DNA TSPE4.C2. Essa metodologia foi desenvolvida a partir da criação de uma biblioteca genômica utilizando cepas de *E. coli* de origem diversa, pertencentes a diferentes grupos evolucionários (Clermont *et al*, 2000).

Os resultados que vem sendo obtidos, tem permitido classificar os isolados clínicos obtidos de doenças extra-intestinais, em sua maioria, no grupo B2 e em menor escala no grupo D. Amostras comensais, geralmente, pertencentes ao grupo A e em menor proporção no grupo B1 e a cepas agentes da doença diarreica, normalmente são encontradas nos grupos A, B1 e D. Os grupos A e B1 são considerados mais estreitamente relacionados (Le Gall *et al*, 2007; Touchon *et al*, 2009).

### 1.5.3 Diversidade genética

A diversidade genética em populações bacterianas vem sendo acessada por várias metodologias ou sistemas de tipagem que visam detectar a relação de identidade entre organismos relacionados (Regua-Manguia *et al*, 2008). Nas últimas décadas de pesquisa o desenvolvimento e o uso extensivo de sistemas de diagnóstico e de tipagem, baseados na análise direta ou indireta do polimorfismo genômico, têm contribuído para a elucidação de mecanismos de virulência e com o estudo da estrutura genética de populações bacterianas para contribuir com informações relevantes sobre os seus aspectos biológicos e epidemiológicos (Gurtler & Mayall, 2001; Regua-Manguia *et al*, 2004a).

Dentre os métodos empregados destacam-se as reações de amplificação de sequências genéticas, conhecida pela sigla PCR (Polymerase Chain Reaction). Além de fornecer resultados rápidos, essa metodologia tem se mostrado altamente sensível e específica atendendo também aos critérios de estabilidade, reprodutibilidade, facilidade de execução técnica e custo. Variantes metodológicas como a amplificação randômica do DNA polimórfico, conhecida pela sigla RAPD-PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction), tem sido utilizada no estudo da diversidade destes microorganismos e possibilitado observar uma estreita associação entre padrões eletroforéticos e parâmetros clínico-epidemiológicos (Foley *et al*, 2009). Particularmente para populações de *E. coli*, o RAPD-PCR tem se mostrado um método de tipagem com elevado potencial discriminatório, possibilitando detectar a diversidade genética de populações bacterianas e a

inter-relação entre amostras epidemiologicamente relacionadas (Pacheco *et al*, 1997; Regua-Mangia *et al*, 2004; Regua-Mangia *et al.*, 2009a). O emprego da técnica de PCR tem se mostrado também muito útil como um instrumento alternativo de classificação filogenética de populações de *E. coli*, proporcionando relevantes esclarecimentos sobre a virulência e a evolução de linhagens patogênicas (Clermont *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2008).

#### **1.5.4 Aderência em *Escherichia coli***

Os ensaios de aderência empregando células epiteliais em cultura constituem uma caracterização fenotípica que permite a detecção da expressão de padrões de aderência como a adesão localizada (AL), adesão difusa (AD), adesão agregativa (AA), e até mesmo variantes desses fenótipos. O estudo da adesão bacteriana constitui uma ferramenta adicional de investigação de propriedades de virulência em populações de *E. coli* (Torres *et al*, 2005).

Investigações epidemiológicas empregando células epiteliais em cultura têm observado que patótipos diarreioogênicos são estreitamente associados com a expressão de padrões característicos de aderência (Mora *et al*, 2009). Além de contribuir para a elucidação de fatores e mecanismos de enteropatogenicidade, os testes de adesão têm possibilitado detectar variantes fenotípicas ou subgrupos dentro de categorias patogênicas da espécie. A estreita associação de fatores de patogenicidade com certos patótipos intestinais de *E. coli*, tem motivado estudos de adesão em populações enteropatogênicas visando elucidar os mecanismos de virulência, principalmente, os envolvidos nas etapas de adesão, colonização e invasão bacteriana (Rosa *et al*, 1998; Torres, 2010; Lozer, 2011).

### **1.6 Aspectos da saúde indígena no Brasil**

Até meados da década de 70 acreditava-se que a população indígena brasileira tenderia a extinguir por causa das epidemias e conflitos e na década de 80, surpreendendo as expectativas, houve um crescimento populacional (Ventura Santos & Coimbra Jr., 2000). Em 1999 foi criada a lei Arouca nº 9.836 que apresenta o Subsistema de Atenção a Saúde Indígena no âmbito do Ministério da Saúde, designando a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) como seu responsável. Em outubro de 2010, no governo de Luiz Inácio Lula da Silva, a Secretária Especial de Saúde Indígena (SESAI) foi criada e assumiu essa responsabilidade. Atualmente a taxa de crescimento da população indígena é, em média, de 3,5% ao ano, superando a taxa da população geral brasileira, de 1,6% (IBGE, 2005; Souza, 2010).

Conforme apontado por Santos & Coimbra Jr (2000), mesmo com essa dinâmica demográfica, conclui-se que é preciso investigar os padrões indígenas para a formação do

sistema de informações, que até agora se mostrou muito precário. Além disso, qualquer discussão sobre a demografia e o processo saúde/doença dos povos indígenas brasileiros deve levar em conta a diversidade existente. São aproximadamente 300 etnias falantes de cerca de 170 línguas distintas. Atualmente, a população indígena no Brasil representa 0,4% (817 mil pessoas) da população brasileira (IBGE, 2010).

### **1.7 Etnia Guarani**

O povo Guarani se constitui em uma das etnias mais numerosas no Brasil, com aproximadamente 45 mil pessoas, representando cerca de 10% da população indígena brasileira (Filho *et al*, 2009). Na época da chegada dos europeus, viviam nas regiões entre os rios Uruguai, Iguaçu e Paraná. Com o passar dos anos, houve migração em direção ao litoral norte, e atualmente, há diversas aldeias Guarani no litoral do estado do Rio de Janeiro (Marinho, 2000). Há três subgrupos Guarani existentes no Brasil: os Mbyá, os Ñandeva e os Kaiowá, todos pertencentes ao tronco lingüístico Tupi (Marinho, 2000). Os Mbyá predominam em São Paulo, no Rio de Janeiro e no Espírito Santo, misturados aos Ñandeva, constituindo a maior parte das aldeias de Angra dos Reis e Paraty (Marinho, 2000; Cardoso, 2010). Em Angra dos Reis, na aldeia de Sapukai há um posto do Sistema Único de Saúde (SUS), sendo este o único cadastrado em todo o país. Na indisponibilidade dessa atenção, os pacientes buscam auxílio dos profissionais que trabalham na área ou são captados por busca ativa. Nas aldeias Paraty-Mirim e Araponga também existem postos de saúde com atendimento similar ao de Sapukai. As aldeias Mamangá e Rio Pequeno não possuem posto de saúde local e a assistência é feita pela mesma equipe das outras aldeias e por Agentes Indígenas de Saúde (AIS), sendo que a aldeia Rio Pequeno é a única das cinco aldeias incluídas no estudo que pertence ao povo Ñandeva (Marinho, 2000; Chaves *et al* 2006).

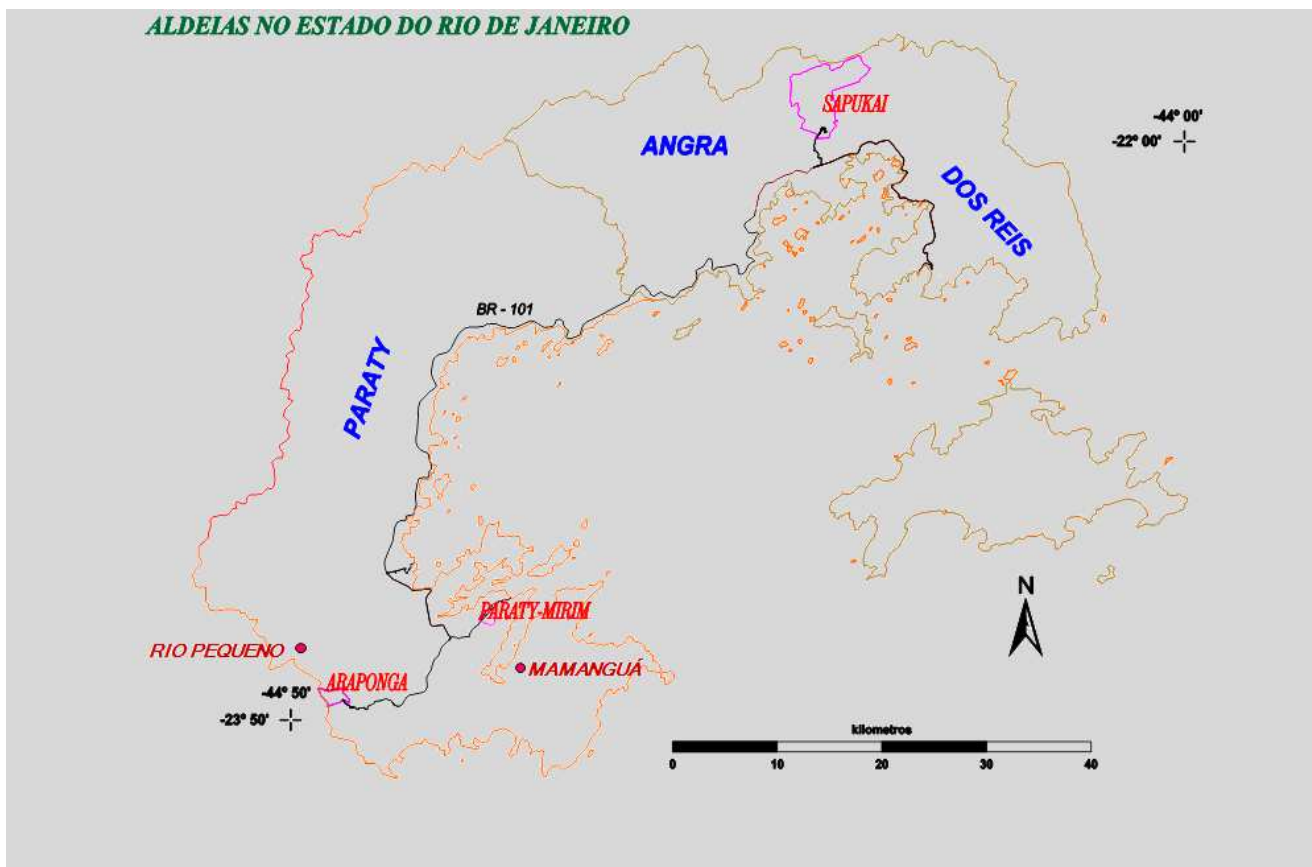
As populações indígenas, em geral, constituem um segmento da sociedade que necessita de tratamento diferenciado de saúde, pois além de serem povos culturalmente segregados, ainda se encontram, na maioria das vezes, abaixo da linha da pobreza mundial. A mortalidade infantil conhecida é muito elevada, particularmente, devido a doenças infecciosas, dentre as quais se destaca a doença diarreica (Coimbra Jr & Ventura Santos, 2000; Lunardi *et al*, 2002; Bóia *et al*, 2009). Apesar da *E. coli* ser amplamente estudada nas populações não indígenas e seu impacto ser reconhecido na saúde humana mundial como um relevante enteropatógeno, não se conhece a circulação e o papel destes microorganismos nas populações indígenas, assim como as características genéticas e fenotípicas associadas com a diversidade e a virulência desses enteropatógenos.



### 1.7.1 Aldeias Guarani no sul do estado do Rio de Janeiro

Para a aldeia de Sapukai, a área homologada localiza-se no bairro do Bracuhy, estendendo-se por 2.128 hectares, estando a 350 km de São Paulo e 170 km do Rio de Janeiro. Para as aldeias de Paraty, a demarcação e homologação ocorreram de forma mais demorada ou ainda não ocorreram. A área da aldeia Paraty-Mirim homologada localiza-se no bairro Paraty Mirim, a aproximadamente 20 km do município e a 4,5 km da estrada Rio-Santos. Estende-se por 79 hectares, em uma região de mata mais devastada e altitudes bastante inferiores às outras aldeias (200 m do nível do mar). A aldeia Araponga, que já está homologada, compreende 223,61 hectares, sendo a que apresenta maior dificuldade de acesso. É constituída por apenas seis casas de membros da mesma família. Encontra-se mais ao sul do município, no bairro de Patrimônio, dentro do Parque Nacional da Serra da Bocaina (Marinho, 2000). Já as aldeias Rio Pequeno e Mamanguá constituem-se, respectivamente, de oito domicílios com membros da mesma família e apenas um domicílio com quatro familiares residentes e ainda não estão homologadas. O acesso a todas as comunidades pode ser feito por terra, como exceção de Mamanguá, aonde se chega por mar em certas épocas do ano (Filho *et al*, 2009).

Segundo um levantamento da FUNASA (2009), todas as aldeias do município de Paraty contam com uma população de cerca de 180 pessoas, divididas em 32 residências. Já a aldeia de Sapukai (município de Angra dos Reis) é composta por 67 residências, abrigando em torno de 360 indígenas. A localização das aldeias de Araponga, Mamanguá, Rio Pequeno, Paraty Mirim e Sapukai estão apresentadas na Figura 6.



**Figura 6.** Mapa com a localização das aldeias Araponga, Rio Pequeno, Mamanguá, Sapukai e Paraty-Mirim nos municípios de Angra dos Reis e Paraty. FONTE: Arquivo pessoal Diana Marinho.

As casas são feitas de pau-a-pique, com telhado de palha e chão de terra batida. A aldeia Sapukai possui água em abundância, assim como as aldeias Araponga, Rio Pequeno e Mamanguá. Já a aldeia Paraty-Mirim tem como fonte principal o rio Paraty-Mirim, que atravessa diversas comunidades antes de chegar à área indígena causando problemas de saúde. A maioria dos indígenas realiza suas necessidades fisiológicas em área afastada na mata, apesar da existência de cabines higiênicas disponíveis nas aldeias. A coleta de lixo é feita com o apoio da prefeitura e o acúmulo ocorre nas partes baixas das aldeias e muitas vezes ocorrem queimadas (Filho *et al*, 2009). Todas as aldeias apresentam dificuldades na obtenção de alimentos, pois a caça e área de plantio estão cada vez mais escassas, gerando a necessidade da compra de alimentos industrializados e acarretando em problemas econômicos, sociais e de saúde, como por exemplo, diabetes, obesidade, hipertensão, problemas dentários, entre outros (Marinho, 2000; Cardoso, 2010).

## 2 OBJETIVO

---

### 2.1 Objetivo geral

Elucidar a circulação da *E. coli* diarreioagênica e investigar características genéticas e fenotípicas de amostras de *E. coli*, relacionadas à enteropatogenicidade da espécie, isoladas de crianças indígenas de etnia Guarani, moradoras de diferentes aldeias localizadas no sul do estado do Rio de Janeiro.

### 2.2 Objetivos específicos

- ❑ Utilizar as técnicas da reação da polimerase em cadeia (polymerase chain reaction - PCR) e de hibridização em colônias visando detectar os patótipos diarreioagênicos de *E. coli* circulantes na população indígena em estudo;
- ❑ Empregar a técnica de PCR-triplex como instrumento de caracterização bacteriana quanto ao agrupamento filogenético nas amostras enteropatogênicas de *E. coli*;
- ❑ Realizar ensaios de aderência empregando células epiteliais em cultura visando detectar a expressão de fenótipos de aderência em amostras potencialmente enteropatogênicas;
- ❑ Determinar os perfis de resistência a antimicrobianos nas amostras de *E. coli* isoladas no estudo;
- ❑ Empregar a técnica de análise do padrão de polimorfismo dos segmentos de DNA obtidos por amplificação randômica (RAPD-PCR) como instrumento de avaliação da diversidade genética nas amostras potencialmente enteropatogênicas de *E. coli*.
- ❑ Fazer análise comparativa das características bacterianas investigadas considerando os aspectos clínico-epidemiológicos da população indígena;

## 3 METODOLOGIA

---

### 3.1 Desenho do estudo e amostras bacterianas

Esse é um estudo descritivo que se propôs a analisar as características genéticas e fenotípicas de 314 amostras de *E. coli* isoladas de crianças indígenas pertencentes a etnia Guarani e moradoras no sul do estado do Rio de Janeiro.

As amostras fecais foram coletadas por um *swab* retal de cada criança indígena após autorização do responsável e transportadas em meio Cary Blair. Para o isolamento bacteriano foram utilizados os meios de cultura seletivos para enterobactérias (Ágar MacConkey-BBL e Ágar EMB-Teague-Difco) e a identificação da espécie foi baseada em características bioquímicas quanto a motilidade, produção de indol, lisina descarboxilase, gás, urease, ácido sulfúrico, triptofano desaminase e utilização do citrato de sódio como fonte de carbono após semeadura nos meios EPM, MILI e Citrato de Simmon (PROBAC do Brasil) (Koneman *et al*, 2008) As amostras bacterianas isoladas foram mantidas congeladas sob a forma de suspensão em caldo de tripticaseína de soja (TSB-BBL) acrescido de glicerol.

### 3.2 População de estudo

A coleta do material foi realizada previamente juntamente com a aplicação de um questionário visando à obtenção de informações como idade, sexo, uso prévio de antibiótico, sinais e sintomas clínicos como febre, vômito, estado de hidratação, dor abdominal e duração do quadro diarreico (Anexo 1).

A população em estudo incluiu 57 crianças indígenas de etnia Guarani, de 0-5 anos de idade, com e sem diarreia (Quadro 1) moradoras nas aldeias Sapukai (município de Angra dos Reis), Rio Pequeno, Mamaguá, Paraty-Mirim e Araponga (município de Paraty), localizadas no sul do estado do Rio de Janeiro (figura 7). Foi realizado um estudo objetivando a coleta de amostras de todas as crianças na faixa etária indicada presentes nas aldeias. Houveram perdas mínimas devido à característica migratória da população em questão.

Foram consideradas crianças controle aquelas que não manifestaram o quadro diarreico em um período que antecedeu, pelo menos, 30 dias à coleta do material. Foram consideradas como crianças casos, aquelas que manifestaram um aumento no número de evacuações, com fezes aquosas ou de pouca consistência, com a presença ou não de muco e/ou sangue segundo

a observação e o relato do responsável da criança na ocasião da coleta do material. A diarreia foi definida como persistente se o quadro diarreico persistiu por 14 ou mais dias.



**Figura 7.** Aldeia Araponga (Esquerda) e aldeia Sapukai (Direita). Fonte: Carla Verçoza.

**Quadro 1.** População de crianças indígenas da etnia Guarani incluídas no estudo.

ID LAB	IDADE	DIARRÉIA	ALDEIA	MUNICÍPIO
I001	48 meses	NÃO	SAPUKAI	ANGRA DOS REIS
I002	48 meses	NÃO	SAPUKAI	ANGRA DOS REIS
I003	31 meses	NÃO	SAPUKAI	ANGRA DOS REIS
I004	9 meses	NÃO	SAPUKAI	ANGRA DOS REIS
I005	60 meses	NÃO	SAPUKAI	ANGRA DOS REIS
I006	24 meses	SIM	SAPUKAI	ANGRA DOS REIS
I007	7 meses	NÃO	SAPUKAI	ANGRA DOS REIS
I008	36 meses	NÃO	SAPUKAI	ANGRA DOS REIS
I009	48 meses	NÃO	SAPUKAI	ANGRA DOS REIS
I010	60 meses	NÃO	SAPUKAI	ANGRA DOS REIS
I011	36 meses	NÃO	SAPUKAI	ANGRA DOS REIS
I012	12 meses	NÃO	SAPUKAI	ANGRA DOS REIS
I013	36 meses	NÃO	SAPUKAI	ANGRA DOS REIS
I014	9 meses	NÃO	SAPUKAI	ANGRA DOS REIS
I015	8 meses	NÃO	SAPUKAI	ANGRA DOS REIS
I016	48 meses	SIM	SAPUKAI	ANGRA DOS REIS
I017	48 meses	NÃO	SAPUKAI	ANGRA DOS REIS
I018	9 meses	SIM	SAPUKAI	ANGRA DOS REIS
I019	23 meses	NÃO	SAPUKAI	ANGRA DOS REIS
I020	60 meses	NÃO	SAPUKAI	ANGRA DOS REIS
I021	12 meses	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY
I022	12 meses	NÃO	RIO PEQUENO	PARATY
I023	12 meses	SIM	PARATY MIRIM	PARATY
I024	36 meses	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY
I025	12 meses	SIM	MAMANGUA	PARATY
I026	48 meses	NÃO	MAMANGUA	PARATY
I027	48 meses	NÃO	MAMANGUA	PARATY
I028	36 meses	SIM	MAMANGUA	PARATY
I029	12 meses	SIM	MAMANGUA	PARATY
I030	0,6 mês	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY
I031	6 meses	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY
I032	10 meses	NÃO	RIO PEQUENO	PARATY
I033	60 meses	NÃO	RIO PEQUENO	PARATY
I034	36 meses	NÃO	ARAPONGA	PARATY
I035	60 meses	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY
I036	12 meses	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY
I037	36 meses	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY
I038	48 meses	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY
I039	48 meses	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY
I040	48 meses	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY
I041	24 meses	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY
I042	12 meses	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY
I043	60 meses	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY
I044	60 meses	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY
I045	60 meses	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY
I046	4 meses	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY
I047	60 meses	SIM	PARATY MIRIM	PARATY
I048	48 meses	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY
I049	36 meses	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY
I050	24 meses	SIM	PARATY MIRIM	PARATY
I051	60 meses	SIM	PARATY MIRIM	PARATY
I052	24 meses	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY
I053	36 meses	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY
I054	48 meses	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY
I055	60 meses	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY
I056	12 meses	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY
I057	24 meses	NÃO	PARATY MIRIM	PARATY

Legenda: (ID LAB) Identificação da amostra no laboratório.

### 3.3 Aspectos éticos

O estudo foi conduzido em concordância com as recomendações e requisitos da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

A presente proposta é um subprojeto do projeto de pesquisa *Avaliação de prevalência de geohelmintíases, leishmaniose cutânea e hanseníase entre os índios Guarani do Estado do Rio de Janeiro, Brasil*, recebendo parecer aprovado sob CAEE nº 0056.0.031.000-09, pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (CEP-ENSP/Fiocruz).

### 3.4 Métodos laboratoriais de investigação: Métodos genotípicos

#### 3.4.1 Ensaio de amplificação para a detecção de genes de enteropatogenicidade (PCR-Multiplex)

A reação de PCR-multiplex seguiu a metodologia utilizada por Müller *et al* (2007). Foi selecionada uma colônia bacteriana como fonte de DNA. As amostras bacterianas estocadas em TSB glicerol foram semeadas em agár de tripticaseína de soja (TSA – Difco – Anexo 2, item 1.1) a 37°C por 18-24 horas e para a reação de PCR foi utilizado um volume final de 25µL contendo 2,5µL de tampão 10X (Invitrogen®), 0,3mM de dNTP (Invitrogen®), 2,1mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®) e 2U/µL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 14mM 2-mercaptoetanol (Sigma), 0,14% Triton X-10 (Sigma®) e as concentrações dos iniciadores listadas no quadro 2. A reação foi realizada em termociclador *Mastercycler personal* (Eppendorf) e programada para desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos seguida de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 63°C por 30 segundos e 72°C por 1,5 minuto seguida de uma extensão final de 72°C por 5 minutos .

Os amplicons obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose na concentração de 1.5% (p/v) em tampão (Anexo 2, item 1.2) TBE 0,5X (10X concentrado – Anexo 2, item 1.3), Tris 1M, ácido bórico 1M, EDTA 0,01M, pH 8,0) e na voltagem constante de 70V durante aproximadamente 4 horas e 30 minutos. Foi utilizado 4µl de solução corante GelRed (GelRed Nucleic Acid Gel Stain, Biotium, Uniscience®- Anexo 2, item 1.4) para a visualização do produto amplificado em transiluminador de luz ultravioleta (UVITec Cambrigde, Reino Unido). O tamanho dos fragmentos foi estimado utilizando o padrão de 100pb DNA ladder (Invitrogen®). Como controles de reação foram utilizadas as amostras clínicas 243IV (EPEC típica *EAF+ bfpA+*), 36IV (ETEC – *lt+*), 245I (ETEC – *st+*),

103V (EAEC- *aggR*+) e 129III (EIEC- *inv*+) e padrões ATCC: E30138 (STEC - *stx*<sub>2+</sub>), E40705 (STEC - *stx*<sub>1+</sub>).

**Quadro 2.** Iniciadores utilizados para o PCR-multiplex para enterovirulência de *E. coli* (Müller e colaboradores)

Iniciador	Sequência (5'-3')	Gene ou fragmento alvo	Tamanho do amplicon (pb)	Concentração do primer (µM)
MP3- <i>escV</i> -F MP3- <i>escV</i> -R	ATTCTGGCTCICTTCTTCTT.ATGGCTG CCTCCCTTTTACAAACTTCATCCG	<i>escV</i>	544	0.4 0.4
MP3- <i>bfpB</i> -F MP3- <i>bfpB</i> -R	GACACCTCATTGCTGAAGTCC CCAGAACAGCTCCGTTATGC	<i>bfpB</i>	910	0.1 0.1
MP4- <i>stx1A</i> -F MP4- <i>stx1A</i> -R	CGATGTTACGGTTTGTACTBTGACAGC AATGCCACGCTTCCGAGAAATG	<i>stx</i>	244	0.2 0.2
MP3- <i>stx2A</i> -F MP3- <i>stx2A</i> -R	GTTTTGACCACTTCTGCTGATTATGAG AGCCTAAGGCTTCTGCTGTGAC	<i>stx</i>	324	0.4 0.4
MP3-LT-F MP2-LT-R	GAACAGGAGGTTTCTGCGTTAGGTG CTTCAATGGCTTTTTTTGGGAGTC	<i>elt</i>	655	0.1 0.1
MP4-STIa-F MP4-STIa-R	CCTCTTTTAGYCACACARCTGAATC ASTTG CAGGCAGGATTACAACAABTTCCACA3	<i>estIa</i>	157	0.4 0.4
MP2-STIb-F MP2-STIb-R	TGTCTTTTTCACCTTTGGCTC CGGTACAADCAGGATTACAACAC	<i>estIb</i>	171	0.2 0.2
MP2- <i>invE</i> -F MP2- <i>invE</i> -R	CGATAGATGCGGAGAAATTATATCCCG CGATCAAGAATCCCTAACAGAGAAGATCAC	<i>invE</i>	766	0.2 0.2
MP2- <i>astA</i> -F MP2- <i>astA</i> -R	TGCCAACAACACAGTAAATCCG ACGGCTTTGTAGTCTCCAT	<i>astA</i>	102	0.4 0.4
MP2- <i>aggR</i> -F MP2- <i>aggR</i> -R	ACCCAGASTTGCCTGATAAAG AATACAJAATCGTCAGCATCAGC	<i>aggR</i>	400	0.2 0.2
MP2- <i>pic</i> -F MP2- <i>pic</i> -R	ACCCGTTTCCGCAAAAGCC AAATGTCAGTGAACCGACGATTGG	<i>Pic</i>	1,111	0.2 0.2
MP2- <i>uidA</i> -F MP2- <i>uidA</i> -R	ATGCCAGTCCAGCGTTTTTGC AAAGTCTGCGTCAATAATCAGGAAGT3	<i>uidA</i>	1,487	0.2 0.2

Foram utilizados os seguintes critérios para a definição dos patótipos a partir dos ensaios de amplificação: EPEC típica, amplificação dos genes *escV* e *bfpB*; EPEC atípica, gene *escV*; EAEC, gene *aggR*; marcadores acessórios do patótipo EAEC, genes *astA* e *pic*; ETEC, genes *elt*, *estIa* ou *estIb*; STEC, genes *stx1* ou *stx2*; EIEC, gene *invE*; marcador da espécie, gene *uidA*.



### 3.4.2 Ensaios de hibridização em colônias para a detecção de genes de enteropatogenicidade

Os ensaios de hibridização em colônia seguiram as especificações conforme descrito por Maas (1983). Os fragmentos de DNA sonda foram amplificados para as seguintes sequências: *st*, *lt*, *eae*, *bfpA*, *stx1*, *stx2*, *att*, e *ipaC* (Quadro 3) pela técnica de PCR e marcados com o dCTP<sup>32</sup> (Gênese) com o kit de marcação (GE Healthcare). O controle negativo foi a *E. coli* HB101(pBR 322) e o positivo, a *E. coli* K 12, carreadora dos plamídeos recombinantes.

**Quadro 3.** Sequências utilizadas como sondas radioativas no ensaio de hibridização para a detecção dos patotipos de *E. coli*

Sequencia genética	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>st</i>	190	Stacy-Phipps et al, 1995.
<i>Lt</i>	696	Schultz et al, 1994.
<i>eae</i>	917	Gannon et al, 1993.
<i>bfpA</i>	326	Gunzburg et al, 1999.
<i>att</i>	630	Schmidt et al, 1995.
<i>ipaC</i>	424	Venkatesan et al, 1989.
<i>stx1</i>	348	Cebula et al, 1995.
<i>stx2</i>	548	Cebula et al, 1995.

Foram utilizados os seguintes critérios para a definição dos patotipos a partir dos ensaios de hibridização: ETEC, amostras carreadoras dos genes *st* ou *lt*; EPEC típica, amostras carreadoras dos genes *eae* e *bfpA*; EPEC atípica, amostras carreadoras do gene *eae*; EAEC, amostras carreadoras do gene *att*; EIEC, amostras carreadoras do gene *ipaC*; marcador da espécie, amostras carreadoras do gene *uidA*; STEC, amostras carreadoras dos genes *stx1* ou *stx2*.

O procedimento consistiu das seguintes etapas: as amostras bacterianas foram semeadas pela técnica de semeadura de placas-mestre em placas contendo ágar MacConkey e, incubadas por 16 a 18 horas a 37°C. Após o crescimento bacteriano, as colônias foram transferidas para um papel de filtro Whatman 541 incubando-se 1 a 2 horas a 37°C. Os filtros foram submetidos ao tratamento de agentes químicos (soluções desnaturantes - NaOH 0.5M e NaCl 1.5M e, soluções neutralizantes- Tris 1M pH 7.0 e NaCl 2M) e, físico (calor) para promover lise bacteriana, desnaturação e fixação do DNA genômico. Após a etapa de desnaturação, os filtros foram mantidos à temperatura ambiente ou na estufa para secagem e submetidos aos ensaios de hibridização. Esse ensaio foi realizado na Universidade Federal de

São Paulo sob responsabilidade da Dra. Tânia Tardelli Gomes, professora titular do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

### 3.4.3 Diversidade genética

A diversidade foi investigada através da técnica de RAPD-PCR empregando os iniciadores 1254, A04 e M13 (Quadro 4). A extração e o preparo do DNA seguiu recomendações de Pacheco *et al* (1997). As bactérias foram cultivadas em caldo TSB (Anexo 2, item 1.6) a 37°C, sob agitação, por 18-24 horas. Uma alíquota da cultura foi diluída em água destilada estéril (1:10), imediatamente antes do uso, para determinar a densidade óptica a 600nm. Para o valor da densidade óptica de 0,4, uma alíquota de 200µl da cultura da fase estacionária foi centrifugada e ressuspensa em 900µl de água destilada estéril. A suspensão foi submetida a fervura por 10 minutos, centrifugada e o sobrenadante utilizado como fonte de DNA.

**Quadro 4.** Iniciadores para amplificação randômica do DNA polimórfico em amostras de *E. coli*.

Iniciador	Sequência (5' - 3')	Concentração do primer (pmol/µl)
1254	CCGCAGCCAA	30
A04	AATCGGGCTG	30
M13	GAGGGTGGCGCTTCT	30

Para a reação de PCR foi utilizado um volume de 30 µl, contendo 20mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 250µM de cada dNTP, 30pmol do iniciador, 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 3µl de lisado bacteriano. As amplificações foram realizadas em termociclador *Mastercycler personal* (Eppendorf) programado da seguinte forma: 4 ciclos de 94°C por 5 minutos, 37°C por 5 minutos e 72°C por 5 minutos, seguidos por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 37°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, e uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os amplicons obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose na concentração de 1.5% (p/v) e na voltagem constante de 70V durante aproximadamente 4 horas e 30 minutos. Foi utilizado 4µl de solução corante GelRed (GelRed

Nucleic Acid Gel Stain, 10.000X, Biotium, Uniscience<sup>®</sup>) para a visualização do produto amplificado em transiluminador de luz ultravioleta (UVITec Cambrigde, Reino Unido).

O critério para definição dos perfis eletroforéticos foi baseado na presença, ausência e intensidade das bandas polimórficas. A reprodutibilidade foi avaliada observando-se a repetição do padrão eletroforético a partir de diferentes reações de amplificação e culturas da mesma amostra. Para estimar o tamanho dos fragmentos gerados foi utilizado o padrão de peso molecular na faixa de 1 Kb DNA ladder (Invitrogen<sup>®</sup>). Os perfis foram submetidos à análise visual e computadorizada com o auxílio do programa *UVI bandmap- image acquisition and analysis software*, versão 11.9. O coeficiente Dice de similaridade foi utilizado na análise da árvore genética.

### 3.4.4 Tipagem filogenética

Ensaio de amplificação simultânea foram empregados para a detecção dos marcadores genéticos *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA TSPE4.C2 (Quadro 5), seguindo recomendações descritas por Clermont (2000). Para a extração de DNA, as células bacterianas foram cultivadas em caldo TSB a 37°C por 18 a 24 horas. Após este período, uma alíquota de 40µl do crescimento bacteriano foi submetida à fervura por 10 minutos e utilizada como fonte de DNA.

**Quadro 5.** Iniciadores utilizados para o agrupamento filogenético de *E. coli* (PCR – Triplex)

Iniciador	Sequência (5' - 3')	Gene ou fragmento alvo	Tamanho do amplicon (pb)	Concentração do primer (pmol/µL)
<i>chuA</i> .1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	<i>ChuA</i>	279	20
<i>chuA</i> .2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			
<i>yjaA</i> .1	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	<i>YjaA</i>	211	20
<i>yjaA</i> .2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC			
TSPE4.C2.1	GAGTAATGTCAGGAGACGCTG	TSPE4.C2	152	20
TSPE4.C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG			

Para a reação de PCR foi utilizado um volume final de 20µl contendo 2µl de tampão (100mM Tris-HCl, pH 8,8, 500mM KCl, 1% Triton X-100), 20pmol de cada iniciador (*chuA*.1/*chuA*.2, *yjaA*.1/*yjaA*.2 e TspE4.C2.1/TspE4.C2.2), 100µM de dNTP 80mM, 3mM de MgCl<sub>2</sub> e 2,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>). A reação foi programada para 30 ciclos

de 94°C por 5 segundos, 59°C por 10 segundos, seguida de uma extensão final de 72°C por 5 minutos, após uma desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos.

Os produtos de reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (Anexo 2, item 1.6) em tampão TBE 0,5X a 70V durante 3 horas. Foi utilizado 4µl de solução corante GelRed (GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10.000X, Biotium, Uniscience<sup>®</sup>) para a visualização do produto amplificado em transiluminador de luz ultravioleta (UVITec Cambrigde, Reino Unido). O tamanho dos fragmentos foi estimado pelo padrão de 100pb DNA ladder (Invitrogen<sup>®</sup>). O critério para a definição dos filogrupos seguiu recomendação de Clermont e colaboradores (2000) com base na presença e ausência dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento TSPE4.C2 (figura 8).

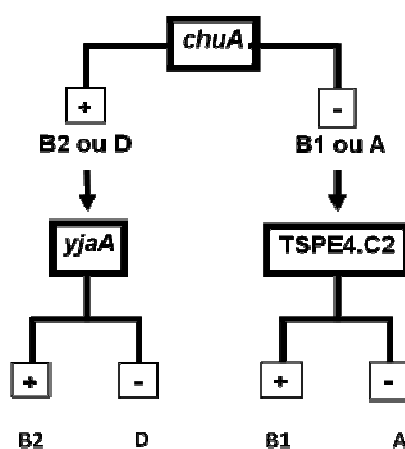


Figura 8. Agrupamento filogenético de *E. coli*.

Fonte: Clermont e colaboradores (2000).

### 3.5 Métodos laboratoriais de investigação: Métodos fenotípicos

#### 3.5.1 Ensaios de aderência empregando células epiteliais em cultura

Os ensaios de aderência foram realizados com as amostras de *E. coli* potencialmente enteropatogênicas utilizando a linhagem celular HEp-2 (ATCC CCL 23) proveniente de carcinoma de laringe humana.

As células epiteliais foram mantidas em meio mínimo essencial de Eagle (MEM – Anexo 2, item 2.1) suplementado com 50µg/mL de gentamicina, 2,5 µg/mL de fungizona e 5% de soro fetal bovino. Para a execução dos testes, as células HEp-2 foram cultivadas sobre lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro, depositadas no fundo dos poços de microplacas de 24 orifícios (Corning). Os tapetes confluentes de células foram infectados com as suspensões bacterianas e incubados pelos períodos de 3 e 6 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Após o tempo de incubação, os tapetes foram submetidos à lavagem com solução neutra de tampão PBS (Tampão fosfato-salino – Anexo 2, item 2.2) e fixados com metanol por 10 minutos e, então, corados por Giemsa (1:10 – Anexo 2, item 2,3) durante 30 minutos, em seguida, as lamínulas foram lavadas com água destilada, montadas em lâminas de vidro para observação em microscópio óptico (Rosa *et al.*, 1998).

As cepas ATCC EAEC 042, EPEC E2348/69 e H1/1 foram utilizadas como controles dos padrões de aderência agregativa, localizada e difusa, respectivamente. A *E. coli* K-12 DH5- $\alpha$  foi utilizada como controle negativo. Foram utilizados os seguintes critérios para a interpretação dos resultados de aderência: a) aderência localizada (AL): observação da formação de microcolônias bacterianas aderidas e agrupadas em áreas específicas da superfície celular; b) aderência difusa (AD): bactérias aderidas ao acaso, por toda a superfície celular; c) aderência agregativa (AA): bactérias aderidas sobre a célula e/ou nos espaços intercelulares, lembrando a disposição de tijolos empilhados; d) sem padrão típico (SPT): bactérias aderidas em pequeno número ou isoladamente, sem a formação de um padrão característico. As amostras foram testadas para ensaios de 3 e 6 horas com repetição. Esse ensaio foi realizado sob a supervisão da Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa, professora adjunto do Departamento de Microbiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

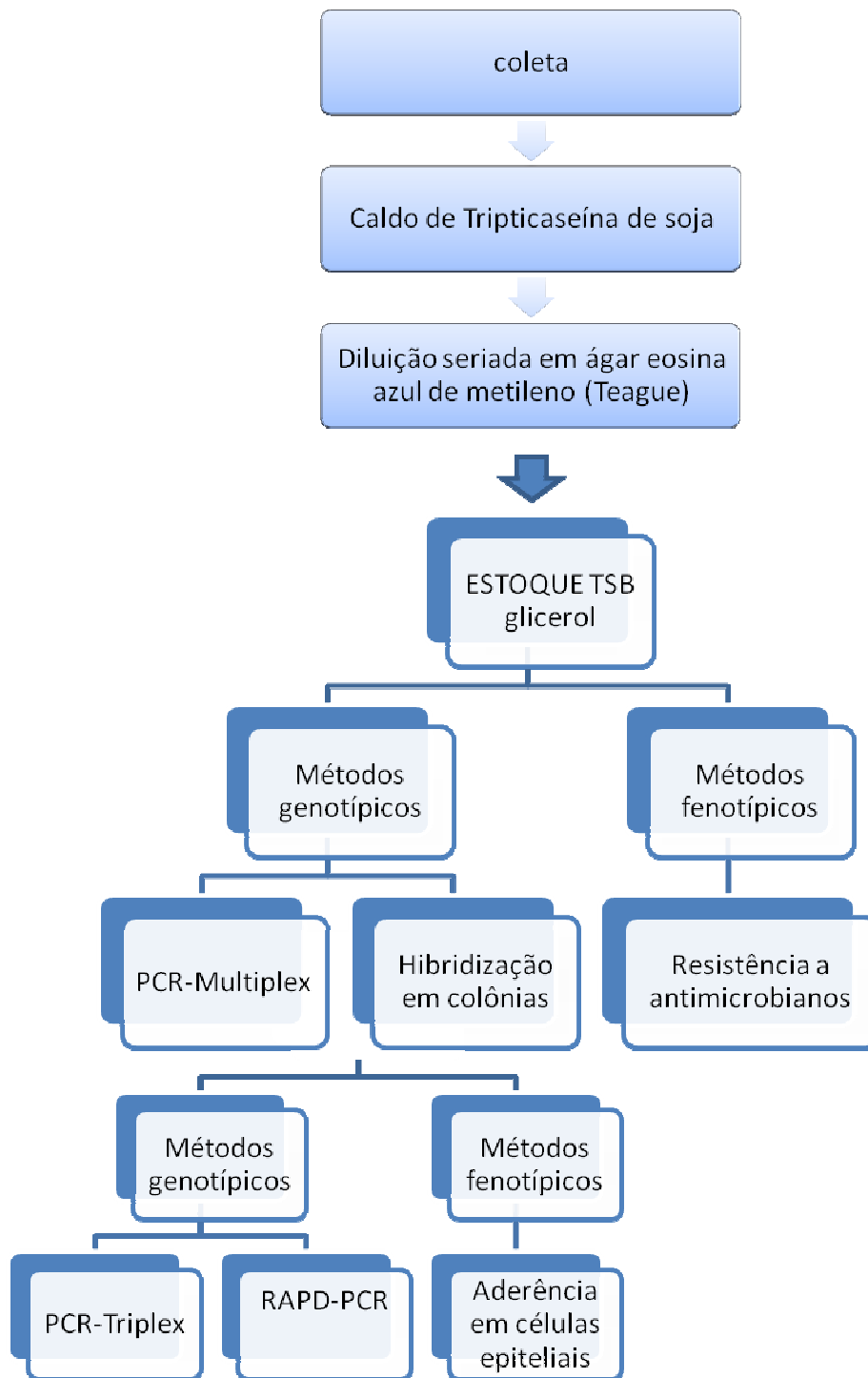
### 3.5.2 Testes de suscetibilidade a antimicrobianos

A suscetibilidade a antimicrobianos foi avaliada empregando o método de difusão em agar seguindo recomendações prévias para execução e interpretação dos resultados (CLSI, 2010). Foram utilizados discos impregnados com os seguintes antimicrobianos: ácido nalidíxico (30mcg), amicacina (30mcg), ampicilina (100mcg), cefalotina (30mcg), cefepima (30mcg), cefoxitima (30mcg), cefoxitina (30mcg), ceftriaxona (30mcg), Ciprofloxacina (0.5mcg), gentamicina (10mcg), nitrofurantoína (300mcg), norfloxacin (100mcg) e sulfametoxazol+trimetoprim (25mcg). Para os controles dos testes de suscetibilidade foram incluídos os seguintes padrões: *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* ATCC 35218.

### 3.6 Análises estatísticas

Os resultados obtidos através da investigação foram analisados pelo teste do  $\chi^2$  corrigido por Yates, com o objetivo de verificar a razão de prevalência e comparar a frequência e distribuição dos patótipos DEC, a fim de avaliar se as proporções observadas mostram ou não diferenças significativas. O programa utilizado foi o Epi Info versão 3.5.1. Valores  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos.

O esquema geral da caracterização realizada para as amostras do estudo está resumido na figura abaixo (Figura 9):



**Figura 9.** Esquema geral de caracterização realizada para as amostras de *E. coli* incluídas neste estudo.

## 4 RESULTADOS

---

Os resultados obtidos no presente estudo foram parcialmente apresentados nos seguintes eventos científicos:

□ **II Simpósio em Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Doenças bacterianas e fúngicas. RJ, 2012. “Resistência a antimicrobianos em amostras de *Escherichia coli* isoladas de crianças indígenas da etnia Guarani no sul do estado do Rio de Janeiro”.**

Verçoza, C<sup>1</sup> ; Périssé A R S<sup>1</sup> ; Marinho D<sup>1</sup> ; Von Söhsten B L<sup>2</sup> ; Regua-Mangia A H<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca;

<sup>2</sup>Serviço de Escritório Local – Rio de Janeiro/Distrito Sanitário Especial Indígena Litoral Sul/SESAI/MS

□ **XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia. SP, 2012. “Marcadores genéticos de enteropatogenicidade em amostras de *Escherichia coli* isoladas de crianças indígenas da etnia Guarani, com e sem diarreia, no sul do estado do Rio de Janeiro”.**

Verçoza, C<sup>1</sup> ; Périssé A R S<sup>1</sup> ; Vieira, M A M<sup>2</sup> ; Marinho D<sup>1</sup> ; Von Söhsten B L<sup>3</sup> ; Gomes T A T<sup>2</sup> ; Regua-Mangia A H<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca;

<sup>2</sup>Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP);

<sup>3</sup>Serviço de Escritório Local – Rio de Janeiro/Distrito Sanitário Especial Indígena Litoral Sul/SESAI/MS

#### 4.1 Isolamento e identificação de *Escherichia coli*

Foram incluídas no estudo 314 amostras de *E. coli* isoladas de 57 crianças, de 0 a 5 anos de idade, moradoras das aldeias Araponga, Sapukai, Mamanguá, Rio Pequeno e Paraty Mirim, localizadas nos municípios de Angra dos Reis e Paraty (Quadro 1). Apenas a partir de uma criança moradora da aldeia Paraty Mirim, não foi possível isolar amostra de *E. coli*. Para cada amostra fecal obtida, foram selecionadas até 8 colônias bacterianas com características morfo-tintoriais sugestivas da espécie visando o isolamento de *E. coli* e a detecção de patótipos diarreio-gênicos circulantes na população em estudo (Tabela 1).

Tabela 1. Isolamento de *E. coli* a partir da população do estudo.

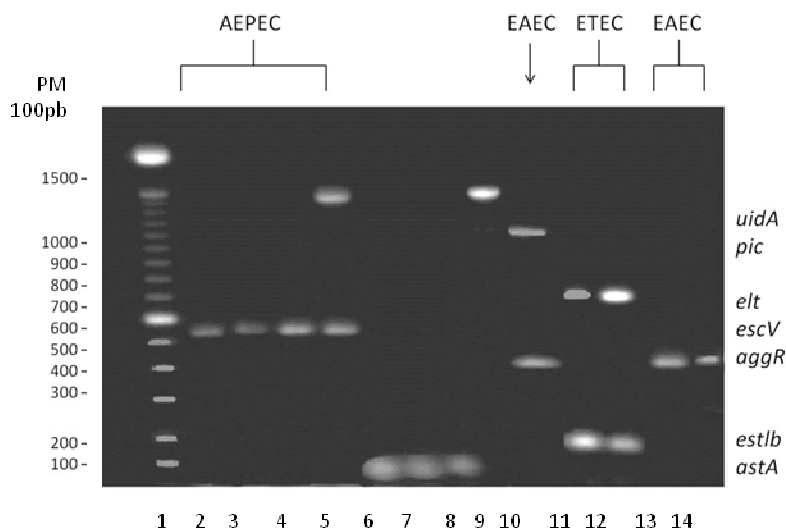
Isolamento de colônias bacterianas	Nº de crianças	Nº de amostras
0 amostra	1	0
1 amostra	1	1
2 amostras	0	0
3 amostras	3	9
4 amostras	6	24
5 amostras	16	80
6 amostras	16	96
7 amostras	8	56
8 amostras	6	48
<b>TOTAL</b>	<b>57</b>	<b>314</b>

#### 4.2 PCR-Multiplex para enterovirulência de *Escherichia coli* (PCR – DEC)

A amplificação dos genes revelou que das 314 amostras de *E. coli* incluídas no estudo, 136 (43%) eram carreadoras de, pelo menos, uma de 12 sequências investigadas (*escV*, *bfpB*, *stx1*, *stx2*, *elt*, *estIa*, *estIb*, *invE*, *astA*, *aggR*, *pic*, *uidA*). Dentre os genes de enterovirulência pesquisados, o mais encontrado foi o *astA* presente em 26% (83/314) das amostras. O gene *escV* foi detectado em 8% (24/314), *uidA* em 7% (21/314), *aggR* em 5% (17/314), *pic* em 2% (5/314) e, *estIb* e *elt*, ambos em 1% das amostras de *E. coli* (3/314). As seguintes combinações genéticas foram detectadas: *escV/uidA*, *aggR/astA*, *aggR/pic*, *estIb/elt/astA*, *astA/uidA*, *pic/uidA*, *aggR/pic/uidA*.

Do total de amostras, 14% (44/314) representaram potencial genético dos enteropatótipos aEPEC, EAEC e ETEC, com os percentuais respectivos de, 55% (24/44), 45% (17/44) e 5% (3/44) (Figura 10).





**Figura 10.** Perfis eletroforéticos obtidos a partir da amplificação simultânea dos genes de enterovirulência. Colunas: (1) peso molecular 100pb; (2, 3 e 4) I07I, I07II e I07III *escV*+; (5) I12V *escV*+ e *uidA*+; (6, 7 e 8) I08I, I08II e I08IV *astA*+; (9) I06III *uidA*+; (10) I30II *aggR*+ e *pic*+; (11 e 12) I24III e I24IV *elt*+ e *estIb*+; (13 e 14) I30IV e I30V *aggR*+.

#### 4.2.1 Distribuição dos genes de enterovirulência detectados por PCR-Multiplex por aldeia indígena.

No grupo das amostras isoladas da aldeia Araponga foram detectados genes de enterovirulência em 83% do total de amostras isoladas desta aldeia (5/6). Todas as 5 amostras foram carreadoras do gene *escV*, definindo a amostra como pertencente ao patotipo aEPEC.

No grupo das amostras isoladas da aldeia de Rio Pequeno foram detectados genes de enterovirulência em 44% do total de amostras isoladas desta aldeia (8/18). Em 50% dessas amostras (4/8) foi detectado o gene *aggR*, definindo o patotipo EAEC. Em 25% (2/8) dessas amostras foram detectadas os genes *astA* e no 25% restante (2/8) o gene *uidA*.

Na aldeia Mamanguá foram detectados genes de enterovirulência em 45% (10/22) do total de amostras isoladas desta aldeia (n= 22). Nesse grupo de amostras, 20% (2/10) eram carreadoras do gene *escV*, definindo o patotipo atípico de EPEC, e 10% (1/10) era portadora também do gene *uidA*. O gene *astA* foi detectado em 40% (4/10) e em 10% (1/10) também a sequência *uidA*. 20% (2/10) amostras possuíam apenas o gene *uidA*, marcador da espécie *Escherichia coli*.

Dentre as amostras isoladas de Sapukai foram detectados genes de enterovirulência em 44% (56/135) da população bacteriana dessa aldeia (n= 135) e as seguintes combinações genéticas: 5% (3/56) *escV/uidA*, definindo o patotipo aEPEC e 3% (2/56) *pic/uidA*. O gene

*escV* apenas foi detectado em 20% desse grupo de amostras (11/56) caracterizando amostras pertencentes ao patotipo aEPEC. O gene *aggR* em 4% (2/56) definindo amostras EAEC. O gene *astA* foi amplificado de 59% (33/56) das amostras e o gene *uidA*, marcador da espécie, em 9% (5/56) das amostras.

Na aldeia Paraty Mirim, foram detectados genes de enterovirulência em 43% (57/133) do total de amostras de *E. coli* isoladas (n= 133). Foi possível detectar as seguintes sequências genéticas: *aggR/pic* em 4% (2/57) das amostras, *aggR/astA* em 4% (2/57), *aggR/pic/uidA* e *astA/uidA*, ambas com 2% (1/57) cada, caracterizando o patotipo EAEC. 5% (3/57) foram carreadoras das sequências *estIb/elt/astA*, caracterizando o patotipo ETEC. As outras amostras foram carreadoras de apenas um gene: 64% do gene *astA* (37/57), 10% do gene *aggR* (6/57) representando amostras do patotipo EAEC, 4% do gene *escV* (2/57), definindo o patotipo aEPEC e 5% do gene *uidA* (3/57), marcador de *E. coli*.

A distribuição dos marcadores genéticos obtidos através do ensaio MPCR está representada abaixo (Tabela 2).

**Tabela 2.** Distribuição por aldeia indígena de amostras carreadoras dos genes de enterovirulência obtidas a partir do ensaio PCR-Multiplex

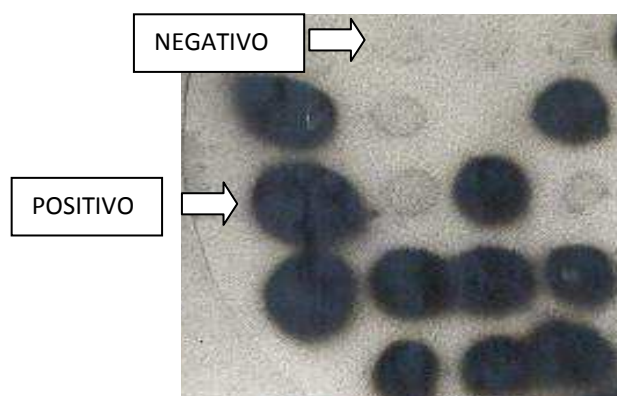
Aldeia	Marcadores genéticos de enterovirulência											TOTAL por aldeia
	<i>uidA</i>	<i>escVC</i>	<i>astA</i>	<i>aggR</i>	<i>escV/uidA</i>	<i>aggR/astA</i>	<i>aggR/pic</i>	<i>aggR/pic/uidA</i>	<i>estIb/elt/astA</i>	<i>astA/uidA</i>	<i>pic/uidA</i>	
	aEPEC		EAEC	aEPEC	EAEC	EAEC	EAEC	EAEC	ETEC			
Araponga	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
Rio Pequeno	2	-	2	4	-	-	-	-	-	-	-	8
Mamanguá	2	2	4	-	1	-	-	-	-	1	-	10
Sapucaí	5	11	33	2	3	-	-	-	-	-	2	56
Paraty Mirim	3	2	37	6	-	2	2	1	3	1	-	57
<b>TOTAL</b>	<b>12</b>	<b>20</b>	<b>76</b>	<b>12</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>136</b>

**Legenda.** (aEPEC) *Escherichia coli* enteropatogênica atípica; (EAEC) *Escherichia coli* enteroagregativa; (ETEC) *Escherichia coli* enterotoxigênica.

### 4.3 Ensaios de hibridização em colônias para a detecção de genes de enteropatogenicidade

Os resultados obtidos a partir dos ensaios de hibridização em colônias detectaram marcadores de enteropatogenicidade em 10% das amostras do estudo (30/314) a partir das 8 seqüências investigadas: *st* (ETEC), *lt* (ETEC), *eae* (EPECt ou aEPEC), *bfpA*(EPECt), *att* (EAEC), *ipaC* (EIEC), *stx1*(STEC) e *stx2* (STEC). Dentre os genes de enterovirulência pesquisados o gene *eae* foi detectado em 5% (16/314) das amostras incluídas no estudo (n=314). O gene *att* foi detectado em 4% (13/314) e *lt* em 0,3% (1/314).

Esses resultados permitiram detectar o patotipo ETEC em 3% (1/30) da população potencialmente enterovirulenta, EAEC em 43% (13/30) e aEPEC em 54% (16/30) (Figura 11).



**Figura 11.** Autorradiografia ilustrando filtro hibridizado com fragmentos para o marcador *eae*. Hibridização positiva: amostras I04I, I04III, I04IV, I04V, I04VI, I12VII, I13II, I20II, I20III, I20V e I20VII. Hibridização negativa: amostras I04VII, I05I, I05II, I05III, I05IV, I05V e I05VI.

#### 4.3.1 Distribuição dos genes de enterovirulência detectados por Hibridização em colônias por aldeia indígena

No grupo das amostras isoladas da aldeia Mamangá não foram detectadas amostras carrreadoras dos genes de enterovirulência através do ensaio de Hibridização em colônias.

Na aldeia Araponga, foram detectadas amostras carrreadoras dos genes de enterovirulência em 23% (5/22) do total de amostras isoladas desta aldeia (n= 22). Essas 5 amostras possuíam apenas o gene *eae* e assim definidas como pertencentes ao patotipo aEPEC.

Na aldeia Sapukai, foram detectadas 14 amostras com potencial de enterovirulência. 79% (11/14) carreadoras apenas do gene *eae* definindo aEPEC, 7% (1/14) do gene *lt*, patotipo ETEC e 14% das amostras (2/14) carreadoras do gene *att*, definindo o patotipo EAEC.

No grupo de amostras isoladas da aldeia Paraty Mirim, foram detectadas cepas carreadoras do gene *att* em 7% (9/133) do total de amostras isoladas, definindo o patotipo EAEC. A distribuição dos marcadores genéticos obtidos através do ensaio de Hibridização está representada abaixo (Tabela 3).

**Tabela 3.** Distribuição por aldeia indígena de amostras carreadoras dos genes de enterovirulência obtidas a partir do ensaio Hibridização

Aldeia	Marcadores genéticos de enterovirulência				TOTAL por aldeia
	<i>lt</i>	<i>eae</i>	<i>Att</i>	<i>ipaC</i>	
	ETEC	EPEC	EAEC	EIEC	
Araponga	-	5	-	-	5
Rio Pequeno	-	-	2	-	2
Sapukai	1	11	2	-	14
Mamanguá	-	-	-	-	-
Paraty Mirim	-	-	9	-	9
<b>TOTAL</b>	<b>1</b>	<b>16</b>	<b>13</b>	<b>-</b>	<b>30</b>

**Legenda.** (EPEC) *Escherichia coli* enteropatogênica; (EAEC) *Escherichia coli* enteroagregativa; (ETEC) *Escherichia coli* enterotoxigênica (EIEC) *Escherichia coli* enteroinvasora.

#### 4.4 PCR-Multiplex e Hibridização em colônias: sensibilidade para a detecção dos patotipos

Para o patotipo ETEC, os genes foram amplificados de três amostras (de uma mesma criança – identificação I24) a partir de ensaios do PCR-Multiplex e uma diferente amostra (pertencente a outra criança – I08) do ensaio de hibridização em colônias. Para o patotipo EAEC, a amplificação do gene grupo-específico foi observada em dezessete amostras pelo ensaio PCR-Multiplex e em treze amostras (também detectados pelo PCR-Multiplex) pelo no ensaio de Hibridização em colônias. Para o patotipo aEPEC, foi possível detectar amostras carreadoras de gene específico em dezesseis amostras para ambos os ensaios (PCR-Multiplex e Hibridização) e em mais onze amostras somente no ensaio PCR-Multiplex (Tabela 4).

29 amostras obtiveram resultados positivos para o mesmo patotipo em ambos os ensaios.

**Tabela 4.** Amostras potencialmente enterovirulentas definidas como patotipos pelos ensaios amplificação e hibridização.

patotipos DEC	Ensaio para a detecção dos genes		TOTAL
	PCR-Multiplex	Hibridização	
EPEC	27 (56%)	16 (33%)	27 (56%)
STEC	-	-	-
ETEC	3 (6%)	1 (2%)	4 (8%)
EAEC	17 (36%)	13 (27%)	17 (36%)
DAEC	-	-	-
EIEC	-	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>47 (98%)</b>	<b>30 (62%)</b>	<b>48 (100%)</b>

**Legenda.** (EPEC) *Escherichia coli* enteropatogênica; (STEC) *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga; (ETEC) *Escherichia coli* enterotoxigênica; (EAEC) *Escherichia coli* enteroagregativa; (DAEC) *Escherichia coli* de aderência difusa; (EIEC) *Escherichia coli* enteroinvasora.

#### 4.4.1 Distribuição das amostras potencialmente enterovirulentas

Das 48 amostras pertencentes a um dado patotipo, 43% (20/48) estavam presentes na aldeia Sapukai, 33% (16/48) na aldeia Paraty Mirim, 10% (5/48) na aldeia Araçuaia, 8% (4/48) na aldeia Rio Pequeno e 6% (3/48) na aldeia Mamanguá (Tabela 5). Devido ao universo limitado da amostragem proveniente das aldeias Araçuaia (n=6), Mamanguá (n=22) e Rio Pequeno (n=18) foi formado um grupo denominado de aldeias pequenas visando a análise de prevalência. As aldeias Sapukai (n=135) e Paraty Mirim (n=133) foram analisadas separadamente. A prevalência dos patotipos DEC nas aldeias pequenas foi menor do que a razão de prevalência dos patotipos DEC quando comparadas com as aldeias Sapukai e Paraty Mirim. aEPEC foi detectada em 56% (27/48) das amostras, isoladas de crianças sem diarreia na faixa etária de 4 meses a 4 anos de idade, moradoras das aldeias Sapukai, Mamanguá e Paraty Mirim. EAEC foi detectada em 36% (17/48) das amostras obtidas de crianças de 17 dias a 5 anos de idade, moradoras das aldeias Sapukai, Rio Pequeno e Paraty Mirim. Apenas este patotipo foi isolado de uma criança de 9 meses idade com quadro diarreico agudo e febre. ETEC foi detectada em 8% (4/48) das amostras, obtidas de duas crianças sem diarreia, ambas com 3 anos de idade, moradoras das aldeias Sapukai e Paraty Mirim. Para análises estatísticas foi necessário categorizar três grupos de faixa etária distintos, sendo de 0 a 1 ano de idade, >1 a 3 anos de idade e >3 a 5 anos de idade. A prevalência dos patotipos DEC para as crianças de 0 a 1 ano de idade foi maior do que a prevalência dos patotipos DEC tanto para as crianças de >1 a 3 anos de idade quanto >3 a 5 anos de idade. A razão de prevalência se mostrou estatisticamente significativa ( $p \leq 0,0000185$ ;  $\chi^2 = 18,34$ ;  $p \leq 0,0001486$ ;  $\chi^2 = 14,39$ ).

## **ALDEIA SAPUKAI**

Na aldeia Sapukai foram detectadas 20 amostras que definem um patotipo específico, sendo 5% (1/20) ETEC pertencente a uma criança controle da faixa etária de >1 a 3 anos de idade. 10% (2/20) EAEC, pertencentes a uma mesma criança caso (com o quadro diarreico e febre) da faixa etária de 0 a 1 ano de idade e 85% (17/20) aEPEC, pertencentes a 6 crianças controles, sendo três crianças da faixa etária de 0 a 1 ano de idade, uma criança da faixa etária de >1 a 3 anos de idade e duas crianças da faixa etária de >3 a 5 anos de idade. Análises estatísticas mostraram que a aldeia Sapukai tem maior chance de um patotipo estar presente do que as aldeias pequenas ( $RP= 0,36 / 0,20 < RP < 0,62$ ), sendo estatisticamente significativo ( $p \leq 0,0009146$ ;  $\chi^2 = 10,99$ ).

## **ALDEIA PARATY MIRIM**

Na aldeia Paraty Mirim, foram detectadas 16 amostras que definem um patotipo específico, sendo que 19% (3/16) ETEC pertencentes a uma mesma criança controle da faixa etária de >1 a 3 anos de idade, 69% (11/16) EAEC, pertencentes a 4 crianças controles, sendo duas da faixa etária de 0 a 1 ano de idade, uma da faixa etária >1 a 3 anos de idade e uma criança da faixa etária >3 a 5 anos de idade e 12% (2/16) aEPEC, pertencentes a 2 crianças controles da faixa etária de >1 a 3 anos de idade. Análises estatísticas mostraram que a aldeia Paraty Mirim tem maior chance de um patotipo estar presente do que as aldeias pequenas ( $RP= 0,22 / 0,11 < RP < 0,42$ ), sendo estatisticamente significativo ( $p \leq 0,0000053$ ;  $\chi^2 = 20,73$ ).

## **ALDEIAS PEQUENAS**

O grupo das aldeias pequenas engloba três aldeias (Rio Pequeno, Mamangá e Araçonga) que apresentam infra-estrutura e valor populacional similares (poucas residências com acesso mais difícil aos centros urbanos do que das aldeias maiores – Sapukai e Paraty Mirim – com três, cinco e uma criança, respectivamente). As amostras de *E. coli* potencialmente enterovirulentas serão descritas a seguir: Na aldeia Araçonga foram detectadas 5 amostras aEPEC pertencentes a uma mesma criança controle da faixa etária de >1 a 3 anos de idade. Na aldeia Rio Pequeno foram detectadas 4 amostras EAEC pertencentes a duas crianças controles, uma da faixa etária de >1 a 3 anos de idade e outra da faixa etária >3 a 5 anos de idade. Na aldeia Mamangá foram detectadas 3 amostras aEPEC pertencentes a uma mesma criança controle da faixa etária de >3 a 5 anos de idade.

**Tabela 5.** Distribuição por aldeia indígena de marcadores genéticos de enterovirulência investigados nas amostras de *E. coli* a partir dos ensaios de amplificação e de hibridização.

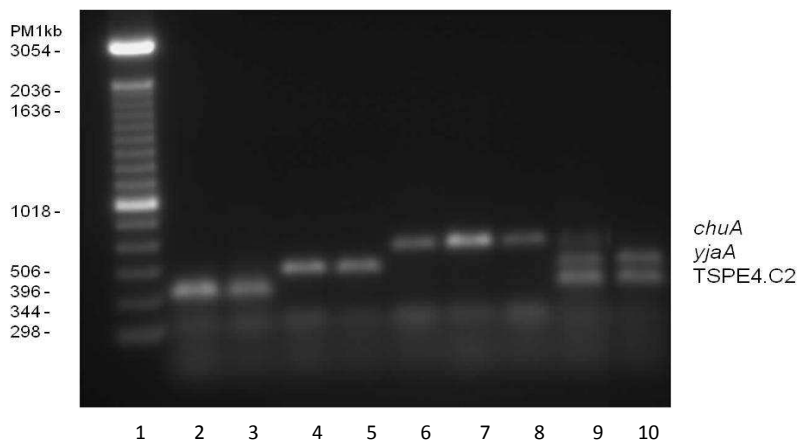
ALDEIA	Nº AMOSTRAS	FAIXA ETÁRIA	CASO/CONTROLE	PATOTIPOS
SAPUKAI	20	17 dias - 5 anos	1 caso *	EAEC
			7 controles	EAEC; aEPEC; ETEC
PARATY MIRIM	16	17 dias - 5 anos	7 controles	EAEC; aEPEC; ETEC
RIO PEQUENO	4	10 meses - 5 anos	2 controles	EAEC
MAMANGUÁ	3	4 meses	1 controle	aEPEC
ARAPONGA	5	3 anos	1 controle	aEPEC

**Legenda.** \* criança caso:diarreia aguda e febre.

#### 4.5 PCR-Triplex para agrupamento filogenético de *Escherichia coli*

Os resultados da filogrupagem revelaram que as 48 amostras de *E. coli* potencialmente enterovirulentas se encontram distribuídas nos quatro grupos filogenéticos descritos por Clermont e colaboradores (2000). Os isolados foram encontrados, principalmente, no grupo A (56%), seguindo-se os grupos B1 (26%) e B2 e D, ambos com 9%. (Figura 12).

De acordo com a distribuição dos marcadores investigados, detectamos a presença de seis diferentes perfis genéticos com base nas combinações das sequências genéticas *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA TSPE4.C2. Para o filogrupo A foram detectados os genótipos -,-,- e -,+,- representando 40% (19/48) e 16% (8/48) do total de amostras respectivamente. O filogrupo B2 teve como representantes os genótipos +,+,- e +,+,+, correspondendo a 2% (1/48) e 7% (3/48) do total de amostras respectivamente. Já os grupos B1 e D apresentaram somente um genótipo cada, sendo, -,+,+ e +,-,- e correspondendo aos percentuais de 26% (13/48) e 9% (4/48), respectivamente. Somente a sequência +,-,+ (designada filotipo D<sup>1</sup>) não foi detectada entre as amostras de *E. coli* enterovirulentas incluídas no estudo. Para o patotipo ETEC, somente o filogrupo A foi detectado. Para o patotipo EAEC, foram detectados os filogrupos A, B1, B2 e D. Para o patotipo aEPEC, foram detectados os filogrupos A, B1 e B2 (Tabela 6).



**Figura 12.** Perfis eletroforéticos de amostras de *E. coli* carreadoras dos marcadores filogenéticos. Colunas: (1) peso molecular 1kb; (2 e 3) I33VI e I33VII TSPE4.C2+; (4 e 5) I24III e I24IV *yjaA*+; (6, 7 e 8) I30I, I30II e I30III *chuA*+; (9) I46III TSPE4.C2+, *yjaA*+ e *chuA*+; (10) I30V TSPE4.C2+ e *yjaA*+

**Tabela 6.** Grupo e perfil filogenético das amostras de *E. coli* potencialmente enterovirulentas incluídas no estudo.

Grupo filogenético	Perfil filogenético			Nº de amostras (%)	Patotipos
	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TSPE4.C2		
A <sup>1</sup>	-	-	-	19(40%)	ETEC; EAEC;aEPEC
A <sup>2</sup>	-	+	-	8(16%)	ETEC; EAEC;aEPEC
B2 <sup>1</sup>	+	+	-	1(2%)	aEPEC
B2 <sup>2</sup>	+	+	+	3(7%)	EAEC
B1	-	+	+	13(26%)	EAEC e aEPEC
D <sup>1</sup>	+	-	+	-(0%)	-
D <sup>2</sup>	+	-	-	4(9%)	EAEC
<b>TOTAL</b>				<b>48(100%)</b>	

#### 4.5.1 Filotipagem por aldeia indígena

O grupo filogenético A<sup>1</sup> esteve presente em todas as aldeias indígenas do estudo e o grupo D<sup>1</sup> ausente nas aldeias.

Na aldeia Araponga, 60% (3/5) pertencem ao grupo A<sup>1</sup> e 40% (2/5) ao grupo B1. Na aldeia Rio Pequeno, 50% (2/4) pertencem ao grupo A<sup>1</sup> e 50% (2/4) ao grupo B1. Na aldeia Mamanguá, 33% (1/3) pertencem ao grupo A<sup>1</sup> e 67% (2/3) pertencem ao grupo A<sup>2</sup>. Na aldeia Sapukai, a maioria das amostras (60% - 12/20) pertence ao grupo A<sup>1</sup>, 5% (1/20) ao grupo A<sup>2</sup>, 30% (3/20) ao grupo B1 e 5% (1/20) ao grupo B2<sup>1</sup>. Na aldeia Paraty Mirim, 6% (1/16) pertencem ao grupo A<sup>1</sup>, 31% (5/16) ao grupo A<sup>2</sup>, 19% (3/16) pertencem ao grupo B1, 19% (3/16) ao grupo B2<sup>2</sup> e 25% (4/16) ao grupo D<sup>2</sup> (Tabela 7).

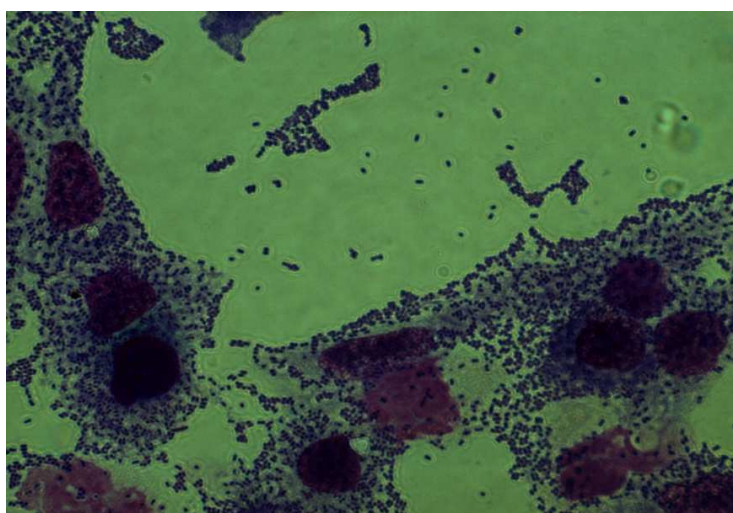


**Tabela 7.** Distribuição por aldeia indígena das amostras potencialmente enterovirulentas entre os filogrupos

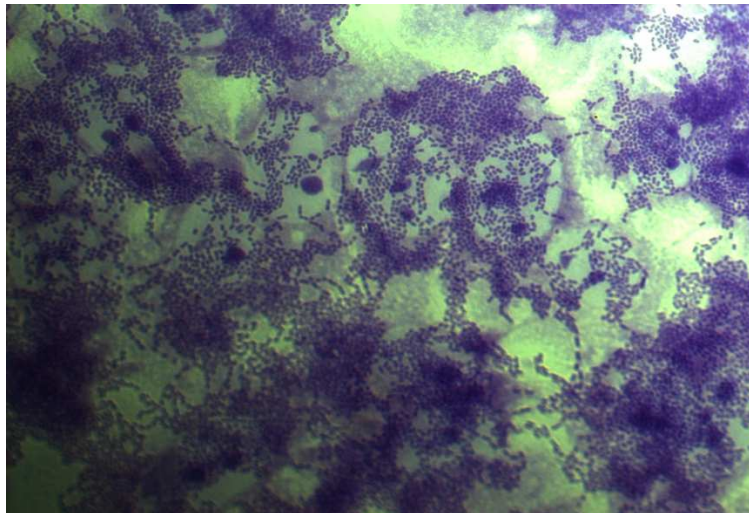
ALDEIAS	Nº AMOSTRAS POR FILOGRUPO						
	A <sup>1</sup>	A <sup>2</sup>	B1	B2 <sup>1</sup>	B2 <sup>2</sup>	D <sup>1</sup>	D <sup>2</sup>
ARAPONGA	3	-	2	-	-	-	-
RIO PEQUENO	2	-	2	-	-	-	-
MAMANGUÁ	1	2	-	-	-	-	-
SAPUKAI	12	1	6	1	-	-	-
PARATY MIRIM	1	5	3	-	3	-	4
<b>TOTAL (n=48)</b>	<b>19</b>	<b>8</b>	<b>13</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>-</b>	<b>4</b>

#### 4.6 Método fenotípico: Aderência em células HEp-2 em cultura para amostras potencialmente enterovirulentas.

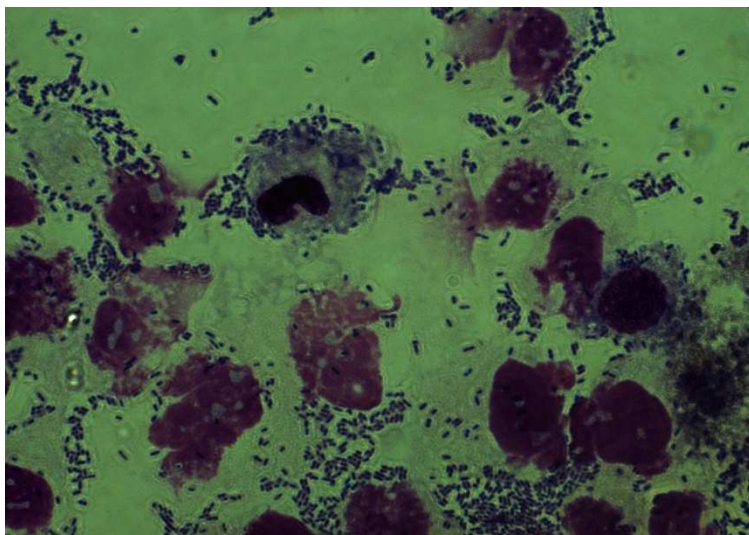
As 48 amostras potencialmente enterovirulentas foram submetidas ao teste de aderência em células HEp-2 pelos períodos de 3 horas e 6 horas. Os resultados obtidos revelaram que 100% (17/17) das cepas EAEC exibiu um padrão típico agregativo (AA) tanto no ensaio de 3 horas quanto no de 6 horas (Figura 13 e 14). Dentre as amostras de ETEC, 75% (3/4) apresentou um perfil de aderência agregativa (AA) no ensaio de 3 horas (Figura 15) e 25% (1/4) apresentou um perfil de aderência discreta sem padrão típico (SPT) (Figura 16). No ensaio de 6 horas, 100% das amostras ETEC apresentaram o perfil sem padrão típico (SPT) (Figura 17). As amostras aEPEC apresentaram em 11% (3/27) o perfil de aderência agregativa (AA) no ensaio de 3 horas (Figura 18) e foi confirmado o perfil agregativo (AA) no ensaio de 6 horas (Figura 19). As restantes, 89% apresentaram tanto no ensaio de 3 horas quanto no de 6 horas, aderência discreta a moderada sem padrão típico (SPT) (Figuras 20 e 21). Os resultados das 48 amostras analisadas são mostrados abaixo (Tabela 8).



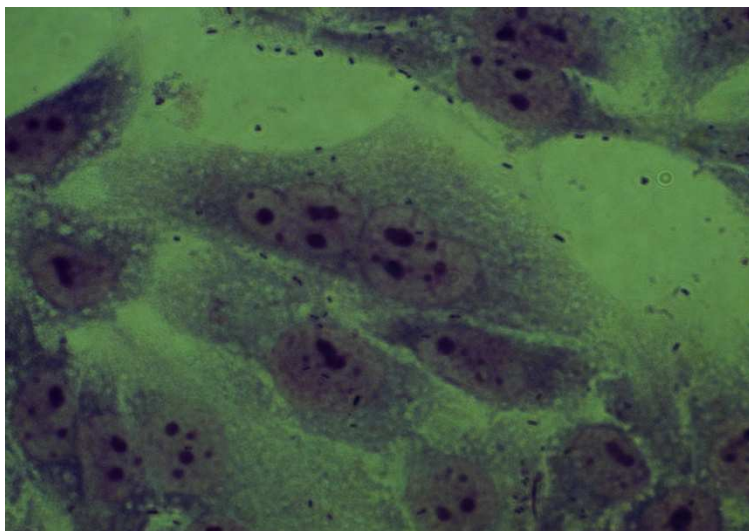
**Figura 13.** Fenótipo agregativo exibido por amostra de EAEC em ensaio de aderência de 3 horas.



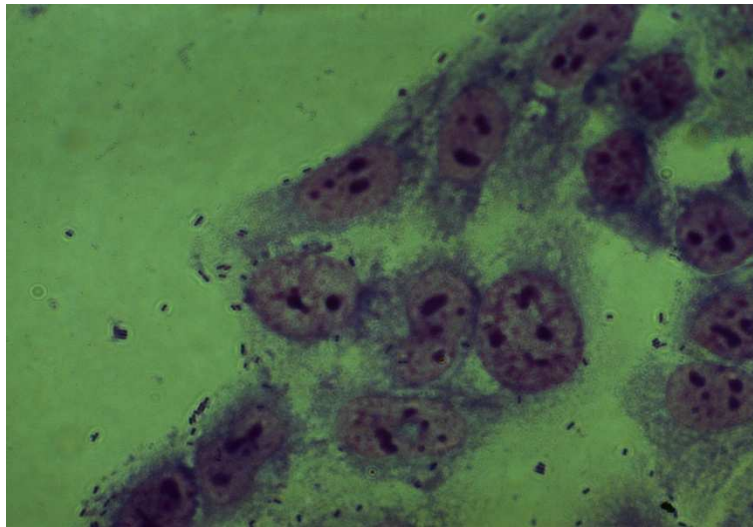
**Figura 14.** Fenótipo agregativo exibido por amostra de EAEC em ensaio de aderência de 6 horas



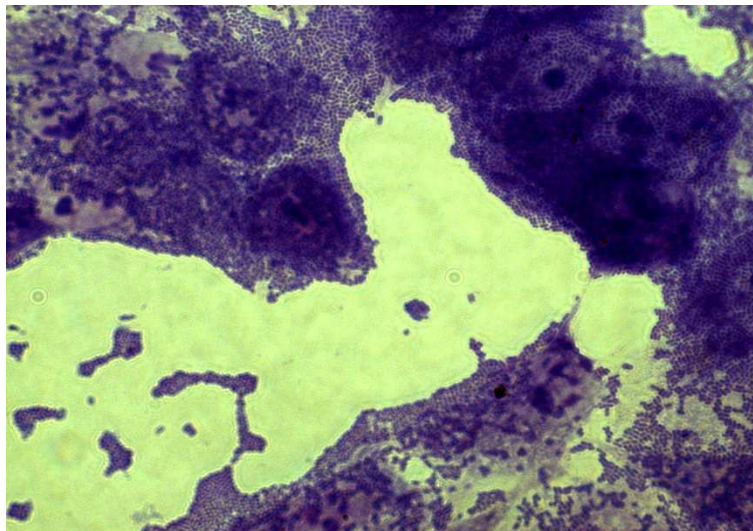
**Figura 15.** Fenótipo agregativo exibido por amostra ETEC em ensaio de aderência de 3 horas.



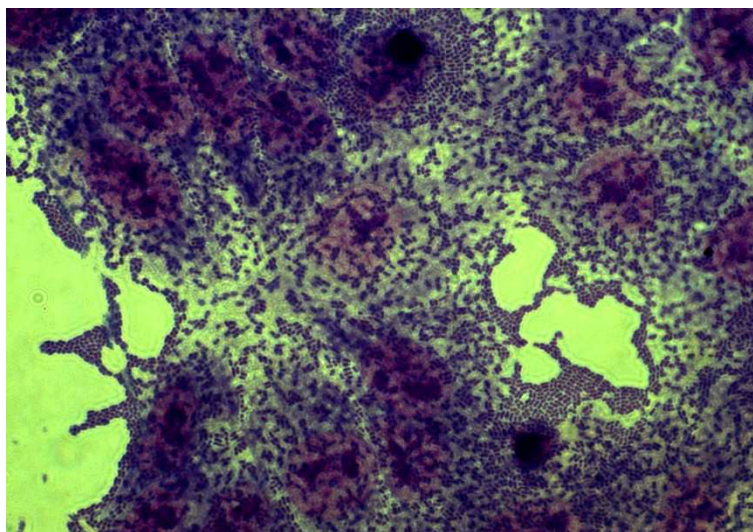
**Figura 16.** Fenótipo sem padrão típico por amostra ETEC em ensaio de aderência de 3 horas.



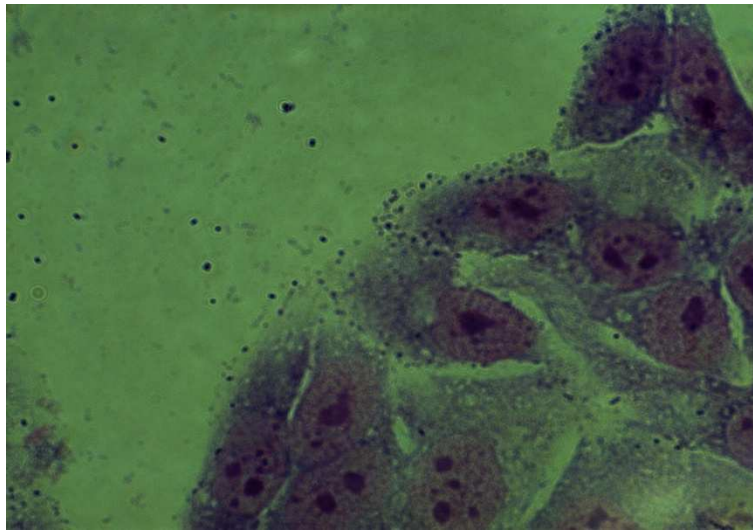
**Figura 17.** Fenótipo sem padrão típico exibido por amostra ETEC em ensaio de aderência de 6 horas.



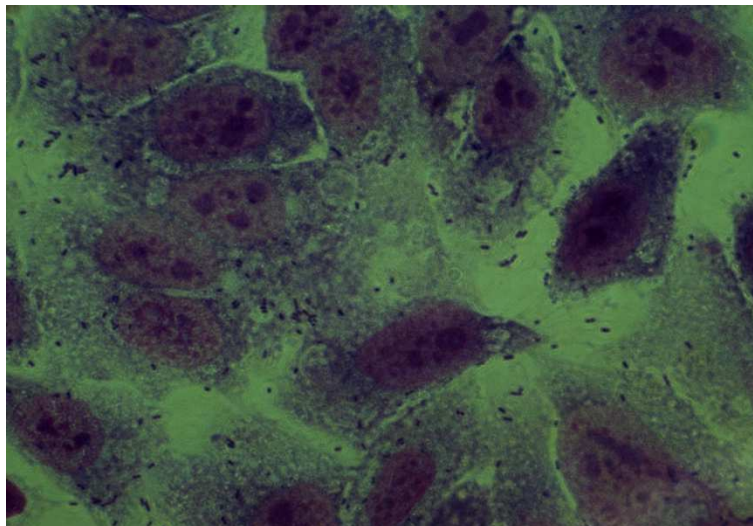
**Figura 18.** Fenótipo agregativo exibido por amostra aEPEC em ensaio de aderência de 3 horas.



**Figura 19.** Fenótipo agregativo exibido por amostra aEPEC em ensaio de aderência de 6 horas.



**Figura 20.** Fetótipo sem padrão típico exibido por amostra aEPEC em ensaio de aderência de 3 horas.



**Figura 21.** Fetótipo sem padrão típico exibido por amostra aEPEC em ensaio de aderência de 6 horas.

**Tabela 8.** Distribuição dos perfis de aderência entre as amostras enterovirulentas.

PATOTIPO	AA		SPT	
	3h	6h	3h	6h
<b>ETEC (n= 4)</b>	4	–	–	4
<b>EAEC (n= 17)</b>	17	17	–	–
<b>aEPEC (n= 27)</b>	3	3	24	24

Legenda: (AA) padrão de aderência agregativo; (SPT) sem padrão típico de aderência; (ETEC) *Escherichia coli* enterotoxigênica; (EAEC) *Escherichia coli* enteroagregativa; (aEPEC) *Escherichia coli* enteropatogênica atípica.

#### 4.6.1 Distribuição por aldeia indígena dos padrões fenotípicos de aderência em células de cultura para amostras potencialmente enterovirulentas.

Na aldeia de Sapukai, a amostra ETEC (5% - 1/20) foi categorizada sem padrão típico (SPT), as amostras EAEC (10% - 2/20) exibiram aderência agregativa (AA) e para as amostras aEPEC, 80% (16/20) foram porém sem padrão típico (SPT) e 5% (1/20) padrão agregativo (AA). Na aldeia Rio Pequeno, 100% (4/4) das amostras EAEC apresentaram um perfil de aderência agregativa (AA). Na aldeia Mamanguá, 33% (1/3) das amostras aEPEC apresentaram um perfil de aderência agregativa (AA), enquanto 67% (2/3) das aEPEC foram sem padrão típico (SPT). Na aldeia Araponga, 100% (5/5) das amostras aEPEC foram sem padrão típico (SPT). Na aldeia Paraty Mirim, 100% das amostras ETEC (3/3) foram sem padrão típico (SPT), 100% das amostras EAEC (11/11) apresentaram perfil de aderência agregativa (AA) e para as amostras aEPEC, 50% (1/2) apresentaram um perfil agregativo (AA) e 50% (1/2) foram sem padrão típico (SPT) (Tabela 9).

**Tabela 9.** Distribuição por aldeia indígena dos perfis de aderência entre as amostras potencialmente enterovirulentas

ALDEIAS	Nº DE AMOSTRAS	PERFIL DE ADERÊNCIA	
		AA	SPT
ARAPONGA	5	-	5
RIO PEQUENO	4	4	-
MAMANGUÁ	3	1	2
SAPUKAI	20	3	17
PARATY MIRIM	16	12	4
<b>TOTAL</b>	<b>48</b>	<b>20</b>	<b>28</b>

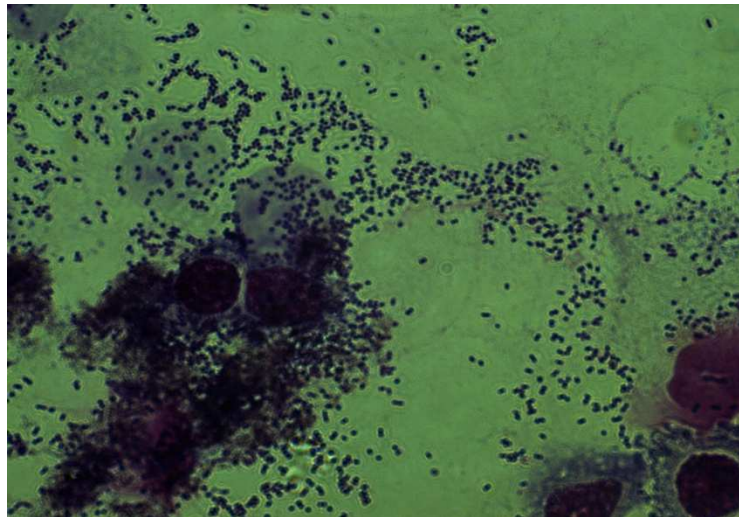
**Legenda.** (AA) aderência agregativa; (SPT) sem padrão típico.

#### 4.7 Método fenotípico: Aderência em células HEp-2 em cultura para amostras carreadoras dos genes *ast* e *pic*.

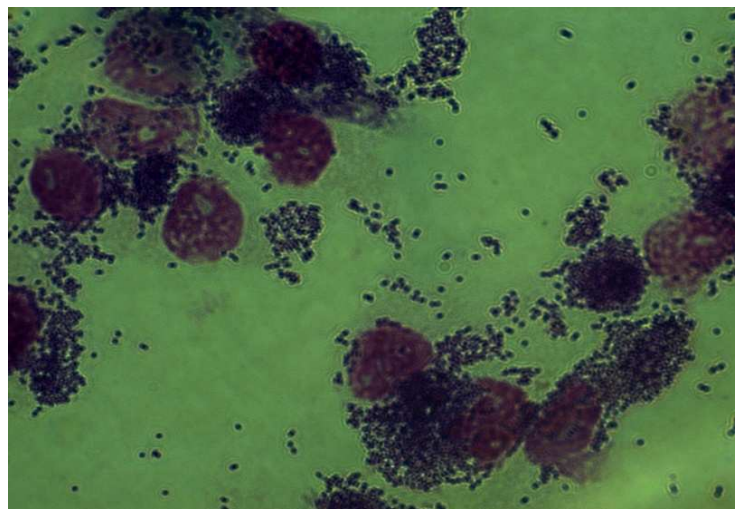
Das 314 amostras de *E. coli* incluídas no estudo 26% (83/314) foram positivas para o gene *ast*, entretanto, 6 amostras carreadoras do gene *ast* também foram portadoras de genes específicos de algum patotipo (2% - 2/83 para o gene *aggR*, 3% - 3/83 para os genes *elt* e *estIb* e 1% - 1/83 somente para o gene *elt*). Logo, 94% (77/83) das amostras positivas somente para o gene *ast* foram incluídas no ensaio de aderência em células de cultura posteriormente para a observação de algum fenótipo específico.

Das 314 amostras incluídas nos ensaios de detecção de marcadores genéticos, 16% (5/314) amostras foram positivas para o gene *pic*, entretanto, 60% (3/5) também foram positivas para o gene *aggR*, específico do patotipo EAEC. Logo, 40% (2/5) amostras positivas somente para o gene *pic* foram incluídas no ensaio de aderência em células de cultura posteriormente para a observação de algum fenótipo específico.

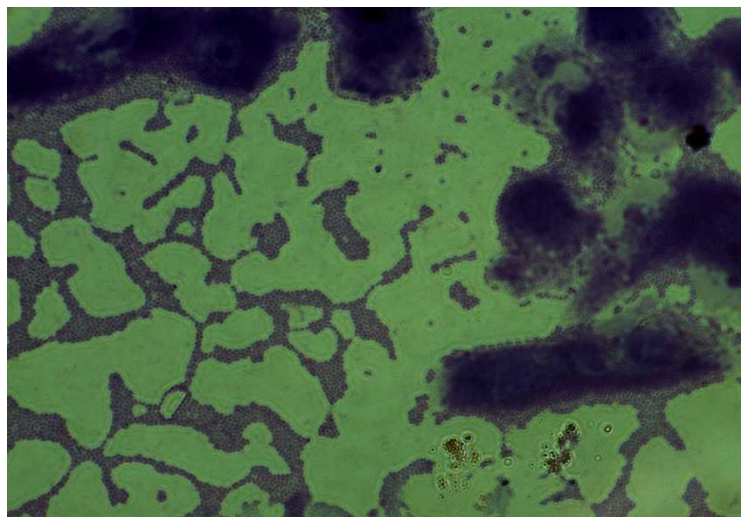
As 79 amostras foram assim submetidas ao teste de aderência em celular HEp-2 pelo período de 6 horas. Os dados obtidos revelaram que 100% (2/2) das amostras positivas para o gene *pic* exibiram um padrão agregativo (AA) (Figura 22). Já as amostras positivas para o gene *ast*, apresentaram 7% (5/77) o padrão de aderência localizada formada por microcolônias (AL) (Figura 23), 31% (24/77) apresentaram o padrão de aderência agregativa (AA) (Figura 24) e 62% (48/77) foram sem padrão típico (SPT) (Figura 25) (Tabela 10).



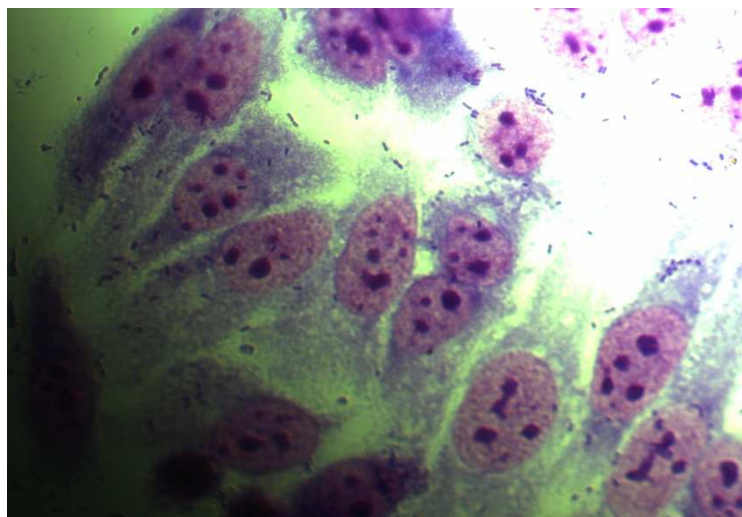
**Figura 22.** Fenótipo agregativo exibido por amostra carreadora do gene em ensaio de aderência de 6 horas.



**Figura 23.** Fenótipo localizado exibido por amostra carreadora do gene *astA* em ensaio de aderência de 6 horas.



**Figura 24.** Fenótipo agregativo exibido por amostra carreadora do gene *astA* exibindo o padrão agregativo em ensaio de aderência de 6 horas.



**Figura 25.** Fenótipo sem padrão típico exibido por amostra carreadora do gene *astA* em ensaio de aderência de 6 horas.

**Tabela 10.** Distribuição dos perfis de aderência entre as amostras carreadoras dos genes *astA* e/ou *pic*.

positividade para o gene	Ensaio de 6 horas		
	AA	SPT	AL
<i>Ast</i>	24	48	5
<i>Pic</i>	2	-	-

**Legenda.** (AA) aderência agregativa; (SPT) sem padrão típico; (AL) aderência localizada.

#### **4.7.1 Distribuição por aldeia indígena dos padrões fenotípicos de aderência em células de cultura para amostras carreadoras dos genes *ast* e *pic*.**

As amostras positivas para o gene *pic* e que exibiram o perfil de aderência agregativa (AA) se encontravam 100% (2/2) presentes na aldeia Sapukai. As amostras positivas para o gene *ast* estavam em 49% (38/77) na aldeia Paraty Mirim, sendo que destas, 58% (22/38) não exibiram padrão típico (SPT), 39% (15/38) exibiram um padrão agregativo (AA) e 3% (1/38) exibiram um padrão de aderência localizada formada por microcolônias (AL).

As amostras positivas para o gene *ast* estavam em 42% (32/77) na aldeia Sapukai, sendo que destas, 12% (7/32) exibiram um padrão de aderência agregativa (AA), 22% (4/32) exibiram um padrão de microcolônias localizadas (AL) e 66% (21/32) não exibiram padrão típico (SPT). As amostras positivas para o gene *ast* estavam em 7% (5/77) na aldeia Mamangá, sendo que destas, 20% (1/5) exibiram um padrão agregativo (AA) e 80% (4/5) não exibiram padrão típico (SPT). As amostras positivas para o gene *ast* estavam em 2% (2/77) na aldeia Rio Pequeno, sendo que destas 100% (2/2) exibiram um padrão agregativo (AA). Nenhuma amostra positiva para os genes *ast* e *pic* foi detectada na aldeia Araponga (Tabela 11).



**Tabela 11.** Distribuição por aldeia indígena dos perfis de aderência entre as amostras carreadoras dos genes *ast* e/ou *pic*

ALDEIAS	Nº DE AMOSTRAS	PERFIL DE ADERÊNCIA		
		AA	SPT	AL
ARAPONGA	-	-	-	-
RIO PEQUENO	2	2	-	-
MAMANGUÁ	5	1	4	-
SAPUKAI	34	9	21	4
PARATY MIRIM	38	15	22	1
<b>TOTAL</b>	<b>79</b>	<b>27</b>	<b>47</b>	<b>5</b>

**Legenda.** (AA) aderência agregativa; (SPT) sem padrão típico (AL) aderência localizada.

#### 4.8 Método fenotípico: Resistência a antimicrobianos

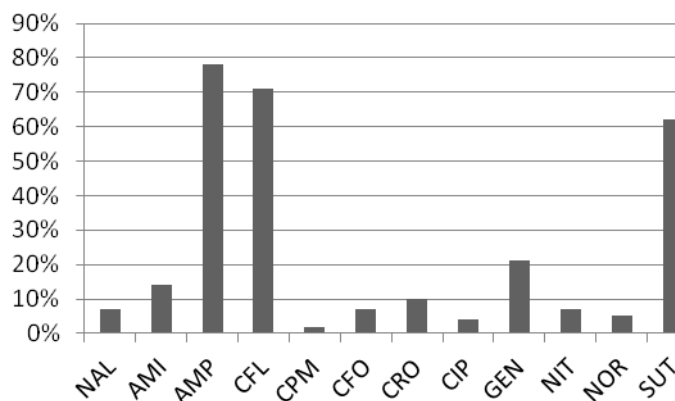
O teste de sensibilidade a antimicrobianos foi realizado para as 314 amostras de *E. coli* incluídas no estudo. Deste total, apenas 6 (2%) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, sendo estas isoladas de 4 crianças da aldeia Sapukai e 2 crianças da aldeia Paraty Mirim.

Os resultados revelaram que 276 (88%) amostras foram resistentes e definiram 72 perfis de resistência, exibindo 8 padrões isolados para AMI; AMP; CFL; CPM; GEN; NIT; NOR; SUT e 64 padrões de multirresistência para até 11 antimicrobianos (Tabela 12). O percentual de resistência para cada antimicrobiano foi de: 6% (19/314) NAL, 12% (39/314) AMI, 69% (216/314) AMP, 63% (197/314) CFL, 2% (5/314) CPM, 6% (20/314) CFO, 9% (28/314) CRO, 4% (11/314) CIP, 18% (58/314) GEN, 6% (19/314) NIT, 3% (14/314) NOR e 54% (171/314) SUT (Gráfico 1). Estes antimicrobianos estão divididos em diferentes classes e grupos (Tabela 13).

**Tabela 12.** Perfis de resistência a antimicrobianos encontrados nas amostras de *E. coli* incluídas no estudo.

PERFIL GERAL	ANTIMICROBIANOS	TOTAL DE AMOSTRAS	PERFIL GERAL	ANTIMICROBIANOS	TOTAL DE AMOSTRAS
I	AMI	3	XXXVII	AMP; CFL; CRO; SUT	6
II	AMP	19	XXXVIII	AMP; CFL; GEN; SUT	11
III	CFL	19	XXXIX	AMP; CFL; NIT; SUT	1
IV	COM	1	XL	AMP; CRO; GEN; SUT	1
V	GEN	4	XLI	AMP; CIP; GEN; SUT	1
VI	NIT	1	XLII	CRO; CIP; GEN; NIT	1
VII	NOR	2	XLIII	NAL; AMI; AMP; CFL; CFO	1
VIII	SUT	7	XLIV	NAL; AMI; CFL; CFO; GEN	1
IX	NAL; CFL	1	XLV	NAL; AMI; AMP; CFO; SUT	1
X	AMI; CFL	1	XLVI	AMI; AMP; CFL; GEN; NOR	1
XI	AMI; SUT	1	XLVII	AMI; AMP; CFL; GEN; SUT	3
XII	AMP; CFL	21	XLVIII	AMI; AMP; CFL; CFO; SUT	1
XIII	AMP; SUT	21	XLIX	AMI; AMP; CIP; GEN; SUT	1
XIV	CFL; CFO	2	L	NAL; AMP; CFL; GEN; SUT	1
XV	CFL; CRO	1	LI	AMI; AMP; CRO; GEN; SUT	1
XVI	CFL; GEN	1	LII	AMP; CFL; GEN; NIT; SUT	2
XVII	CFL; SUT	1	LIII	AMP; CFL; GEN; NOR; SUT	2
XVIII	NAL; AMI; CFL	1	LIV	CFL; CRO; CIP; GEN; NIT	2
XIX	NAL; AMP; NOR	1	LV	CRO; CIP; GEN; NIT; NOR	1
XX	AMI; AMP; CFL	3	LVI	NAL; AMI; AMP; CFL; CFO; GEN	1
XXI	AMI; AMP; GEN	2	LVII	NAL; AMI; AMP; CFL; CFO; NIT	1
XXII	AMI; CFL; CRO	1	LVIII	NAL; AMI; AMP; CFL; CFO; SUT	1
XXIII	AMP; CFL; CRO	1	LIX	NAL; AMI; AMP; CFL; CRO; GEN	2
XXIV	AMP; CFL; SUT	84	LX	NAL; AMI; CFL; CRO; GEN; NOR	1
XXV	AMP; CFO; SUT	1	LXI	AMI; AMP; CFL; CFO; CRO; SUT	1
XXVI	AMP; GEN; NIT	1	LXII	AMI; AMP; CFL; CFO; CIP; GEN	1
XXVII	AMP; GEN; SUT	4	LXIII	AMI; CFL; CRO; GEN; NIT; SUT	1
XXVIII	AMP; NIT; SUT	1	LXIV	AMP; CFL; CPM; CFO; NIT; SUT	1
XXIX	CFL; CRO; GEN	1	LXV	AMP; CRO; CIP; GEN; NIT; SUT NAL; AMI; AMP; CFL; CPM; CFO;	1
XXX	CFL; CRO; SUT	2	LXVI	SUT NAL; AMI; AMP; CFL; CFO; CRO;	1
XXXI	CRO; GEN; NOR	1	LXVII	GEN AMP; CFL; CRO; CIP; GEN; NOR;	1
XXXII	CIP; GEN; NIT	1	LXVIII	SUT AMP; CPM; CFO; GEN; NIT; NOR;	1
XXXIII	NAL; AMP; CFL; SUT	2	LXIX	SUT NAL; AMP; CFL; CIP; GEN; NIT;	1
XXXIV	AMI; AMP; CFL; SUT	2	LXX	NOR; SUT AMI; AMP; CFL; CPM; CFO; CIP;	1
XXXV	AMI; CFL; GEN; SUT	2	LXXI	GEN; NIT; NOR	1
XXXVI	AMP; CFL; CFO; SUT	2	LXXII	NAL; AMI; AMP; CFL; CPM; CFO; CRO; CIP; GEN; NIT; NOR	1
<b>TOTAL</b>					<b>276</b>

**Legenda:** NAL (ácido nalidíxico), AMI (amicacina), AMP (ampicilina), CFL (cefalotina), CPM (cefepima), CFO (cefoxitina), CRO (ceftriaxona), CIP (ciprofloxacina), GEN (gentamicina), NIT (nitrofurantoína), NOR (norfloxacina) e STU (sulfazotrim).



**Gráfico 1.** Representação gráfica geral da incidência de resistência a antimicrobianos. Legenda: NAL (ácido nalidíxico), AMI (amicacina), AMP (ampicilina), CFL (cefalotina), CPM (cefepima), CFO (cefoxitina), CRO (ceftriaxona), CIP (ciprofloxacina), GEN (gentamicina), NIT (nitrofurantoína), NOR (norfloxacina) e STU (sulfazotrim).

**Tabela 13.** Número de amostras de *E. coli* resistentes aos antimicrobianos separados por classe e grupo de antimicrobianos.

Classe	Grupo	Antimicrobiano	Nº de amostras
B-lactâmicos	Aminopenicilinas	Ampicilina	216
		Cefalotina (1ª geração)	197
	Cefalosporinas	Ceftriaxona (3ª geração)	28
		Cefepima (4ª geração)	5
Aminoglicosídeos	Cefamicinas	Cefoxitina	20
		Amicacina	39
		Gentamicina	58
Quinolonas	Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	11
		Norfloxacina	14
Inibidores da via de folato		Ácido Nalídixico	19
		Sulfazotrim	171
Nitrofuranos		Nitrofurantoína	19

#### **4.8.1 Padrão de resistência a antimicrobianos por aldeia indígena**

A resistência a antimicrobianos foi observada em todas as aldeias indígenas incluídas no estudo e os percentuais detectados foram: 91% (20/22) na aldeia Mamanguá, 88% (121/135) na aldeia Sapukai, 87% (116/133) na aldeia Paraty Mirim e 83% nas aldeias Rio Pequeno e Araponga (respectivamente, 15/18; 5/6).

Na aldeia Sapukai, foram detectados 54 perfis de resistência, sendo 6 perfis isolados (AMI, AMP, CFL, GEN, NOR e SUT) e 48 padrões de multirresistência para até 11 antimicrobianos (Tabela 14).

Na aldeia Paraty Mirim, foram detectados 27 perfis de resistência, sendo 4 perfis isolados (AMP, CFL, CPM e SUT) e 23 perfis de multirresistência para até 9 antimicrobianos (Tabela 15).

Na aldeia Araponga, foram detectados 5 perfis de resistência, sendo 1 perfil isolado (CFL) e 4 padrões de multirresistência para até 4 antimicrobianos (Tabela 16).

Na aldeia Mamanguá, foram detectados 6 perfis de resistência, sendo 2 perfis isolados (CFL e NIT) e 4 padrões de multirresistência para até 5 antimicrobianos (Tabela 17).

Na aldeia Rio Pequeno, foram detectados 8 perfis de resistência, sendo 1 perfil isolado (CFL) e 7 padrões de multirresistência para até 7 antimicrobianos (Tabela 18).

**Tabela 14.** Perfis de resistência a antimicrobianos encontrados nas amostras de *E. coli* isoladas da aldeia Sapukai.

PERFIS SAPUKAI	ANTIMICROBIANOS	TOTAL DE AMOSTRAS	PERFIS SAPUKAI	ANTIMICROBIANOS	TOTAL DE AMOSTRAS
I	AMI	3	XXXVII	AMP; CFL; CRO; SUT	3
II	AMP	11	XXXVIII	AMP; CFL; GEN; SUT	6
III	CFL	12	XL	AMP; CRO; GEN; SUT	1
V	GEN	4	XLI	AMP; CIP; GEN; SUT	1
VII	NOR	2	XLII	CRO; CIP; GEN; NIT	1
VIII	SUT	5	XLIII	NAL; AMI; AMP; CFL; CFO	1
X	AMI; CFL	1	XLIV	NAL; AMI; CFL; CFO; GEN	1
XI	AMI; SUT	1	XLV	NAL; AMI; AMP; CFO; SUT	1
XII	AMP; CFL	9	XLVI	AMI; AMP; CFL; GEN; NOR	1
XIII	AMP; SUT	6	XLVII	AMI; AMP; CFL; GEN; SUT	2
XIV	CFL; CFO	1	LI	AMI; AMP; CRO; GEN; SUT	1
XVIII	NAL; AMI; CFL	1	LII	AMP; CFL; GEN; NIT; SUT	1
XIX	NAL; AMP; NOR	1	LIII	AMP; CFL; GEN; NOR; SUT	1
XX	AMI; AMP; CFL	1	LIV	CFL; CRO; CIP; GEN; NIT	1
XXI	AMI; AMP; GEN	1	LV	CRO; CIP; GEN; NIT; NOR	1
XXII	AMI; CFL; CRO	1	LVI	NAL; AMI; AMP; CFL; CFO; GEN	1
XXIV	AMP; CFL; SUT	10	LVII	NAL; AMI; AMP; CFL; CFO; NIT	1
XXV	AMP; CFO; SUT	1	LVIII	NAL; AMI; AMP; CFL; CFO; SUT	1
XXVI	AMP; GEN; NIT	1	LIX	NAL; AMI; AMP; CFL; CRO; GEN	2
XXVII	AMP; GEN; SUT	3	LX	NAL; AMI; CFL; CRO; GEN; NOR	1
XXIX	CFL; CRO; GEN	1	LXI	AMI; AMP; CFL; CFO; CRO; SUT	1
XXX	CFL; CRO; SUT	1	LXII	AMI; AMP; CFL; CFO; CIP; GEN	1
XXXII	CIP; GEN; NIT	1	LXIII	AMI; CFL; CRO; GEN; NIT; SUT	1
XXXIII	NAL; AMP; CFL; SUT	1	LXV	AMP; CRO; CIP; GEN; NIT; SUT	1
XXXIV	AMI; AMP; CFL; SUT	2	LXVII	NAL; AMI; AMP; CFL; CFO; CRO; GEN	1
XXXV	AMI; CFL; GEN; SUT	1	LXX	NAL; AMP; CFL; CIP; GEN; NIT; NOR; SUT	1
XXXVI	AMP; CFL; CFO; SUT	1	LXXII	NAL; AMI; AMP; CFL; CPM; CFO; CRO; CIP; GEN; NIT; NOR	1
<b>TOTAL</b>					<b>120</b>

**Legenda:** NAL (ácido nalidíxico), AMI (amicacina), AMP (ampicilina), CFL (cefalotina), CPM (cefepima), CFO (cefoxitina), CRO (ceftriaxona), CIP (ciprofloxacina), GEN (gentamicina), NIT (nitrofurantoína), NOR (norfloxacina) e STU (sulfazotrim).

**Tabela 15.** Perfis de resistência a antimicrobianos encontrados nas amostras de *E. coli* isoladas da aldeia Paraty Mirim.

PERFIS PARATY MIRIM	ANTIMICROBIANOS	TOTAL DE AMOSTRAS
II	AMP	8
III	CFL	2
IV	COM	1
VIII	SUT	2
IX	NAL; CFL	1
XII	AMP; CFL	11
XIII	AMP; SUT	13
XIV	CFL; CFO	1
XVII	CFL; SUT	1
XX	AMI; AMP; CFL	1
XXI	AMI; AMP; GEN	1
XXIII	AMP; CFL; CRO	1
XXIV	AMP; CFL; SUT	55
XXVIII	AMP; NIT; SUT	1
XXXI	CRO; GEN; NOR	1
XXXIII	NAL; AMP; CFL; SUT	1
XXXV	AMI; CFL; GEN; SUT	1
XXXVI	AMP; CFL; CFO; SUT	1
XXXVII	AMP; CFL; CRO; SUT	3
XXXVIII	AMP; CFL; GEN; SUT	3
XXXIX	AMP; CFL; NIT; SUT	1
XLVIII	AMI; AMP; CFL; CFO; SUT	1
L	NAL; AMP; CFL; GEN; SUT	1
LIII	AMP; CFL; GEN; NOR; SUT	1
LXIV	AMP; CFL; CPM; CFO; NIT; SUT	1
LXIX	AMP; CPM; CFO; GEN; NIT; NOR; SUT	1
LXXI	AMI; AMP; CFL; CPM; CFO; CIP; GEN; NIT; NOR	1
<b>TOTAL</b>		<b>116</b>

**Legenda:** NAL (ácido nalidíxico), AMI (amicacina), AMP (ampicilina), CFL (cefalotina), CPM (cefepima), CFO (cefotaxima), CRO (ceftriaxona), CIP (ciprofloxacina), GEN (gentamicina), NIT (nitrofurantoína), NOR (norfloxacina) e STU (sulfazotrim).

**Tabela 16.** Perfis de resistência a antimicrobianos encontrados nas amostras *E. coli* isoladas da aldeia Araponga.

PERFIS ARAPONGA	ANTIMICROBIANOS	TOTAL DE AMOSTRAS
III	CFL	1
XV	CFL; CRO	1
XVI	CFL; GEN	1
XXX	CFL; CRO; SUT	1
LIV	CFL; CRO; CIP; GEN; NIT	1
<b>TOTAL</b>		<b>5</b>

**Legenda.** CFL (cefalotina), CRO (ceftriaxona), CIP (ciprofloxacina), GEN (gentamicina), NIT (nitrofurantoína) e STU (sulfazotrim).

**Tabela 17.** Perfis de resistência a antimicrobianos encontrados nas amostras *E. coli* isoladas da aldeia Mamangá.

PERFIS MAMANGUA	ANTIMICROBIANOS	TOTAL DE AMOSTRAS
III	CFL	3
VI	NIT	1
XII	AMP; CFL	1
XIII	AMP; SUT	2
XXIV	AMP; CFL; SUT	12
LII	AMP; CFL; GEN; NIT; SUT	1
<b>TOTAL</b>		<b>20</b>

**Legenda:** NAL (ácido nalidíxico), AMI (amicacina), AMP (ampicilina), CFL (cefalotina), CPM (cefepima), CFO (cefexítina), CRO (ceftriaxona), CIP (ciprofloxacina), GEN (gentamicina), NIT (nitrofurantoína), NOR (norfloxacina) e STU (sulfazotrim).

**Tabela 18.** Perfis de resistência a antimicrobianos encontrados nas amostras *E. coli* isoladas da aldeia Rio Pequeno.

PERFIS RIO PEQUENO	ANTIMICROBIANOS	TOTAL DE AMOSTRAS
III	CFL	1
XX	AMI; AMP; CFL	1
XXIV	AMP; CFL; SUT	7
XXVII	AMP; GEN; SUT	1
XXXVIII	AMP; CFL; GEN; SUT	2
XLIX	AMI; AMP; CIP; GEN; SUT	1
LXVI	NAL; AMI; AMP; CFL; CPM; CFO; SUT	1
LXVIII	AMP; CFL; CRO; CIP; GEN; NOR; SUT	1
<b>TOTAL</b>		<b>15</b>

**Legenda:** NAL (ácido nalidíxico), AMI (amicacina), AMP (ampicilina), CFL (cefalotina), CPM (cefepima), CFO (cefexítina), CRO (ceftriaxona), CIP (ciprofloxacina), GEN (gentamicina), NOR (norfloxacina) e STU (sulfazotrim).

#### **4.9 Método fenotípico: Resistência intermediária a antimicrobianos**

O fenótipo intermediário foi encontrado em 203 amostras (65%) e definiram 76 perfis de resistência intermediária, sendo 12 padrões isolados e 64 de multirresistência intermediária para até 6 antimicrobianos (Tabela 19). Os percentuais detectados foram: 100% (6/6) na aldeia Araponga; 72% (98/135) na aldeia Sapukai; 64% (14/22) na aldeia Mamanguá; 61% (11/18) na aldeia Rio Pequeno; e 56% (74/133) na aldeia Paraty Mirim.

Na aldeia Sapukai, foram detectados 53 perfis de resistência intermediária, sendo 11 perfis isolados (NAL, AMI, AMP, CFL, CFO, CRO, CIP, GEN, NIT, NOR e SUT) e 42 perfis de multirresistência para até 6 antimicrobianos (Tabela 20).

Na aldeia Mamanguá, foram detectados 9 perfis de resistência intermediária, sendo 2 perfis isolados (AMI e CFL) e 7 perfis de multirresistência para até 3 antimicrobianos (Tabela 21).

Na aldeia Rio Pequeno, foram detectados 7 perfis de resistência intermediária, sendo 5 perfis isolados (AMI, CFL, CPM, CRO e NOR) e 2 perfis de multirresistência para até 3 antimicrobianos (Tabela 22).

Na aldeia Araponga, foram detectados 6 perfis de resistência intermediária, sendo 3 perfis isolados (AMI, CFL e NIT) e 3 padrões de multirresistência para até 3 antimicrobianos (Tabela 23).

Na aldeia Paraty Mirim, foram detectados 29 perfis de resistência intermediária, sendo 8 perfis isolados (NAL, AMI, CFL, CPM, CFO, CRO, NIT e NOR) e 21 perfis de multirresistência para até 5 antimicrobianos (Tabela 24).



**Tabela 19.** Perfis de resistência intermediária a antimicrobianos encontrados nas amostras *E. coli* incluídas no estudo.

PERFIL GERAL	ANTIMICROBIANOS	TOTAL DE AMOSTRAS	PERFIL GERAL	ANTIMICROBIANOS	TOTAL DE AMOSTRAS
I	NAL	2	XXXIX	NAL; AMI; GEN	1
II	AMI	24	XL	NAL; AMP; CFO	1
III	AMP	2	XLI	NAL; AMP; CIP	1
IV	CFL	49	XLII	NAL; AMP; NIT	1
V	COM	3	XLIII	NAL; CFL; CIP	1
VI	CFO	5	XLIV	AMI; CFL; CRO	1
VII	CRO	6	XLV	AMI; CFL; GEN	1
VIII	CIP	1	XLVI	AMI; CFL; NIT	1
IX	GEN	2	XLVII	AMI; CPM; CFO	1
X	NIT	6	XLVIII	AMI; CPM; CRO	1
XI	NOR	5	XLIX	AMI; CFO; CRO	1
XII	SUT	2	L	AMI; CRO; CIP	2
XIII	NAL; AMI	3	LI	AMI; GEN; NIT	2
XIV	NAL; CFL	1	LII	AMI; GEN; NOR	1
XV	NAL; COM	1	LIII	AMI; CIP; NOR	1
XVI	NAL. CIP	1	LIV	AMI; NIT; NOR	3
XVII	AMI; AMP	1	LV	CFL; CPM; CRO	1
XVIII	AMI; CFL	13	LVI	CFL; CRO; GEN	1
XIX	AMI; CFO	2	LVII	CFL; CRO; NIT	1
XX	AMI; CRO	2	LVIII	CPM; CFO; CIP	1
XXI	AMI; GEN	1	LIX	CPM; CRO; NIT	1
XXII	AMI; NIT	1	LX	CFO; CRO; NIT	1
XXIII	AMI; NOR	1	LXI	CRO; CIP; NIT	1
XXIV	AMI; SUF	1	LXII	CRO; NOR; SUF	1
XXV	AMP; CFL	4	LXIII	CIP; NIT; NOR	1
XXVI	AMP; CP M	1	LXIV	NAL; AMP; CFO; CIP	1
XXVII	AMP; NIT	1	LXV	NAL; CFL; CIP; NOR	1
XXVIII	CFL; CRO	3	LXVI	AMI; CFL; CRO; NOR	1
XXIX	CFL; CIP	1	LXVII	AMI; CFL; CPM; CRO	1
XXX	CFL; GEN	3	LXVIII	AMI; CPM; CFO; CRO	1
XXXI	CFL; NIT	3	LXIX	AMI; CPM; CRO; NIT	1
XXXII	CFL; NOR	1	LXX	NAL; AMP; CFL; CFO; CRO	1
XXXIII	CPM; CRO	3	LXXI	NAL; CFL; CRO; CIP; NOR	1
XXXIV	CPM; NOR	1	LXXII	NAL; CPM; CRO; CIP; NIT	1
XXXV	CRO; NIT	2	LXXIII	AMI; AMP; CFL; CIP; NIT	1
XXXVI	CIP; NIT	1	LXXIV	AMI; CFO; CRO; CIP; NIT	1
XXXVII	CIP; NOR	1	LXXV	AMP; CP M; CIP; GEN; NIT AMI; CFL; CRO; GEN; NIT;	1
XXXVIII	NOR; SUF	1	LXXVI	SUF	1
<b>TOTAL</b>					<b>203</b>

**Legenda:** NAL (ácido nalidíxico), AMI (amicacina), AMP (ampicilina), CFL (cefalotina), CPM (cefepima), CFO (cefotina), CRO (ceftriaxona), CIP (ciprofloxacina), GEN (gentamicina), NIT (nitrofurantoína), NOR (norfloxacina) e STU (sulfazotrim).

**Tabela 20.** Perfis de resistência intermediária a antimicrobianos encontrados nas amostras de *E. coli* isoladas da aldeia Sapukai.

PERFIS SAPUKAI	ANTIMICROBIANOS	TOTAL DE AMOSTRAS	PERFIS SAPUKAI	ANTIMICROBIANOS	TOTAL DE AMOSTRAS
I	NAL	1	XXXIX	NAL; AMI; GEN	1
II	AMI	9	XL	NAL; AMP; CFO	1
III	AMP	2	XLI	NAL; AMP; CIP	1
IV	CFL	21	XLII	NAL; AMP; NIT	1
VI	CFO	4	XLIV	AMI; CFL; CRO	1
VII	CRO	1	XLV	AMI; CFL; GEN	1
VIII	CIP	1	XLVI	AMI; CFL; NIT	1
IX	GEN	2	XLVII	AMI; CPM; CFO	1
X	NIT	1	L	AMI; CRO; CIP	2
XI	NOR	1	LI	AMI; GEN; NIT	1
XII	SUT	2	LIV	AMI; NIT; NOR	1
XIII	NAL; AMI	2	LV	CFL; CPM; CRO	1
XIV	NAL; CFL	1	LVI	CFL; CRO; GEN	1
XVI	NAL; CIP	1	LVIII	CPM; CFO; CIP	1
XVIII	AMI; CFL	4	LIX	CPM; CRO; NIT	1
XXII	AMI; NIT	1	LX	CFO; CRO; NIT	1
XXV	AMP; CFL	2	LXII	CRO; NOR; SUF	1
XXVI	AMP; CP M	1	LXIV	NAL; AMP; CFO; CIP	1
XXVIII	CFL; CRO	2	LXV	NAL; CFL; CIP; NOR	1
XXIX	CFL; CIP	1	LXVI	AMI; CFL; CRO; NOR	1
XXX	CFL; GEN	3	LXVII	AMI; CFL; CPM; CRO	1
XXXII	CFL; NOR	1	LXVIII	AMI; CPM; CFO; CRO	1
XXXIII	CPM; CRO	3	LXX	NAL; AMP; CFL; CFO; CRO	1
XXXIV	CPM; NOR	1	LXXII	NAL; CPM; CRO; CIP; NIT	1
XXXVI	CIP; NIT	1	LXXV	AMP; CP M; CIP; GEN; NIT	1
XXXVII	CIP; NOR	1		AMI; CFL; CRO; GEN; NIT;	
XXXVIII	NOR; SUF	1	LXXVI	SUF	1
<b>TOTAL</b>					<b>98</b>

**Legenda:** NAL (ácido nalidíxico), AMI (amicacina), AMP (ampicilina), CFL (cefalotina), CPM (cefepima), CFO (cefotaxima), CRO (ceftriaxona), CIP (ciprofloxacina), GEN (gentamicina), NIT (nitrofurantoína), NOR (norfloxacina) e STU (sulfazotrim).

**Tabela 21.** Perfis de resistência intermediária a antimicrobianos encontrados nas amostras *E. coli* pertencentes a aldeia Mamanguá.

PERFIS MAMANGUA	ANTIMICROBIANOS	TOTAL DAS AMOSTRAS
II	AMI	4
IV	CFL	2
XVII	AMI; AMP	1
XVIII	AMI; CFL	2
XX	AMI; CRO	1
XXIII	AMI; NOR	1
XXXI	CFL; NIT	1
LII	AMI; GEN; NOR	1
LIII	AMI; CIP; NOR	1
<b>TOTAL</b>		<b>14</b>

**Legenda:** AMI (amicacina), AMP (ampicilina), CFL (cefalotina), CRO (ceftriaxona), CIP (ciprofloxacina), GEN (gentamicina), NIT (nitrofurantoína), NOR (norfloxacina).

**Tabela 22.** Perfis de resistência intermediária a antimicrobianos encontrados nas amostras *E. coli* pertencentes isoladas da aldeia Rio Pequeno.

PERFIS RIO PEQUENO	ANTIMICROBIANOS	TOTAL
II	AMI	3
IV	CFL	2
V	COM	1
VII	CRO	2
XI	NOR	1
XIX	AMI; CFO	1
LXIII	CIP; NIT; NOR	1
<b>TOTAL</b>		<b>11</b>

**Legenda:** AMI (amicacina), AMP (ampicilina), CFL (cefalotina), CPM (cefepima), CFO (cefexitina), CRO (ceftriaxona), NIT (nitrofurantoína), NOR (norfloxacina).

**Tabela 23.** Perfis de resistência intermediária a antimicrobianos encontrados nas amostras *E. coli* isoladas da aldeia Araçá.

PERFIS ARAPONGA	ANTIMICROBIANOS	TOTAL DE AMOSTRAS
II	AMI	1
IV	CFL	1
X	NIT	1
XXIV	AMI; SUT	1
XLVIII	AMI; CPM; CRO	1
LIV	AMI; NIT; NOR	1
<b>TOTAL</b>		<b>6</b>

**Legenda:** AMI (amicacina), AMP (ampicilina), CFL (cefalotina), CPM (cefepima), CRO (ceftriaxona), NIT (nitrofurantoína), NOR (norfloxacina) e SUT (sulfazotrim).

**Tabela 24.** Perfis de resistência intermediária a antimicrobianos encontrados nas amostras *E. coli* isoladas da aldeia Paraty Mirim.

PERFIS PARATY MIRIM	ANTIMICROBIANOS	TOTAL DE AMOSTRAS
I	NAL	1
II	AMI	7
IV	CFL	23
V	COM	2
VI	CFO	1
VII	CRO	3
X	NIT	4
XI	NOR	3
XIII	NAL; AMI	1
XV	NAL; COM	1
XVIII	AMI; CFL	7
XIX	AMI; CFO	1
XX	AMI; CRO	1
XXI	AMI; GEN	1
XXV	AMP; CFL	2
XXVII	AMP; NIT	1
XXVIII	CFL; CRO	1
XXXI	CFL; NIT	2
XXXV	CRO; NIT	2
XLIII	NAL; CFL; CIP	1
XLIX	AMI; CFO; CRO	1
LI	AMI; GEN; NIT	1
LIV	AMI; NIT; NOR	1
LVII	CFL; CRO; NIT	1
LXI	CRO; CIP; NIT	1
LXIX	AMI; CPM; CRO; NIT	1
LXXI	NAL; CFL; CRO; CIP; NOR	1
LXXIII	AMI; AMP; CFL; CIP; NIT	1
LXXIV	AMI; CFO; CRO; CIP; NIT	1
<b>TOTAL</b>		<b>74</b>

**Legenda:** NAL (ácido nalidíxico), AMI (amicacina), AMP (ampicilina), CFL (cefalotina), CPM (cefepima), CFO (cefexitina), CRO (ceftriaxona), CIP (ciprofloxacina), GEN (gentamicina), NIT (nitrofurantoína), NOR (norfloxacina) e SUT (sulfazotrim).

#### 4.10 Padrão de multirresistência a antimicrobianos e suas classificações

Nas 314 amostras incluídas no estudo, foram detectados 116 amostras com o padrão de multirresistência seguindo o método de Magiorakos e colaboradores (2012). Segundo a metodologia específica utilizada para a categorização do fenótipo MDR, foi classificada uma amostra como multirresistência quando a mesma apresentou resistência ou resistência intermediária para pelo menos 3 antimicrobianos testados. Não foi possível definir as amostras como XDR (amostra resistente a quase todas as classes de antimicrobianos) ou PDR (amostra resistente a todas as classes de antimicrobianos). Esta subdivisão encontrada na referência não cabe no presente estudo, pois não foi feito o ensaio para todas as classes de antimicrobianos, entretanto, foi possível categorizar as amostras como MDR (80/314, 25%) e possíveis-XDR/PDR (36/314, 11%) (Tabela 25).

Nas 48 amostras com potencial de enterovirulência, 20 (18/48, 38%) são não-MDR, 23 (22/48, 48%) são MDR e 7 (7/48, 14%) são possíveis-XDR/PDR. Totalizando 28 (30/48, 62%) com o padrão de multirresistência seguindo a literatura atual (Tabela 26).

**Tabela. 25** Classificação de todas as amostras incluídas no estudo quanto ao fenótipo de resistência segundo literatura atual.

Resistentes (não-MDR)	Multirresistência		TOTAL
	MDR	Possíveis-XDR/PDR	
198	80	36	314

**Legenda:** não-MDR (amostras bacterianas resistentes a menos de três classes antimicrobianas); MDR (amostras bacterianas resistentes a três classes antimicrobianas); possíveis XDR/PDR (amostras bacterianas resistentes a mais de três classes antimicrobianas).

**Tabela 26.** Classificação das amostras bacterianas potencialmente enterovirulentas quanto ao fenótipo de multirresistência segundo literatura atual.

AMOSTRA	PATOTIPO	PERFIL DE RESISTÊNCIA	CLASSES ANTIMICROBIANAS	CLASSIFICAÇÃO DE MULTIRRESISTÊNCIA		
				MDR	POSSÍVEIS XDR/PDR	
8IV	ETEC	AMI(I); CFL(R); CFO(R); GEN (R)	Aminoglicosídeos; B-lactâmicos	-	-	
24III		AMI(I); AMP(R); CFL(R); SUF(R)	Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos	+	-	
24IV		AMI(I); AMP(R); CFL(I); SUF(R)	Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos	+	-	
24V		AMP(R); CFL(R); SUF(R)	B-lactâmicos; Nitrofuranos	-	-	
18VII	EAEC	AMI(R); AMP(R); CFL(R); GEN(R); SUF(R)	Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos	+	-	
18VIII		AMP(R); CFL(R); GEN(R); SUF(R)	Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos	+	-	
30I		NAL(I); CFL(R); CPM(I);	B-lactâmicos; Nitrofuranos	-	-	
30II		AMI(R); AMP(R); CFL(R); SUF(R)	Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos	+	-	
30III		AMP(R); CFL(R)	B-lactâmicos	-	-	
30IV		CFL(R)	B-lactâmicos	-	-	
30V		AMI(R); AMP(R); CFL(R); CPM(R); CFO(I); CIP(R); GEN(R); NIT(R); NOR(R)	Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos; Quinolonas	-	+	
32VI		AMP(R); CFL(R); CFO(R); CIP(R); GEN(R); NOR(R); SUF(R)	Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos; Quinolonas	-	+	
32VII		AMI(I); AMP(R); CFL(R); GEN(R); SUF(R)	Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos	+	-	
33VI		AMI(R); AMP(R); CFL(R); CPM(I); GEN(R); SUF(R)	Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos	+	-	
33VII		AMP(R); CIP(I); GEN(R); NIT(I); NOR(I); SUF(R)	Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos; Quinolonas	-	+	
37I		AMI(I); AMP(R); CFL(R); SUF(R)	Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos	+	-	
46II		AMP(R); CFL(R); GEN(R); SUF(R)	Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos	+	-	
46III		AMP(R); CFL(R); GEN(R); SUF(R)	Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos	+	-	
46V		AMP(R); CFL(R); GEN(R); SUF(R)	Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos	+	-	
46VI		AMP(R); CFL(R); GEN(R); SUF(R)	Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos	+	-	
54IV		AMP(R); CFL(R); CFO(R); SUF(R)	Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos	+	-	
2VI		aEPEC	CFL(I); GEN(I)	Aminoglicosídeos; B-lactâmicos	-	-
4I			AMP(R); CFL(R); GEN(R); SUF(R)	Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos	+	-
4III			NAL(R); AMP(R); CFL(R); CPM(I); CRO(I); CIP(R); GEN(R); NIT(R); NOR(R); SUF(R)	Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos; Quinolonas	-	+
4IV	NAL(R); AMI(R); AMP(R); CFL(R); CFO(I); CRO(R); GEN(R);		Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos	+	-	
4V	AMI(I); AMP(R); CFL(R); CPM(I); CFO(I); CRO(I); GEN(R); NOR(R); SUF(R)		Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos; Quinolonas	-	+	
4VI	AMI(I); AMP(R); CFL(R); CPM(I); CFO(I); GEN(R); SUF(R)		Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos	+	-	
7I	CFL(I); CRO(I);		B-lactâmicos	-	-	
7II	CRO(R); CIP(R); GEN(R); NIT(R); NOR(I)		B-lactâmicos; Aminoglicosídeos; Quinolonas	+	-	
7III	AMI(I); CFL(I)		Aminoglicosídeos; B-lactâmicos	-	-	
7V	NAL(I); CFL(I); CRO(R); CIP(R); GEN(R); NIT(R); NOR(R)		Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos; Quinolonas	-	+	
12V	AMI(I); AMP(R); CFL(R)		Aminoglicosídeos; B-lactâmicos	-	-	
12VII	NAL(R); AMI(R); AMP(R); CFL(I); CPM(I); CFO(I); SUF(R)		B-lactâmicos; Aminoglicosídeos; Quinolonas	+	-	
13II	NAL(R); AMP(R); CFL(R); SUF(R)		B-lactâmicos; Nitrofuranos	-	-	
20II	AMP(R); CFL(I); CRO(I); GEN(R); SUF(R)		Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos	+	-	
20III	AMP(R); CFL(I); GEN(R); SUF(R)		Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos	+	-	
20V	AMP(R); CFL(R); GEN(R); SUF(R)		Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos	+	-	
20VII	AMP(R); CFL(R)		B-lactâmicos	-	-	
26II	AMI(I); CFL(R)		Aminoglicosídeos; B-lactâmicos	-	-	
26III	AMP(R); CFL(R); SUF(R)		B-lactâmicos; Nitrofuranos	-	-	
26V	AMP(R); CFL(R); SUF(R)		B-lactâmicos; Nitrofuranos	-	-	
34I	AMI(I); CFL(R); CPM(I); CRO(I); GEN(R)		Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos	+	-	
34II	CFL(R); CRO(R); NIT(I)		B-lactâmicos; Nitrofuranos	-	-	
34III	AMI(I); CFL(R); CRO(R); GEN(R); NIT(I); NOR(I); SUF(R)		Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos	+	-	
34IV	AMI(I); CFL(R)		Aminoglicosídeos; B-lactâmicos	-	-	
34VI	AMI(I); CFL(R); CRO(R); CIP(R); GEN(R); NIT(R); SUF(I)		Aminoglicosídeos; B-lactâmicos; Nitrofuranos; Quinolonas	-	+	
42II	CFL(I)		B-lactâmicos	-	-	
55VI	CFL(I)		B-lactâmicos	-	-	

**Legenda:** ETEC (Escherichia coli enterotoxigênica); EAEC (Escherichia coli enteroagregativa); aEPEC (Escherichia coli enteropatogênica atípica); MDR (amostras bacterianas resistentes a três classes antimicrobianas); possíveis XDR/PDR (amostras bacterianas resistentes a mais de três classes antimicrobianas); NAL (ácido nalidíxico); AMI (amicacina); AMP (ampicilina); CFL (cefalotina); CPM (cefepima); CFO (cefotaxima); CRO (ceftriaxona); CIP (ciprofloxacina); GEN (gentamicina); NIT (nitrofurantoína); NOR (norfloxacina); STU (sulfazotrim).

#### 4.11 Padrão de resistência a antimicrobianos nas amostras potencialmente enterovirulentas por aldeia indígena.

Nas 48 amostras definidas como patotipos específicos, foram detectados 24 perfis, sendo um compartilhado por todos os três patotipos (XXIV) e três compartilhados pelos patotipos EAEC e aEPEC (III, XII e XXXVIII). Para as amostras categorizadas como ETEC foram detectados 3 perfis de resistência, sendo 1 perfil isolado (SUT) e dois perfis de multirresistência para até 5 antimicrobianos. Para as amostras de EAEC, foram detectados 11 perfis, sendo 1 perfil isolado (CFL) e 10 perfis de multirresistência para até 9 antimicrobianos. Para as amostras definidas como aEPEC, foram detectados 15 perfis de resistência, sendo 1 perfil isolado (SUT) e 14 perfis de multirresistência para até 6 antimicrobianos (Tabela 27).

**Tabela 27.** Distribuição por aldeia indígena dos perfis de resistência a antimicrobianos entre as amostras potencialmente enterovirulentas

PATOTIPOS	PERFIS	SAPUKAI	PARATY MIRIM	ARAPONGA	RIO PEQUENO	MAMANGUÁ
ETEC	XIII; XXIV; LI	LI	XIII; XXIV	--	--	--
EAEC	III; XII; XXIV; XXVII; XXXIV; XXXVIII; XXXVIII; XLVII; XLVII; LXVIII; LXXI	XXXVII; XXXVIII	III; XII; XXIV; XXXIV; XXXVIII; LXXI	--	XXVII; XXXVIII; XLVII; LVXIII	--
aEPEC	III; XII; XV; XVI; XXIV; XXVII; XXX; XXXIII; XXXVII; XXXVIII; XLII; LIII; LIV; LV; LIX	XII; XXVII; XXXIII; XXXVII; XXXVIII; XLII; LIII; LV; LIX; LXX	XXIV	III; XV; XVI; XXX; LIV	--	III; XXIV

#### 4.12 Amplificação randômica do DNA polimórfico (RAPD-PCR)

A diversidade das amostras diarreio gênicas de *E. coli* (n=48) foi investigada pelo RAPD-PCR. Os perfis eletroforéticos foram obtidos empregando os iniciadores 1254, A04 e M13 (tabela 28, figura 26). As reações de amplificação geraram perfis polimórficos estáveis e reprodutíveis, compostos por 2 a 6 bandas (iniciador 1254), 2 a 8 bandas (iniciador A04) e 5 a 10 bandas (iniciador M13) variando entre 500 – 2000pb, 500-3000pb, 500-2000pb, respectivamente. Na população bacteriana potencialmente enteropatogênica, o iniciador A04 apresentou maior poder discriminatório detectando 25 perfis eletroforéticos, seguindo o 1254 com 23 perfis e o M13 com 19 perfis (Quadro 4). No patotipo aEPEC (n=27) foram detectados 15 perfis com o iniciador 1254, 12 perfis com o iniciador A04 e 11 perfis com o iniciador M13. No patotipo EAEC (n=17) foram detectados 6 perfis com o 1254, 11 com o A04 e 6 com o M13. No patotipo ETEC (n=4) foram detectados 2 perfis com todos os iniciadores.





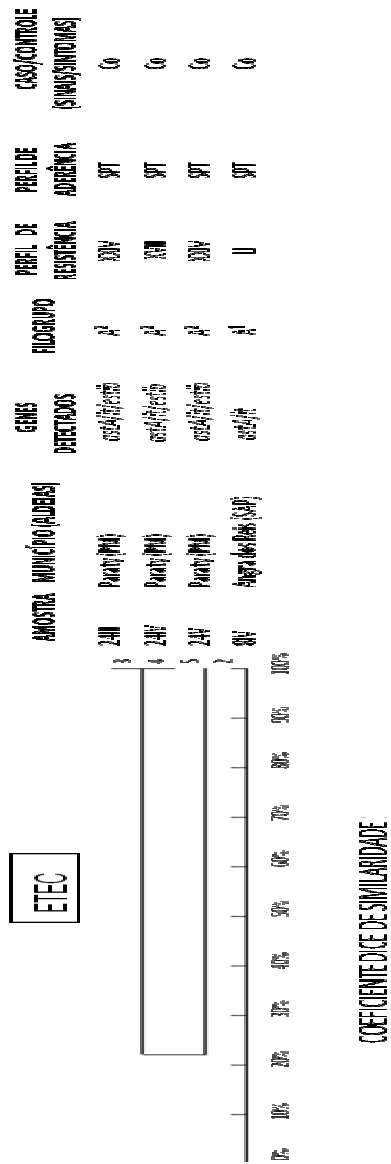
**Tabela 28.** Representação numérica dos perfis de RAPD-PCR das amostras potencialmente enterovirulentas de *E. coli* a partir dos iniciadores utilizados.

PATOTIPOS	AMOSTRA	PRIMERS			PATOTIPOS	AMOSTRA	PRIMERS		
		1254	A04	M13			1254	A04	M13
ETEC	8IV	1	1	1	EPEC	4IV	10	15	11
	24III	2	2	2		4V	10	15	11
	24IV	2	2	2		4VI	10	15	11
	24V	2	2	2		7I	11	16	12
	18VII	3	3	3		7II	12	16	12
	18VIII	4	4	3		7III	12	16	12
	30I	4	5	4		7V	12	16	12
	30II	4	6	4		12V	13	17	13
	30III	4	7	4		12VII	14	18	14
	30IV	5	6	4		13II	15	19	12
	30V	3	8	5		20II	10	20	13
EAEC	32VI	5	6	4	20III	16	20	14	
	32VII	6	8	5	20V	17	20	13	
	33VI	6	9	5	20VII	18	20	13	
	33VII	6	9	5	26II	19	21	15	
	37I	7	10	6	26III	19	21	15	
	46II	6	11	7	26V	19	22	16	
	46III	6	12	7	34I	20	23	16	
	46V	6	12	7	34II	20	23	16	
	46VI	6	11	7	34III	20	23	16	
	54IV	8	13	8	34IV	20	23	16	
	2VI	9	14	9	34VI	21	23	17	
EPEC	4I	10	15	10	42II	22	24	18	
	4III	10	15	11	55V	23	25	19	
<b>TOTAL</b>						23	25	19	

#### 4.12.1 Análise da relação de identidade genética

A análise da relação de identidade genética revelou uma população diversa com amostras dispostas isoladamente e organizadas em grupos clonais, apresentando índices de similaridade variando 10-52% (iniciador 1254), 2-80% (iniciador A04) e 5-58% (iniciador M13) (Figura 28, 29 e 30). A relação de identidade genética e o agrupamento obtido a partir dos diferentes iniciadores utilizados foi concordante para as amostras de cada patotipo incluídas nesta análise.

De um modo geral, amostras que apresentaram perfis eletroforéticos iguais entre si compartilharam também as demais características no estudo.



**Figura 28.** Dendrograma gerado a partir da técnica de RAPD-PCR utilizando o iniciador M13 para as amostras definidas como ETEC.

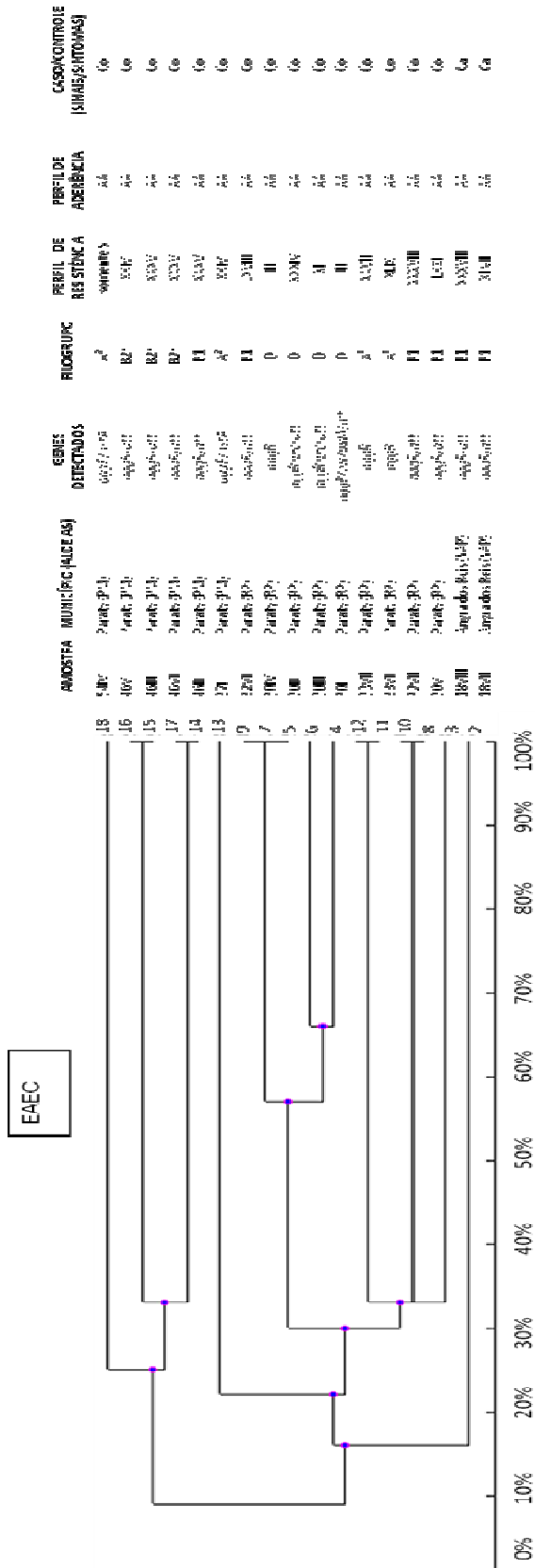


Figura 29. Dendrograma gerado a partir da técnica de RAPD-PCR utilizando o iniciador M13 para as amostras definidas como EAEC.

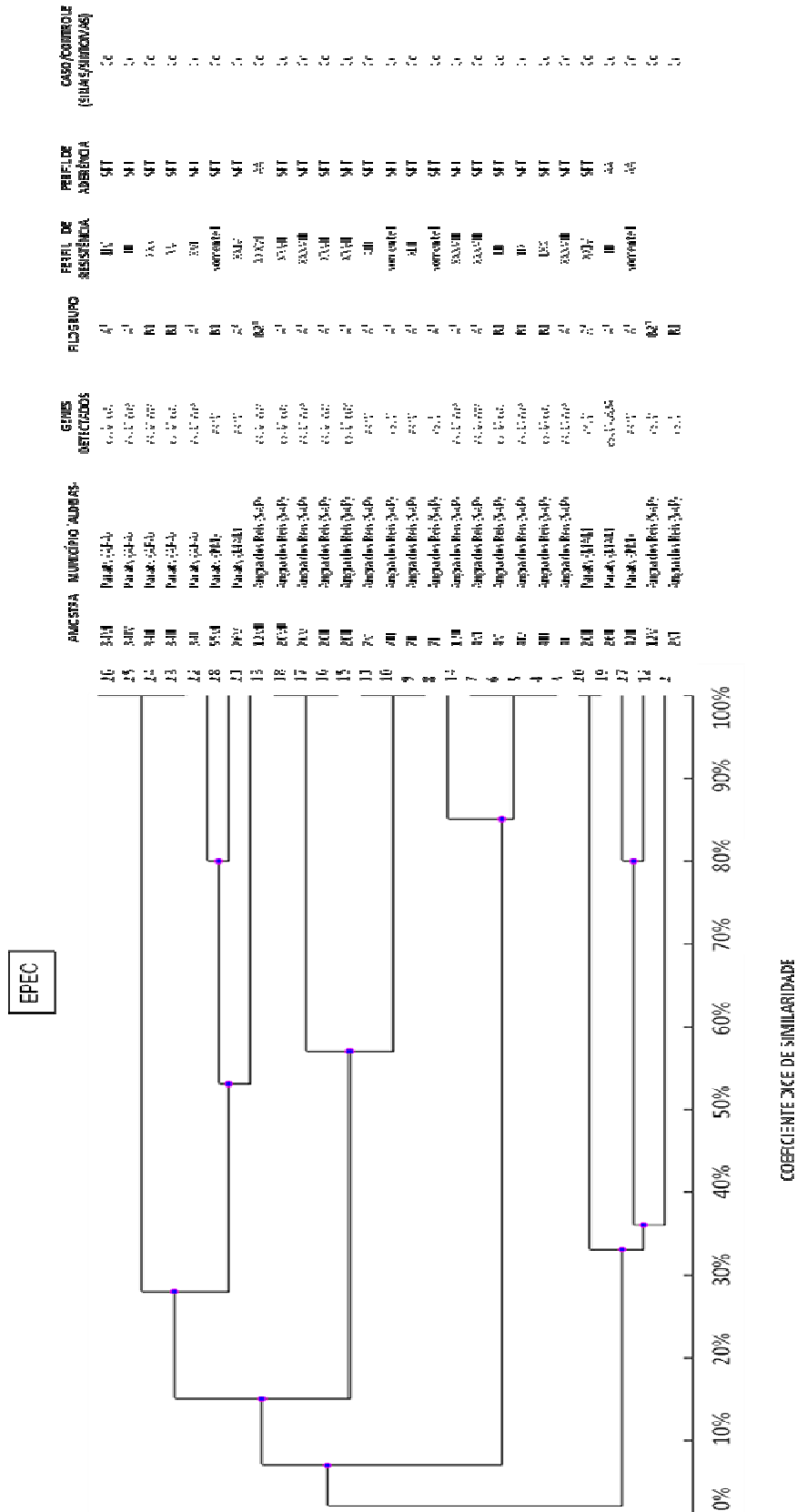


Figura 30. Dendrograma gerado a partir da técnica de RAPD-PCR utilizando o iniciador M13 para as amostras definidas como aEPEC.

**Quadro 6.** Características genotípicas e fenotípicas investigadas nas amostras de *E. coli* potencialmente enterovirulentas.

ALDEIA	PATOTIPO	AMOSTRA	Características genotípicas						Características fenotípicas			
			MPCR	Hibridização	RAPD-PCR			Grupo filogenético	Aderência em células epiteliais	Teste de sensibilidade antimicrobianos		
					1254	A04	M13			Resistência	Resistência intermediária	
SAPUKAI	ETEC	8IV	<i>astA</i>	<i>lt</i>	1	1	1	A <sup>1</sup>	SPT	LI	LXV	
	EAEC	18VII	<i>aggR</i>	<i>att</i>	3	3	3	B1	AA	XLVII	SOMENTE R	
		18VIII	<i>aggR</i>	<i>att</i>	4	4	3	B1	AA	XXXVIII	SOMENTE R	
	aEPEC	2VI	<i>escV</i>	-	9	14	9	B1	SPT	SOMENTE I	XXX	
		4I	<i>escV</i>	<i>eae</i>	10	15	10	A <sup>1</sup>	SPT	XXXVIII	SOMENTE R	
		4III	<i>escV</i>	<i>eae</i>	10	15	11	B1	SPT	LXX	XXXIII	
		4IV	<i>escV</i>	<i>eae</i>	10	15	11	B1	SPT	LIX	VI	
		4V	<i>escV</i>	<i>eae</i>	10	15	11	B1	SPT	LIII	LXVIII	
		4VI	<i>escV</i>	<i>eae</i>	10	15	11	A <sup>1</sup>	SPT	XXXVIII	XLVII	
		7I	<i>escV</i>	-	11	16	12	A <sup>1</sup>	SPT	SOMENTE I	XXVIII	
		7II	<i>escV</i>	-	12	16	12	A <sup>1</sup>	SPT	XLII	XI	
		7III	<i>escV</i>	-	12	16	12	A <sup>1</sup>	SPT	SOMENTE I	XVIII	
		7V	<i>escV</i>	-	12	16	12	A <sup>1</sup>	SPT	SOMENTE I	XIV	
		12V	<i>escV/uidA</i>	-	13	17	13	A <sup>2</sup>	SPT	XII	II	
		12VII	-	<i>eae</i>	14	18	14	B2 <sup>1</sup>	AA	XXXVII	II	
		13II	-	<i>eae</i>	15	19	12	A <sup>1</sup>	SPT	XXXVIII	SOMENTE R	
		20II	<i>escV</i>	<i>eae</i>	10	20	13	A <sup>1</sup>	SPT	XXVII	XXVIII	
		20III	<i>escV/uidA</i>	<i>eae</i>	16	20	14	A <sup>1</sup>	SPT	XXVII	IV	
		20V	-	<i>eae</i>	17	20	13	A <sup>1</sup>	SPT	XXXVIII	SOMENTE R	
	20VII	<i>escV/uidA</i>	<i>eae</i>	18	20	13	A <sup>1</sup>	SPT	XXVII	SOMENTE R		
PARATY MIRIM	ETEC	24III	<i>lt/estIb/astA</i>	-	2	2	2	A <sup>2</sup>	SPT	XXIV	II	
		24IV	<i>lt/estIb/astA</i>	-	2	2	2	A <sup>2</sup>	SPT	XVII	XVIII	
		24V	<i>lt/estIb/astA</i>	-	2	2	2	A <sup>2</sup>	SPT	XXIV	SOMENTE R	
	EAEC	30I	<i>aggR/pic/uidA</i>	<i>att</i>	4	5	4	D	AA	III	XV	
		30II	<i>aggR/pic</i>	<i>att</i>	4	6	4	D	AA	XXXIV	SOMENTE R	
		30III	<i>aggR/pic</i>	<i>att</i>	4	7	4	D	AA	XII	SOMENTE R	
		30IV	<i>aggR</i>	-	5	6	4	D	AA	III	SOMENTE R	
		30V	<i>aggR</i>	-	3	8	5	B1	AA	LXXI	VII	
		37I	<i>aggR/astA</i>	-	7	10	6	A <sup>2</sup>	AA	XXIV	II	
		46II	<i>aggR</i>	<i>att</i>	6	11	7	B1	AA	XXXV	SOMENTE R	
		46III	<i>aggR</i>	<i>att</i>	6	12	7	B2 <sup>2</sup>	AA	XXXV	SOMENTE R	
		46V	<i>aggR</i>	<i>att</i>	6	12	7	B2 <sup>2</sup>	AA	XXIV	SOMENTE R	
		46VI	<i>aggR</i>	<i>att</i>	6	11	7	B2 <sup>2</sup>	AA	XXXV	SOMENTE R	
	54IV	<i>aggR/astA</i>	-	6	13	8	A <sup>2</sup>	AA	SOMENTE S	SOMENTE S		
	aEPEC	42II	<i>escV</i>	-	22	24	18	A <sup>1</sup>	AA	SOMENTE I	IV	
		55VI	<i>escV</i>	-	23	25	25	B1	SPT	SOMENTE I	IV	
RIO PEQUENO	EAEC	32VI	<i>aggR</i>	<i>att</i>	5	6	4	B1	AA	LXVIII	SOMENTE R	
		32VII	<i>aggR</i>	<i>att</i>	6	8	5	B1	AA	XXXVIII	II	
		33VI	<i>aggR</i>	-	6	9	5	A <sup>1</sup>	AA	XLIX	V	
		33VII	<i>aggR</i>	-	6	9	5	A <sup>1</sup>	AA	XXVII	LXIII	
MAMANGUÁ	aEPEC	26II	<i>escV</i>	-	19	21	15	A <sup>1</sup>	AA	III	II	
		26III	<i>escV/uidA</i>	-	19	21	15	A <sup>2</sup>	SPT	XXIV	SOMENTE R	
		26V	<i>escV</i>	-	19	22	16	A <sup>2</sup>	SPT	XXIV	SOMENTE R	
ARAPONGA	aEPEC	34I	<i>escV</i>	<i>eae</i>	20	23	16	A <sup>1</sup>	SPT	XVI	XLVIII	
		34II	<i>escV</i>	<i>eae</i>	20	23	16	B1	SPT	XV	X	
		34III	<i>escV</i>	<i>eae</i>	20	23	16	B1	SPT	XXX	LIV	
		34IV	<i>escV</i>	<i>eae</i>	20	23	16	A <sup>1</sup>	SPT	III	II	
		34VI	<i>escV</i>	<i>eae</i>	21	23	17	A <sup>1</sup>	SPT	LIV	XXIV	

**Legenda.** (ETEC) *Escherichia coli* enterotoxigênica; (EAEC) *Escherichia coli* enteroagregativa; (aEPEC) *Escherichia coli* enteropatogênica atípica (SOMENTE R) amostras sem resistência intermediária a antimicrobianos; (SOMENTE I) amostra somente com resistência intermediária a antimicrobianos; (SOMENTE S) amostras sem resistência e resistência intermediária a antimicrobianos.

## 5 DISCUSSÃO

---

A diarreia é causada por uma variedade de agentes bacterianos, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade, tanto nos países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. O diagnóstico inadequado ou o não diagnóstico etiológico tem impacto significativo sobre a Saúde Pública, podendo resultar na morte anual de milhares de crianças abaixo de 5 anos de idade no mundo (Walker *et al*, 2010; WHO, 2011), agrava-se a situação pois os laboratórios de exames de rotina não são equipados para a detecção das variantes enteropatogênicas de *Escherichia coli*. Sabe-se que os patótipos de DEC, através de seus diversificados mecanismos de virulência, estão classificados em pelo menos 6 subgrupos, sendo eles: *E. coli* enteropatogênica típica (EPECt) ou atípica (aEPEC); *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC); *E. coli* enteroagregativa (EAEC); *E. coli* enteroinvasora (EIEC); e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) o que requer a necessidade de ferramentas diagnósticas mais precisas (Clarke, 2001; Croxen & Finlay, 2010).

Deve-se dar um especial destaque a regiões de baixo nível de desenvolvimento socioeconômico, nas quais os reflexos das condições precárias de saneamento básico e o limitado acesso à água potável, por exemplo, são evidenciados pelas elevadas taxas de morbidade e mortalidade provocadas por diarreia nestas regiões (Boschi-Pinto *et al*, 2008; Lozer, 2011; Ochoa *et al*, 2011). Diversos estudos demonstram que essa realidade é encontrada nas populações indígenas no Brasil (Lunardi *et al*, 2002; Bóia *et al*, 2010; Souza *et al*, 2010 Cardoso *et al*, 2011).

O presente estudo realizado com amostras de crianças indígenas da etnia Guarani, que vivem em condições precárias de higiene e saneamento básico nas aldeias no sul do estado do Rio de Janeiro, mostrou a circulação de *E. coli* diarreiogênica. Com exceção da EAEC, nenhum outro patótipo esteve associado com diarreia, entretanto, o estudo evidenciou o elevado número de crianças colonizadas por algum patótipo.

## **5.1 Propriedades e potencialidades de virulência das amostras bacterianas isoladas nas diferentes aldeias indígenas.**

Nesse estudo foram analisadas 314 amostras de *E. coli* isoladas de 57 crianças indígenas menores de 5 anos de idade, com e sem diarreia, moradoras das aldeias Araponga, Rio Pequeno, Mamanguá, Sapukai e Paraty Mirim e membros da etnia Guarani no sul do estado do Rio de Janeiro. Os patotipos DEC foram detectados em 15% (48/314) das amostras estudadas. aEPEC (56%; 27/48) foi o patotipo predominante, seguido de EAEC (36%; 17/48) e ETEC (8%; 4/48). Os outros patotipos investigados não foram detectados pelas metodologias moleculares empregadas.

Os patotipos DEC foram isolados de 19 crianças com (1) ou sem diarreia (18). Não há relatos na literatura sobre a distribuição entre indígenas no Brasil, sendo assim, representamos a primeira descrição sobre a circulação e a caracterização desses enteropatógenos entre crianças de uma ampla faixa etária pertencentes a comunidades da etnia Guarani. Estudos que demonstram que a população indígena Guarani infantil (<5 anos) é mais susceptível a doenças infecciosas quando comparada a crianças nessa mesma faixa etária da população brasileira não indígena (Chaves *et al*, 2006; Cardoso, 2010).

A população indígena em estudo vive em aldeias com precárias condições de higiene e saneamento básico, o que potencializa a disseminação de microrganismos patogênicos. Em nosso estudo, o isolamento desses enteropatógenos de crianças sem diarreia, continuamente expostas a um meio ambiente desfavorável, confere o papel dessa população indígena como reservatório e fonte em potencial de transmissão desses enteropatógenos. Estudos epidemiológicos evidenciam o envolvimento de *E. coli* em situações epidemiológicas críticas como surtos e epidemias, além da associação com quadros clínicos de grande severidade levando inclusive a morte (Cohen *et al*, 2004; Gómez-Duarte *et al*, 2010; Frank *et al*, 2011).

## 5.2 Prevalência dos patotipos intestinais de *E. coli* (DEC).

O isolamento de DEC a partir de material fecal de crianças sem o quadro diarreico é descrito e sua interpretação é bastante complexa, requerendo o esclarecimento do contexto epidemiológico envolvido. A colonização assintomática pode ser resultado de vários fatores como o patógeno, o hospedeiro e o ambiente. A idade do hospedeiro é um dos fatores de proteção. Na idade primária, a lactação, os anticorpos transplacentários ajudam na resposta imune do bebê, já na idade maior os fatores de proteção são baseados no desenvolvimento da imunidade natural em função das infecções prévias. Já os fatores do patógeno, podemos dizer que a sua carga genética e de virulência podem constituir um sistema complexo requerendo, para sua plena expressão, o envolvimento de determinantes genéticos e moléculas complementares, como por exemplo, genes reguladores e componentes adicionais efetores. Atualmente as investigações são centradas no estudo de genes associados a quadros de diarreias mais graves, mas as coinfeções dificultam a identificação do agente responsável da doença, assim como a ocorrência de infecções mistas. O ambiente insalubre, por sua vez, desempenha um papel relevante como disseminador e reservatório (Wenneras & Erling, 2004; Ochoa *et al*, 2011).

Os resultados obtidos permitiram identificar os patotipos aEPEC (18%, 10/56), EAEC (12%, 7/56) e ETEC (3%, 2/56) entre as crianças indígenas menores de 5 anos de idade, com e sem diarreia. aEPEC foi isolada de crianças de 4 meses a 5 anos de idade, sem diarreia, moradoras das aldeias Sapukai, Mamanguá e Paraty Mirim. EAEC foi isolada de crianças de 17 dias a 5 anos de idade, moradoras das aldeias Sapukai, Rio Pequeno e Paraty Mirim, sem diarreia (n=6) e com diarreia (n=1), essa última apresentando quadro agudo e febre. ETEC foi isolada de duas crianças sem diarreia, ambas com 3 anos de idade, moradoras das aldeias Sapukai e Paraty Mirim. Este achado corrobora estudos anteriores que detectaram a presença dos patotipos EPEC, EAEC e ETEC tanto em crianças sem o quadro diarreico como também isolados de animais domésticos e da água (Carlos *et al*, 2011; Moura *et al*, 2012).



### **5.2.1 *Escherichia coli* enteropatogênica atípica (aEPEC).**

aEPEC vem sendo reconhecida como um enteropatógeno emergente e a literatura ainda apresenta informações restritas sobre esses microrganismos e seu papel na gênese na diarreia permanece controverso (Ochoa *et al*, 2008; Hernandez *et al*, 2009). A frequência de aEPEC (56%; 27/48) em nosso estudo, o patotipo mais frequente, foi maior do que a frequência relatada em diversos centros urbanos do mundo, variando a prevalência de 7% a 46% (Regua-Mangia *et al*, 2004b; Pérez *et al*, 2010; Bugarel *et al*, 2011). A frequência de aEPEC foi absoluta entre crianças sem diarreia, essa ausência de relação com a diarreia pode ser explicada pela heterogeneidade desse patotipo. Estudos recentes têm relatado o crescente envolvimento de aEPEC como causa de diarreia, entretanto, os mecanismos de patogenicidade e o papel na doença diarreica requerem maiores esclarecimentos. (Franzolin *et al*, 2005; Moreira *et al*, 2008; Moura *et al*, 2009; Sampaio *et al*, 2011).

### **5.2.2 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC).**

EAEC é um patotipo emergente com elevada diversidade fenotípica e genotípica, frequente em países em desenvolvimento. Tem sido isolada com muita frequência de crianças com o quadro de diarreia persistente e desnutrição (Okeke & Nataro, 2001; Regua-Mangia *et al*, 2009a). A elevada diversidade característica do patotipo, dificulta a identificação de uma característica estável para a identificação da categoria, requerendo a investigação de diversos marcadores. No presente estudo, a taxa de prevalência foi de 26% (17/48) e apenas esse patotipo foi isolado do caso de diarreia, compreendendo duas amostras de uma criança de 9 meses idade, com quadro agudo e febre. A heterogeneidade da categoria também foi observada nas amostras isoladas, corroborando com relatos que descrevem a importância do emprego de diversas técnicas para o diagnóstico mais preciso da categoria (Regua-Mangia *et al*, 2009a; Regua-Mangia *et al*, 2009b; Estrada-Garcia & Navarro-Garcia, 2012).

A patogênese da EAEC é caracterizada pela formação de um espesso biofilme e pelo aumento da secreção de muco pelo epitélio intestinal. Esse aspecto pode representar uma longa colonização pela bactéria e o episódio persistente ou, mesmo sem diarreia, comprometer o estado nutricional da criança (Kaper *et al*, 2004). Logo, a elevada prevalência de EAEC observada na população estudada, mesmo que não tenha sido associada à diarreia, indica uma taxa de colonização significativa.

### 5.2.3 *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC).

ETEC é um clássico patotipo de *E. coli* diarreio gênica frequentemente associado com quadros agudos de diarreia, em crianças menores de 2 anos de idade, moradoras de regiões endêmicas. No presente estudo, as amostras ETEC foram isoladas de duas crianças sem diarreia, ambas de 3 anos de idade. A ausência da enteropatia pode ser explicada pela colonização prévia e imunidade (Qadri *et al*, 2005; Ochoa *et al*, 2011). Entretanto, os marcadores genéticos e fenótipos encontrados estão de acordo com os achados da literatura para populações não indígenas. No presente trabalho, foram identificadas nas 4 amostras de ETEC o gene *lt*. Resultados de outras pesquisas no Brasil também têm descrito que a maioria das cepas isoladas de ETEC é portadora do gene para a LT, sendo o isolamento de amostras carreadoras do gene *st*. Apesar da baixa frequência de isolamento do patotipo ETEC em nosso estudo (8%; 4/48), a taxa está em conformidade com outros estudos epidemiológicos que apresentam uma frequência de ETEC variando de 1,2% a 9%. (Regua-Mangia, *et al*, 2004a; Franzolin *et al*, 2005; Garcia *et al*, 2011).

### 5.3 Agrupamento filogenético das amostras potencialmente enterovirulentas.

De acordo com a literatura, as cepas de *E. coli* comensais pertencem em sua maioria ao grupo filogenético A e em menor proporção ao grupo B1 e as agentes de doença diarreica são encontradas nos grupos A, B1 e D. As linhagens patogênicas agentes de doenças extra-intestinais têm sido classificadas como pertencentes, em sua maioria ao grupo B2 e em menor escala ao grupo D (Clermont *et al*, 2000; Regua-Mangia *et al*, 2009b). Nossos resultados permitiram classificar as 48 amostras de *E. coli* potencialmente enterovirulentas nos quatro filogrupos genéticos descritos por Clermont (2000). As amostras foram classificadas principalmente no grupo A (56%; 27/48), seguindo-se o filogrupo B1 (26%; 13/48) e os grupos B2 e D, ambos com representatividade de 9% cada (4/48).

A presença majoritária de amostras pertencentes aos filogrupos A e B1 corrobora resultados encontrados em estudos com amostras isoladas de crianças abaixo de 5 anos de idade, que contemplam amostras comensais, de origem ambiental e/ou agentes de doenças diarreicas. Amostras classificadas no grupo B2 foram menos frequentes e, geralmente, o filogrupo abriga linhagens patogênicas agentes de infecções extra-intestinais. É unanimidade entre autores o reconhecimento da importância que o estudo e identificação dos grupos filogenéticos podem contribuir para o conhecimento e o entendimento da diversidade e potencial de virulência dessa espécie em diferentes comunidades e sistemas ambientais (Le Gall *et al*, 2007; Regua-Mangia *et al*, 2009b).

#### **5.4 Amplificação randômica do DNA polimórfico.**

O ensaio de amplificação randômica do DNA polimórfico (RAPD-PCR) tem sido amplamente utilizado como modo de tipagem molecular devido a sua simplicidade, sensibilidade, flexibilidade e seu relativo baixo custo. Esta técnica foi utilizada com êxito por Pacheco e colaboradores (1997) e Regua-Mangia e colaboradores (2010) para o estudo de diversidade e da inter-relação de amostras de *E. coli* provenientes de diferentes origens evidenciando perfis genéticos grupo-específicos.

No presente estudo, a análise de identidade genética permitiu detectar que a população de *E. coli*, independente do patotipo é geneticamente diversa, entretanto, há uma relação genética mais estreita entre as amostras oriundas de uma mesma criança, sugerindo constituiu a mesma amostra. Perfis RAPD idênticos entre si, obtidos com o emprego dos três iniciadores utilizados (1254, A04 e M13), foram observados entre amostras isoladas de uma mesma criança evidenciando a circulação da mesma cepa de ETEC, EAEC e aEPEC. A diversidade detectada reflete a elevada plasticidade genômica característica da espécie bacteriana que através de mecanismos genéticos de transferência promove a movimentação de fragmentos de tamanhos variados. Esta plasticidade existe como resultado de adição, rearranjos, excisões e transferência horizontal de genes de virulência, que na maioria das vezes, se encontram albergados em elementos genéticos móveis (Le Gall *et al*, 2007; Croxen & Finlay, 2010).

#### **5.5 Heterogeneidade genética e seu papel na gênese da diarreia.**

A identificação precisa destes patotipos requer o emprego de métodos fenotípicos, como o teste de aderência em células epiteliais, testes de toxigenicidade e de métodos moleculares, como ensaios de hibridização e amplificação de DNA. Entretanto muitos dependem de conhecimento especializado e são restritos a laboratórios de pesquisa. Isso limita a análise e conseqüentemente, o conhecimento sobre a epidemiologia dos diversos patotipos na gênese da diarreia e sua diferenciação dentre as cepas de *E. coli* constituintes da microbiota normal.

## **5.6 Análises estatísticas: ocorrência dos patotipos intestinais entre crianças de aldeias indígenas.**

Através de análises estatísticas foi possível perceber uma associação pela Razão de Prevalência (RP) e do teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), que mostra que as aldeias pequenas (Araponga, Mamanguá e Rio Pequeno) têm menor chance de apresentarem um patotipo quando comparadas às aldeias Sapukai e Paraty Mirim, que são aldeias com maior proximidade dos centros urbano. Testes foram feitos para identificar a prevalência e a razão de prevalência sobre cada patotipo específico por aldeia indígena, porém não foram estatisticamente significativos. A faixa etária de 0 a 1 ano de idade também apresentou resultados estatísticos significativos que possibilitaram a interpretação dessa faixa etária como a de maior chance de apresentar um patotipo quando comparada com crianças mais velhas pertencentes as faixas etárias >1 a 3 e >3 a 5 anos de idade, entretanto, ao analisarmos por aldeia não obtivemos valores estatisticamente significativos.

## **5.7 Padrões fenotípicos de aderência em células epiteliais HEp-2 em cultura nas amostras potencialmente enterovirulentas.**

Métodos moleculares desenvolvidos para o diagnóstico como o teste de Hibridização em colônias e a PCR para a pesquisa do plasmídeo de aderência pAA (também designado pCVD432 na amostras protótipo de EAEC 17-2 e representado pelo gene *aggR*) vêm sendo utilizados largamente na detecção de EAEC (Torres *et al*, 2005), o que tem apresentado alternativas à utilização do teste de aderência em células epiteliais HEp-2 em cultura. Entretanto, nem todas as amostras EAEC possuem o plasmídeo pAA, o que dificulta o diagnóstico e contribui para a heterogeneidade do patotipo. (Okeke & Nataro, 2001; Estrada-Garcia & Navarro-Garcia, 2012). No presente estudo, as cepas de EAEC foram identificadas inicialmente pelos ensaios moleculares PCR multiplex e Hibridização em colônias e posteriormente pelo ensaio fenotípico de aderência em células epiteliais HEp-2 em cultura. Das 17 cepas EAEC identificadas pelos ensaios moleculares, 100% (17/17) apresentaram o padrão típico de aderência agregativa (AA), tanto no período de 3 horas quanto no período de 6 horas, dado que corrobora com muitos estudos anteriores evidenciando a importância do ensaio no diagnóstico deste enteropatógeno considerado padrão-ouro (Rosa *et al*, 1998; Nataro, 2005).

As amostras identificadas como ETEC e aEPEC (respectivamente, 8%; 4/48 e 56%, 27/48) também foram primeiramente caracterizadas por ensaios moleculares e posteriormente pelo ensaio de aderência em células epiteliais HEp-2 em cultura, tanto em períodos de 3 horas

quanto períodos de 6 horas. 100% (4/4) das amostras definidas como ETEC apresentaram o perfil de aderência agregativa (AA) no período de 3 horas de incubação e foram sem padrão típico (SPT) no período de 6 horas. Regua-Mangia e colaboradores (2004a) realizaram ensaios de aderência com células epiteliais Hep-2 e CaCo-2 e em ambos os ensaios, amostras ETEC apresentaram um padrão difuso (AD) (HEp-2, 71% - 15/21 e CaCo-2, 76% - 16/21) ou foram sem padrão típico (HEp-2, 29%, 6/21 e CaCo-2, 24% - 5/21). Já as amostras EPEC, geralmente, apresentam um padrão localizado (AL), formado por microcolônias compactas, entretanto, muitos estudos já vêm identificando outras formas de aderência para cepas aEPEC, como por exemplo, o padrão categorizado posteriormente como “like localized adherence” (LAL), padrão de aderência difusa (AD) ou agregativa (AA) (Trabulsi *et al*, 2002; Hernandez *et al*, 2009; Mora *et al*, 2009). No presente estudo, 11% (3/27) das amostras aEPEC apresentaram um padrão de aderência agregativa (AA) tanto no ensaio de 3 horas quanto no de 6 horas. O restante das amostras (89% - 24/27) foram sem padrão típico (SPT) em ambos os períodos de incubação.

As atipias observadas quanto ao padrão de aderência entre as ETEC e aEPEC poderiam ser esperadas por se tratarem de amostras isoladas de crianças sem diarreia, cujo elevado intercâmbio genético com a comunidade microbiana, possivelmente, comprometeu o potencial genético e, conseqüentemente a expressão do fenótipo característico.

### **5.8 Padrões fenotípicos de aderência em células epiteliais HEp-2 em cultura nas amostras carreadoras dos genes *astA* e *pic*.**

Muller e colaboradores (2007) realizaram testes de padrão de aderência com células em cultura, padrão ouro para a classificação do patotipo EAEC e observaram a ocorrência de falsos positivos para as cepas que carregavam somente o gene *astA* ou *pic*.

Recentemente tem sido reportado que o gene *astA* está presente não só em amostras EAEC, mas também em outros patotipos de *E. coli* diarreio gênica incluindo EPEC (Mora *et al*, 2009; Hernandez *et al*, 2009). Os nossos resultados corroboram esta observação visto que o gene *astA* esteve presente em grande parte das amostras que exibiram marcadores de enteropatogenicidade, mesmo sem ser definido algum patotipo específico, assim como esteve presente em amostras aEPEC, ETEC e EAEC.

Das 77 amostras que amplificaram somente o gene *astA*, 7% (5/77) apresentaram o padrão de aderência localizada (AL), 31% (24/77) o padrão de aderência agregativa (AA) e 62% (48/77) foram sem padrão típico (SPT) nos ensaios de 6 horas. Já o gene *pic* foi encontrado em poucas amostras incluídas neste estudo, entretanto, suas combinações

genéticas foram sempre ligadas ao patotipo EAEC, o que corrobora com os achados de Liberatore e colaboradores (2007). Quando houve a amplificação deste gene somente, foi feito o ensaio de 6 horas de aderência em células epiteliais em cultura e 100% (2/2) das amostras apresentaram o perfil de aderência agregativa, que definiria as amostras como pertencentes ao patotipo EAEC.

### **5.9 Perfil de resistência a antimicrobianos nas amostras incluídas no estudo.**

Durante os últimos anos, a utilização de antimicrobianos tem aumentado de forma exponencial na medicina humana para tratar e prevenir doenças, em consequência, principalmente, em países em desenvolvimento, observa-se o surgimento de novos mecanismos de resistência e a rápida disseminação dos mecanismos já existentes. Essa disseminação é responsável pelas altas taxas de falha nos tratamentos de infecções em todo o mundo e é considerado um dos maiores desafios em Saúde Pública no mundo moderno (Rossi, 2011). Contudo, é evidente que a preocupação acerca de efeitos adversos para a saúde humana e do ambiente vem aumentando. Muitos estudos têm sido realizados visando à pesquisa de características de resistência em microorganismos no ambiente hospital (Jafari *et al*, 2009; Idress *et al*, 2010; Garcia *et al*, 2011; Jadhav *et al*, 2011; Bartoloni *et al*, 2012).

No presente estudo, 276 (88%) amostras isoladas de crianças moradoras das cinco aldeias incluídas no estudo, foram resistentes e definiram 72 perfis de resistência, sendo que 8 padrões isolados (AMI; AMP; CFL; CPM; GEN; NIT; NOR; SUT) e 64 padrões de multirresistência para até 11 antimicrobianos. Além disso, a resistência intermediária foi detectada em 203 (65%) amostras pertencentes a todas as aldeias incluídas no estudo e definiram 76 perfis de resistência intermediária, sendo 12 padrões isolados (todos os antimicrobianos testados) e 64 de multirresistência intermediária para até 6 antimicrobianos.

Os resultados obtidos no teste de sensibilidade a antimicrobianos revelaram a ampla ocorrência da resistência bacteriana na população indígena em estudo. Essa observação reforça a necessidade de uma vigilância epidemiológica mais, visando evitar a seleção e a disseminação da resistência bacteriana, especialmente, se considerarmos a emergência da resistência para antimicrobianos de última geração como, por exemplo, o antimicrobiano cefepime, que embora não tenha apresentado o maior percentual de ocorrência já apresenta níveis consideráveis de resistência e de um fenótipo intermediário (Marshall *et al*, 2009; Rossi, 2011; Aslani *et al*, 2011; Llanes *et al*, 2012).

Em relação ao padrão de multirresistência, podemos dizer que o estudo apresentou níveis altos de grande relevância à Saúde Pública. Quando apenas alguns antimicrobianos são

testados, há dificuldades na aplicação do termo de multirresistência, especialmente os fenótipos XDR (extensively drug-resistant) e PDR (pandrug-resistant). No caso de testes incompletos pode-se somente categorizar as amostras como possíveis-XDR/PDR, entretanto, as categorias possíveis não podem ser comparadas entre si, apesar de seu valor epidemiológico. Não há relatos na literatura sobre a resistência a antimicrobianos em amostras de *E. coli* isoladas de crianças indígenas no Brasil, porém os fenótipos de resistência detectados mundialmente são, principalmente, relacionados à conduta terapêutica no que diz respeito ao uso indeterminado de antimicrobianos e a antibioticoterapia empírica e, por isso, o padrão e as características podem refletir condutas locais (Jadhav *et al*, 2011; Bartoloni *et al*, 2012; Llanes *et al*, 2012). Nas aldeias incluídas no estudo, é comum crianças adoecerem por doenças respiratórias e diarreia, e geralmente, o tratamento é empírico (Marinho, 2000; Cardoso, 2010). Adiciona-se ao fato de que essa população é culturalmente exposta ao ambiente, onde se deparam com uma elevada diversidade microbiana composta, como por exemplo, bactérias e fungos diversos, os quais albergam naturalmente determinantes de resistência que podem ser transferíveis por mecanismos diversos entre membros de comunidades microbianas.

Esse estudo representa o primeiro relato sobre a circulação e a caracterização desses enteropatógenos em crianças indígenas no Brasil. O conjunto dos resultados obtidos visa contribuir para alertar e subsidiar o planejamento de estratégias na área da vigilância em saúde indígena.

## 6 CONCLUSÕES

---

- ❑ Amostras bacterianas pertencentes a espécie *Escherichia coli* com propriedades e potencialidades de enterovirulência foram detectadas circulando na população indígena em estudo entre crianças das aldeias Sapukai e Paraty Mirim.
- ❑ A detecção da alta prevalência dos grupos filogenéticos A e B1, indica a circulação de estirpes que normalmente não estão associadas com casos clínicos severos em seres humanos.
- ❑ O diagnóstico molecular realizado pelo PCR-Multiplex detectou maior prevalência dos patotipos diarreiogênicos quando comparado ao método de hibridização em colônias, reforçando estudos prévios que atribuem maior sensibilidade a ensaios de amplificação.
- ❑ Os patotipos aEPEC, EAEC e ETEC foram detectados circulando em crianças assintomáticas e pertencentes a uma ampla faixa etária, conferindo assim a esses indivíduos, um papel relevante como reservatórios e potenciais disseminadores desses enteropatógenos no ambiente.
- ❑ A análise de genoma total detectou elevada diversidade genética bacteriana e revelou que os patotipos aEPEC, EAEC e ETEC caracterizam populações de origem não-clonal.
- ❑ Não foi observada a existência de perfil RAPD particular para um dado município ou aldeia, nem mesmo uma associação estreita com os aspectos clínico-epidemiológicos da população indígena em estudo.
- ❑ A expressão dos fenótipos de aderência, em especial das amostras de EAEC, reforça o reconhecimento dos ensaios de adesão como teste padrão-ouro para o diagnóstico deste patotipo.



- ❑ A ampla circulação de amostras exibindo padrões de multirresistência a antimicrobianos, envolvidos com diferentes mecanismos de resistência, vem contribuir para o reconhecido papel do meio ambiente na disseminação dessa propriedade.
  
- ❑ O fenótipo de resistência intermediária, detectado em amostras isoladas de todas as aldeias, alerta para a emergência de crescentes níveis de resistência, em especial, considerando a expressão desse fenótipo para drogas antimicrobianas de última geração.

## 7 COLABORADORES

---

A proposta de dissertação de Carla Verçoza Lopes Coelho, aluna do Programa de pós-graduação em Saúde Pública, foi desenvolvida sob orientação da Dra. Adriana Hamond Regua Mangia e segunda-orientação do Dr. André Reynaldo Santos Périssé.

O isolamento das amostras de *E. coli* foi previamente realizado no Laboratório de Epidemiologia Molecular do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/RJ.

A investigação de marcadores genéticos de enteropatogenicidade por ensaios de amplificação e os testes de resistência a antimicrobianos foram realizados no setor de Epidemiologia Molecular do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (DCB/ENSP), sob supervisão da orientadora e responsável pelo Setor de Epidemiologia Molecular.

A investigação de marcadores genéticos de enteropatogenicidade por ensaios de hibridização foram realizados no Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), sob responsabilidade da profª Drª. Tânia Tardelli Gomes.

Os ensaios de aderência foram realizados na Universidade do Estado do Rio de Janeiro sob a supervisão da profª. Drª. Ana Cláudia de Paula Rosa, professora do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

O projeto contou com a colaboração da pesquisadora Diana Marinho do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, quanto aos esclarecimentos dos aspectos sócio-culturais da população indígena em estudo.

O projeto contou com o apoio técnico da servidora Rose Mary Pimentel Bezerra.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Afset JE, Bergh K, Bevanger L – High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhea. – **J. Med. Microbiol.**, n. 52, p. 1015-1019, 2003.

Bartoloni A, et al – Relentless increase of resistance to fluoroquinolones and expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli*: 20 years of surveillance in resource-limited settings from Latin America. – **Clinical Microbiology and Infectium**, 2012.

Belkum A, Struelens M, Visser A, Verbrugh H & Tibayrenc M - Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. - **Clin. Microbiol. Rev.**, n. 14, p. 547–560, 2001.

Bóia MN, et al – Tuberculosis and intestinal parasitism among indigenous people in the Brazilian Amazon region. – **Rev. Saúde Pública**, n 43(1), 2009.

Boschi-Pinto C, Velebit L, Shibuya K - Estimating child mortality due to diarrhea in developing countries. - **Bull World Health Organ.**, 710-717, 2008.

Brennan FP, Abram F, Chinalia FA, Richards KG, O'Flaherty V – Characterization of environmentally persistent *Escherichia coli* isolates leached from an Irish soil. – **Applied and Environmental Microbiology**, n. 76(7), p. 2175-80, 2010.

Bugarel M, Martin A, Fach P, Bentin L – Virulence gene profiling of EHEC and EPEC *Escherichia coli* strains: a basic for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. – **BMC Microbiology**, n. 11, p. 142, 2011.

Byappanahalli MN, Whitman RL, Shively DA, Sadowsky MJ, Ishii S – Population structure, persistence and seasonality of autochthonous *Escherichia coli* in temperate, coastal forest soil from a Great Lake watershed. – **Environmental Microbiology**, n. 8(3), p. 504-13, 2006.

Cardoso AM – Doença respiratória aguda em indígenas Guarani no Sul e Sudeste do Brasil – Tese apresentada a Escola Nacional de Saúde Pública para obtenção de grau de doutor, 2010.

Cardoso AM, Coimbra Jr. CEA, Tavares FG – Morbidade hospitalar indígena Guarani Sul e Sudeste do Brasil. – **Rev. Bras. Epidemiol.**, n. 13(1), p. 21-34, 2011.

Carlos C, Alexandrino F, Vieira MAM, Stroppe NC, Sato MIZ, Gomes TAT, Ottoboni LMM – Prevalence of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from healthy animals and water sources in Brazil – **Journal of Water and Health**, n. 09(1), 2011.

Castro BG, Souza MMS, Regua-Mangia AH, Bittencourt AJ – Caracterização genotípica de amostras *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina – **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, n. 2(63), p. 515-17, 2011.

Cebula TA, Payne WL, Feng P – Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. – **Journal of Clinical Microbiology**, n. 33(1), p. 248-250, 1995.

Chaves MBG, Cardoso AM, Almeida C – Implementação da política de saúde indígena no Pólo-base Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil: entraves e perspectivas – **Cad. Saúde Pública**, n. 22(2), p. 295-305, Fev, 2006.

Clarke SC - Diarrhoeagenic *Escherichia coli* -- an emerging problem? - **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** - n. 41, p. 93 – 98, 2001.

Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E – Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. - **Applied Environmental Microbiology**, n. 66, p. 455-58, 2000.

Cohen MB et al – Prevalence of DEC in acute childhood enteritis: a prospective controlled study. – **The Journal of Pediatrics**, Jan, 2005.

Croxen MA & Finlay BB – Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. – **Nature Reviews in Microbiology**, n. 8, p. 26 – 38, 2010.

CLSI 2010: Acesso dia 10/10/2011 às 22 horas: [http://www.clsi.org/Content/NavigationMenu/Volunteers/2009LeadershipConference/2010\\_General\\_Session.htm](http://www.clsi.org/Content/NavigationMenu/Volunteers/2009LeadershipConference/2010_General_Session.htm)

Esparis CM, Teixeira LM, Irino K, Gil PF, Almeida MMTB, Lopes GS, Bravo VLR, Pacheco RS & Regua-Mangia AH - Aspectos biológicos e moleculares de amostras uropatogênicas de *Escherichia coli* isoladas na Cidade do Rio de Janeiro - **Rev. Soc. Bras. Med.Trop**, n. 39, p. 573-576, 2006.

Estrada-Garcia, C; Martin JF – Penicillins and Cephalosporins – Comprehensive Biotechnology (Second Edition), vol. 3, p. 255-268, 2011.

Estrada-Garcia T & Navarro-Garcia F – EAEC pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. – **FEMS Immunol. Microbiology**, p. 1-18, 2012.

Feng P, Lampel KA, Karch H, Whittam TS – Genotypic and Phenotypic Changes in the Emergence of *Escherichia coli* O157:H7. – **J. Infect. Dis.**, n. 1771, p. 1750-1753, 1998.

Filho PA, Santos RV, Vettore, MV – Saúde bucal dos índios Guarani no Estado do Rio de Janeiro, Brasil – **Cad. Saúde Pública**, n. 25(1), p. 37-46, Jan, 2009.

Foley SL, Lynne AM, Nayak R – Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram- negative bacterial foodborne pathogens. – **Infection, Genetics and Evolution**, n. 9, p. 430-440, 2009.

Frank C et al – Epidemic profile of Shiga (STEC) O104:H4 outbreak in Germany – Preliminary Report. – **The New England Journal of Medicine**, 2011.

Franzolin MR, et al – Prevalence of DEC in children with and diarrhea in Salvador, Bahia, Brasil. – **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, n. 100(4), p. 359-63, 2005.

Fremaux B, Prigent-Combaret C, Vernozy-Rozand C – Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: an updated review. – **Veterinary Microbiology**, n. 132, p. 1-8, 2008.

Gannon VPJ, Rashed M, King KR, Golsteyn TEJ – Detection and characterization of the *eae* gene of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. – **Journal of Clinical Microbiology**, n. 31, p. 1268-74, 1993.

Garcia PG, Silva VL, Diniz CG – Occurrence and antimicrobial drug susceptibility patterns of commensal and DEC in fecal microbiota from children with and without acute diarrhea. – **The Journal of Microbiology**, n. 49(1), p. 46-52, 2011.

Gomez-Duarte et al – Detection of DEC by multiplex PCR from children's diarrheal stools in two Caribbean-colombian cities. – **Foodborne Pathogens and Disease**, n. 7(2), 2010.

Gordon DM, Clermont O, Denamur E – Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. – **Environ. Microbiol.**, n. 10, p. 2484-96, 2008.

Gunzburg ST, Tornieporth NG, Riley LW – Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. – **Journal of Clinical Microbiology**, n. 33, p. 1375-77, 1999.

Gürtler V & Mayall BC - Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. - **Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.**, n. 51, p. 3-16, 2001.

Hacker J, Kaper JB – Pathogenicity islands and the evolution of microbes. – **Rev. Microbiol**, n. 54, p. 641-679, 2000.

Hernandes RT, Elias WP, Vieira MA, et al – An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. – **FEMS Microbiol Lett**, n. 297, p. 137-149, 2009.

Huys G, Cnockaert M, Janda JM, Swings J – *Escherichia albertii* sp. A diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children – **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, n. 53, p. 807-810, 2003.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Censo 2010. Acesso no dia 11/10/2012 às 22 horas. <http://www.ibge.gov.br/indigenas>

Idress M, Mussarat U, Badshah Y, Qamar R & H. Bokhari - Virulence factors profile of drug-resistant *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in Punjab, Pakistan. - **Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis.**: publicado *on line* set/out, DOI 10.1007/s10096-010-1036-6, 2010.

Jadhav S et al – Virulence characteristics nad genetic affinities of multiple drug resistance uropathogenic *Escherichia coli* from a semi urban locality in India. – **Plos One**, vol. 6, issue 3, 18063, mar, 2011.

Jafari F, Hamidian M, Rezadehbashi M, Doyle M, Salmanzadeh-ahrabi S, Derakhshan F, Zali MR - Prevalence and antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* species associated with acute diarrhea in Tehran, Iran.- **Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.**, n. 20, p. 56-62, 2009.

Johnson JR & Russo, TA - Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli* - **Int. J. Med. Microbiol.**, n. 295, p. 383-404, 2005.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT – Pathogenic *Escherichia coli*. – **Nature Rev. Micro.**, n. 2, p. 123-140, 2004.

LeGall T, Clermont O, Gouriou S, Picard B, Nassif X, Denamur E, Tenaillon O – Extraintestinal virulence is a coincidental by product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. - **Molecular Bio. Ecol.**, n. 24(11), p. 2373-84, 2007.

Liberatore AMA, Tomita SK, Vieira MAM, et al. – Expression of aggregative adherence to hela cells by *Escherichia coli* strains isolated from sick horses. - **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 38, p. 9-13, 2007.

Llanes JM, et al – Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* in Mexico: How serious is the problem? – **J. Infect. Dev. Ctries.**, n. 6(2), p. 126-131, 2012.

Lozer, D M. Patótipos de *Escherichia coli* diarreio gênica em crianças quilombolas com e sem diarreia, do norte do Espírito Santo. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, 2011.

Lunardi R, Ventura-Santos R, Coimbra Jr – Morbidade hospitalar de indígenas Xavante, MG, Brasil. – **Rev. Bras. Epidemiol.**, n. 10(4), p. 441-52, 2002.

Maas R – An improved colony hybridization method with significantly increased sensitivity for detection of single genes. – **Plasmid.**, vol 10 n. 3, p. 296-298, 1983.

Magiorakos, AP; Srinivasam A; Carey RB; Carmelia Y; Falagas ME; Giske CG; Harbath S; Hindlers JF; Kahmetero G; Olsson-Liljequist B; Paterson DL; Ricera LB; Stelling J; Struelens MJ; Vatopoulos A; Weben JT; Monnet DL – Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance - **Clinical Microbiology and Infection**, vol 18, n 3, p 268-81, 2012.

Makobe CK, et al – Molecular characterization of virulence factors in diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolates from children in Nairobi, Kenya. – **J. Infect. Dev. Ctries.**, n. 6(8), p. 598-604, 2012.

Marinho DP – Indicador de vulnerabilidade à AIDS através de um SIG: Os Guarani-Mbyá do estado do Rio de Janeiro – Tese de doutorado apresentada ao Instituto Militar de Engenharia para obtenção de grau de mestre, 2000.

Marshall BM, Ochieng DJ, Levy SB - Commensals: Underappreciated Reservoir of Antibiotic Resistance - **Microb.**; vol. 4 p.231, 2009.

Mora A, Blanco M, Yamamoto D, Dahbi G, Blanco JE, López C, Alonso MP, Vieira MAM, Hernandez RT, Abe GM, Piazza RMF, Lacher DW, Elias WP, Gomes TAT, Blanco J – HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of EPEC and STEC strains carrying different *eae* and *tir* alleles. – **International Microbiology**, n. 12, p. 243-51, 2009.

Moreira FC et al – Escherichia coli strains of serotype O51H40 comprise typical and atypical EPEC strains and are potentially diarrhoeagenic. – **Journal of Clinical Microbiology**, April, p. 1462-65, 2008.

Moura C, Fregolente MCD, Martini IJ, Domingos DF, Silva J, Ferraz MMG, Gatti MSV, Leite DS – Prevalence of enteropathogens in normal feces from healthy children at an infant day care in Brazil – **J. Infect. Dev. Ctries.**, n. 6(2), p. 176-80, 2012.

Moura RA, et al – Clonal Relationship among a EPEC strains isolated from different animal species and humans. – **Applied and Environmental Microbiology**, n. 23(75), p. 7399-7408, 2009.

Müller D, Greune L, Heusipp G, Karch H, Fruth A, Tschäpe H, Schmidt A – Identification of Unconventional Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolates Expressing Intermediate Virulence Factor Profiles by Using a Novel Single-Step Multiplex PCR – **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 71, n.10, p. 3380-3390, maio, 2007.

Nakano V, Avila-Campos MJ – Virulence markers and antimicrobial susceptibility of bacteria of the bacteroides fragilis group isolated from stool of children with diarrhea in São Paulo, Brazil. – **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 99(3): 307-312, 2004.

Nataro Jp, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM – Patterns of adherence of diarrheagenic Escherichia coli to HEp-2 cells. – **The Pediatric Infectious Disease Journal**, n. 6(9), p. 829-831, 1987.



Nataro JP & Kaper JB – Diarrheagenic *Escherichia coli* – **Clinical Microbiology Reviews**, n. 11(1) p. 142-201, 1998.

Nataro JP – Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. – **Curr Opin Gastroenterol.**, n. 21, p. 4-8, 2005.

Ochoa TJ, Barletta F, Contreras C, Mercado E – New into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. – **Trans R. Soc. Trop Med Hyg**, n. 102, p. 852-856, 2008.

Ochoa TJ, et al – Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarrogenica em niños peruanos com y sin diarrea. – **Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica**, n. 28(1), p. 13-20, 2011.

Okeke IN & Nataro JP – Enteroaggregative *Escherichia coli*. – **Lancet. Infect. Dis.**, n. 1, p. 304-313, 2001.

Pacheco ABF, Guth BEC, Soares KCC, Nishimura L, Almeida DF & Ferreira LCS - Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. - **J. Clin. Microbiol.**, n. 35, p. 1521-1525, 1997.

Pérez C, Gómez-Duarte OG, Arias ML – DEC in children from Costa Rica. – **Am. J. Trop. Med.**, n. 83(2), p. 292-97, 2010.

Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, et al – Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment and prevention. – **Clin. Microbiol. Rev.**, n. 18, p. 465-483, 2005.

Regua- Mangia AH, Guth BC, Andrade JRC, Irino K, Pacheco ABF, Ferreira LCS, Zahner V, Teixeira LM – Genotypic and phenotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains isolated in Rio de Janeiro city, Brazil. - **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, n. 40, p. 155-162, 2004a.

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. - **Journal of infection**; n. 48, p.161-167, 2004b.

Regua-Mangia AH., Gomes TAT, Vieira MAM, Irino K & Teixeira LM - 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.**, n. 58, p. 414–422, 2009a.

Regua-Mangia AH, Bezerra RMP, Esparis CM & Teixeira LM - *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC): Filotipagem e resistência a antimicrobianos em um enteropatógeno emergente - **Rev. Pat. Trop.**, n. 38, p. 27-34, 2009b.

Regua-Mangia AH, Irino K, Pacheco RS, Bezerra RMP, Périssé ARS & Teixeira LM - Molecular characterization of uropathogenic and diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes - **J Basic Microbiol.**, n. 50, p. 1–9, 2010.

Robins-Browne R M & Hartland E – Advances in pediatric gastroenterology and hepatology – **J. Gastroenterology and Hepatology**, n. 17, p. 467-475, 2002

Rosa, A.C.P., Mariano, A.T., Pereira, A.M.S., Tibana, A., Gomes, T.A.T. & Andrade, J.R.C. - Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. - **J. Med. Microbiol.**, n. 47, p. 781-790, 1998.

Rossi F – The challenges of antimicrobial resistance in Brasil. – **Clinical Infectious Diseases**, n. 52(9), p. 1138-43, 2011.

Sampaio SCF, et al – Distinct interaction of two aEPEC strains with enterocytes in vitro. – **The Open Microbiology Journal**, n. 5(1-M3), p. 65-71, 2011.

Sack, RB, Hirschhorn N, Brownie I, Cash RA, Woodward WE, Sack DA – Enterotoxigenic *Escherichia coli* associated diarrheal disease in apache children, - **N. Engl. J. Med.** N. 292, p. 1041-45, 1975.

Sanchez J, Holmgren J – Virulence factors, pathogenesis and vaccine protection in cholera and ETEC diarrhea – **Curr Opin Immunol.**; vol. 17; p. 388-398, 2005.

Ventura Santos R & Coimbra Jr CEA – Saúde, minorias e desigualdade: algumas teias de inter-relações, com ênfase nos povos indígenas no Brasil – **Ciência Saúde Coletiva** n. 1 vol. 5 p. 125-132, 2000.

Schmidt H, Knop C, Franke S, Aleksie S, Heeseman J, Karch H – Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. – **Journal of Clinical Microbiology**, n. 33, p. 701-5, 1995.

Schultz C, Pool GJ, Ketel R, Wever B, Speelman P, Dankert J – Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. – **Journal of Clinical Microbiology**, n. 32(10), p. 2393-97, 1994.

Solo-Gabriele HM, Wolfert MA, Desmarais TR, Palmer CJ – Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. – **Applied and Environmental Microbiology**, n. 66(1), p. 230-37, 2000.

Souza LG, Santos RV, Jr. Coimbra - Estrutura etária, natalidade e mortalidade do povo indígena Xavante de Mato Grosso, Amazônia, Brasil. - **CEA Ciência & Saúde Coletiva**, n. 15 (supl. 1), p.1465 – 1473, 2010.

Stacy-Phipps S, Mecca JJ, Weiss JB – Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* during course of infection. – **Journal of Clinical Microbiology**, n. 33(5), p. 1054-59, 1995.

Tabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA – Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. – **Emerg Infect Dis.**, n. 8, p. 508-513, 2002.

Torres, A. G. - Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Betham Science e-books. - Editor 2010. ISBN: 978-1-60805-192-2.

Torres AG, Zhou X & Kaper JB - Adherence of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains to Epithelial Cells. - **Infect. Immun.**, n. 73, p. 18-29, 2005.

Touchon M, et al – Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. - **Plos Genetics**, n; 5(1), 2009.

Venkatesan MM, Buysse JM, Kopecko DJ – Use of *Shigella flexneri ipaC* and *ipaH* sequences for the general identification of *Shigella* spp and enteroinvasive *Escherichia coli*. – **Journal of Clinical Microbiology**, n. 27, p. 2687-91, 1989.

Vieira MAM, Andrade JRC, Trabulsi LR, Rosa ACP, Dias AMG, Ramos RTS, Frankel G, Gomes TAT – 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. – **Journal Infect. Diseases**, n. 183, p. 762-72, 2001.

Walker CL, Black RE – Diarrhoea morbidity and mortality in older children, adolescents and adults – **Epidemiology Infect**, n. 138 (supl. 9), p. 1215-1226, 2010.

Wenneras C, Erling V – Prevalence of enterotoxigenic Escherichia coli- associated diarrhea and carrier state in the developing world – **J Health Popul. Nutr.**; vol. 22; p. 370-382, 2004.

WHO, World Health Statistics: Acesso no dia 20 de agosto de 2012. <http://www.who.int/Child Health Epidemiology>, 2011.

Yamamoto D, et al – Invasiveness as a putative additional virulence mechanism of some aEPEC strains with different uncommon intimin types. – **BMC Microbiology**, n. 9, p. 146, 2009.

# ANEXO 1

---

Parte do questionário, aplicado na coleta do material fecal, utilizada para a obtenção de dados epidemiológicos:

Identificação no projeto: \_\_\_\_\_

7. Informação adicional:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**OBS: AS PERGUNTAS ABAIXO DEVERÃO SER FEITAS APENAS PARA CRIANÇAS DE ATÉ 5 ANOS (COM OU SEM DIARRÉIA).**

8. Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

9. Fez uso de antibióticos nos últimos 15 dias: Sim/Não

10. Presença de diarreia (alteração do número e da consistência das fezes segundo observação da mãe, NAS ÚLTIMAS 24 horas): Sim/Não

a. Se sim, é a queixa principal? Sim/Não (especificar): \_\_\_\_\_

b. Se sim, quando se iniciou: \_\_\_\_\_ (dias)

c. Se sim, marque a (s) característica (s) das fezes:

- i. Pastosa
- ii. Líquida
- iii. Com muco
- iv. Com resíduos de sangue
- v. Sanguinolenta

d. Se sim, presença de febre: Sim/Não

e. Se sim, presença de vômitos: Sim/Não

f. Se sim, sinais de desidratação: Sim/Não

## ANEXO 2

---

### 1) Reagentes e soluções utilizadas nos ensaios de PCR

#### 1.1) Agar tripticaseína de soja (TSA - Difco™)

40g q.s.p.	1000mL
------------	--------

#### 1.2) Gel de agarose 1,5% (p/v)

UltraPure Agarose (Invitrogen®)	1,5%
---------------------------------	------

TBE 0,5X q.s.p.	100mL
-----------------	-------

#### 1.3) Solução tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 5X, pH 8.4

Tris-HCl (LGC Biotecnologia®)	0,89M
-------------------------------	-------

Ácido bórico (Merck®)	0,89M
-----------------------	-------

EDTA (LGC Biotecnologia®)	0,024M
---------------------------	--------

#### 1.4) GelRed (10.000X – Biotium, Uniscence)

Concentração de uso 1:500 em água destilada.

1µl q.s.p.	500mL
------------	-------

#### 1.5) Caldo de tripticaseína de soja (TSB – Difco™)

30g q.s.p.	1000mL
------------	--------

**1.6) Gel de agarose 1,0% (p/v)**

UltraPure Agarose (Invitrogen <sup>®</sup> )	1,0%
TBE 0,5X q.s.p.	100mL

**1.7) T.E. pH 7,5**

Tris HCl 10mM	
EDTA 0,1mM q.s.p.	250mL

**1.8) Salina 0,85%**

NaCl 0,85g q.s.p.	100mL
-------------------	-------

**1.9) Agar Mueller Hinton (MH – Difco<sup>™</sup>)**

38g q.s.p.	1000mL
------------	--------

**2) Reagentes soluções utilizadas no ensaio de aderência****2.1) Meio mínimo essencial de Eagle (MEM)**

Soro fetal bovino 2%	2mL
D-manose 20%	5mL
q.s.p.	100mL

**2.2) Tampão fostato salino (PBS) pH 7,2**

Cloreto de sódio 9g q.s.p.	100mL
----------------------------	-------