



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

VIRGINIA LEYLA SANTOS COSTA URTIGA

IMPACTO DA INFECÇÃO SUBCLÍNICA POR *Escherichia coli*
ENTEROAGREGATIVA E COINFECÇÕES NA BARREIRA INTESTINAL E
CRESCIMENTO: UM ESTUDO INFANTIL MULTICÊNTRICO.

FORTALEZA

2022

VIRGÍNIA LEYLA SANTOS COSTA URTIGA

**IMPACTO DA INFECÇÃO SUBCLÍNICA POR *Escherichia coli*
ENTEROAGREGATIVA E COINFEÇÕES NA BARREIRA INTESTINAL E
CRESCIMENTO: UM ESTUDO INFANTIL MULTICÊNTRICO.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de doutor em Farmacologia.

Área de concentração: Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

U1i Urtiga, Virgínia Leyla Santos Costa.

Impacto da infecção subclínica por *Escherichia coli* enteroagregativa e coinfeções na barreira intestinal e crescimento : um estudo infantil multicêntrico. / Virgínia Leyla Santos Costa Urtiga. – 2022.

88 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

1. *Escherichia coli*. 2. Fatores de Risco. 3. Infecções assintomáticas. 4. Técnicas de Diagnóstico Molecular. 5. Crescimento. I. Título.

CDD 615.1

VIRGÍNIA LEYLA SANTOS COSTA URTIGA

**IMPACTO DA INFECÇÃO SUBCLÍNICA POR *Escherichia coli*
ENTEROAGREGATIVA E COINFECÇÕES NA BARREIRA INTESTINAL E
CRESCIMENTO: UM ESTUDO INFANTIL MULTICÊNTRICO.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de doutor em Farmacologia.

Área de concentração: Ciências Biológicas.

Aprovada em: 24/02/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Universidade Federal do Ceará (Orientador)

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Francisco Adelvane de Paulo Rodrigues
Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia - IFCE

Profa. Dra. Daniela Vasconcelos de Azevedo
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Profa. Dra. Alyne Rodrigues de Araújo
Universidade Federal do Delta do Parnaíba - UFDPAr

Dedico esse trabalho a minha família por ser a
base de todas as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ser meu alicerce, por me dar forças para superar os obstáculos e seguir em frente, mantendo a minha esperança e fé.

Aos meu pais, Francisco Manancé da Costa e Alaíde Rosa dos Santos Costa, por terem dedicado suas vidas aos filhos e materializado o sustentáculo e perseverança de dias melhores. Meu amor por vocês é incondicional.

À minha família, especialmente meus irmãos, Felipe Santos Costa e Ricardo Lincoln Santos Costa, minha tia Iraneide Rodrigues dos Santos e Rayra Micaelly Santos Urtiga pelo apoio e estímulo para seguir em frente, sempre torcendo pelas minhas conquistas.

Às minhas filhas, Rayssa Maria Santos Urtiga e Rafaella Maria Santos Urtiga, por representarem o que tenho de mais precioso e verdadeiro.

Ao meu companheiro, Raimundo de Sá Urtiga Filho, pela paciência e por ter andado de mãos dadas comigo nessa minha caminhada.

Ao meu orientador, professor Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, pesquisador inigualável por quem tenho grande admiração e que ao longo desses anos contribuiu potencialmente para minha formação. Obrigada pelos valiosos ensinamentos e confiança.

Aos membros da banca examinadora, professores: Pedro Magalhães, Adelvane Rodrigues, Alyne Araújo e Daniela Azevedo pela disponibilidade e pelas sólidas contribuições científicas.

À Rafaella Gondim, Lyvia Carneiro, Andressa Maciel, amizade conquistada no exercício das atividades da pós-graduação, pelo suporte dado em Fortaleza, pelas palavras de incentivo e por tornar meus momentos nesse trajeto mais leve e prazeroso.

Às amigas Roberta Urtiga, Priscila Martins e Gerdane Carvalho pelo carinho, motivação e por sempre se fazerem presentes diante das dificuldades.

Aos meus colegas de laboratório LDI e a toda equipe do INCT/UPC-IBIMED, por fornecerem subsídios para operacionalização deste trabalho.

À coordenação e secretaria da Pós-Graduação em Farmacologia da UFC, pela eficiência e por sempre estarem disponíveis no esclarecimento de qualquer dúvida ou questionamento.

Aos professores do referido programa, pelo conhecimento singular e por subsidiar o empoderamento profissional.

A todos os pesquisadores e colaboradores da rede MAL-ED, assim como aos responsáveis e crianças participantes do estudo por terem contribuído no avanço da pesquisa científica.

Finalmente, agradeço a todos que me ajudaram direta ou indiretamente nessa conquista.

A todos vocês, MUITO OBRIGADA!

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por se omitir!”
(Augusto Cury)

IMPACTO DA INFECÇÃO SUBCLÍNICA POR *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA E COINFEÇÕES NA BARREIRA INTESTINAL E CRESCIMENTO: UM ESTUDO INFANTIL MULTICÊNTRICO.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A *Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA) é reconhecida como importante patógeno que pode causar infecções subclínicas, diarreia aguda e persistente, com histórico de surtos entre crianças e adultos, casos de diarreia do viajante e em pacientes infectados com o HIV. Essa infecção vem ganhando destaque nos últimos anos especialmente pela associação com disfunção entérica ambiental, resultando na redução do crescimento infantil. **OBJETIVO:** Avaliar os fatores de risco, a integridade da barreira funcional gastrointestinal, indicadores de inflamação e de resposta imune inata associada com ECEA isolada ou em combinação com outros patógenos entéricos utilizando diagnóstico molecular (*TaqMan array*) e o impacto no crescimento infantil aos seis meses de vida em uma coorte de crianças. **MATERIAL E MÉTODO:** Foi realizado um estudo caso-controle aninhado a partir de estudo coorte multicêntrico (rede MAL-ED). Para avaliar a infecção por ECEA isolada e codeteção, a coorte foi organizada em 7 grupos da seguinte forma: crianças sem detecção de patógenos nas fezes coletadas no período do estudo; crianças com ECEA nas fezes em qualquer coleta; crianças com ECEA e 1 outro patógeno; crianças com ECEA e 2 outros patógenos; crianças com ECEA e 3 ou mais outros patógenos; crianças com 1 ou 2 patógenos diferentes de ECEA; e crianças com 3 ou mais patógenos diferentes de ECEA. As principais variáveis de desfecho foram delta Z-escores: comprimento-por-idade (LAZ); peso-por-idade (WAZ), peso-por-comprimento (WLZ), para desfecho secundário incluiu-se marcadores para avaliação da barreira funcional gastrointestinal, inflamação e resposta imune inata nos primeiros 6 meses de idade entre os grupos de estudo. Os marcadores utilizados foram a excreção urinária de lactulose (L) e manitol (M), alfa-1 antitripsina (AAT), mieloperoxidase (MPO), neopterin (NEO). **RESULTADOS:** A menor escolaridade da mãe, renda, assim como higiene e saneamento inadequados, insegurança alimentar, além da maior proporção de dias de uso do antibiótico foram associados com Infecções causadas por ECEA e 3 ou mais co-patógenos comparação com todos os outros grupos de crianças ($p < 0,001$; $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p = 0,001$, $p < 0,001$ respectivamente). A função intestinal medida pela taxa de excreção urinária de L/M foi alterada, impulsionada pelos escores z ajustados das porcentagens de lactulose excretado na urina, sendo significativamente maior no grupo ECEA com 3 ou mais patógenos em relação ao grupo 1 e 2 patógenos sem ECEA ($p = 0,010$). Maior inflamação através da MPO pode ser vista no grupo ECEA com 3 ou mais patógenos em comparação com os grupos 3 ou mais patógenos sem ECEA e com o grupo sem patógenos ($p < 0,001$; $p = 0,013$). A infecção subclínica no grupo ECEA com 3 ou mais co-patógenos influenciou em menores déficits de crescimento conforme evidenciado pelo escore-Z de comprimento para idade ($p = 0,004$). **CONCLUSÃO:** Esta análise aponta que danos mais severos na barreira funcional gastrointestinal e a subsequente redução no crescimento infantil estão associados com a disfunção entérica ambiental (DEA), e são frequentemente associados com a presença de ECEA combinado com outros enteropatógenos nessa população infantil estudada.

Descritores: *Escherichia coli*. Fatores de Risco. Infecções assintomáticas. Técnicas de Diagnóstico Molecular. Crescimento.

IMPACT OF SUBCLINICAL ENTEROAGGREGATIVE *Escherichia coli* INFECTION AND CO-INFECTIONS ON THE INTESTINAL BARRIER AND GROWTH: A MULTICENTRIC CHILDREN STUDY.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Enteroaggregative *Escherichia coli* (ECEA) is recognized as an important pathogen that can cause subclinical infections, acute and persistent diarrhea, with a history of outbreaks among children and adults, cases of traveler's diarrhea and in patients infected with HIV. This infection has gained prominence in recent years, especially due to its association with environmental enteric dysfunction, resulting in reduced child growth. **OBJECTIVE:** To evaluate risk factors, the integrity of the gastrointestinal functional barrier, indicators of inflammation and innate immune response associated with CEEA alone or in combination with other enteric pathogens using molecular diagnosis (TaqMan array) and the impact on infant growth at six months of age in a cohort of children. **MATERIAL AND METHODS:** A nested case-control study was carried out from a multicenter cohort study (MAL-ED network). To evaluate isolated ECEA infection and co-detection, the cohort was organized into 7 groups as follows: children without detection of pathogens in feces collected during the study period; children with ECEA in feces in any collection; children with CEEA and 1 other pathogen; children with CEEA and 2 other pathogens; children with CEEA and 3 or more other pathogens; children with 1 or 2 different ECEA pathogens; and children with 3 or more pathogens other than ECEA. The main outcome variables were delta Z-scores: length-for-age (LAZ); weight-for-age (WAZ), weight-for-length (WLZ), for secondary outcome, markers were included to evaluate the functional gastrointestinal barrier, inflammation and innate immune response in the first 6 months of age between the study groups. The markers used were urinary excretion of lactulose (L) and mannitol (M), alpha-1 antitrypsin (AAT), myeloperoxidase (MPO), neopterin (NEO). **RESULTS:** Lower maternal education, income, as well as inadequate hygiene and sanitation, food insecurity, in addition to a higher proportion of days of antibiotic use were associated with infections caused by ECEA and 3 or more co-pathogens compared to all other groups of children ($p < 0.001$; $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p = 0.001$, $p < 0.001$ respectively). Intestinal function measured by the urinary excretion rate of L/M was altered, driven by the adjusted z-scores of the percentages of lactulose excreted in urine, being significantly higher in the ECEA group with 3 or more pathogens compared to the group 1 and 2 pathogens without ECEA ($p = 0.010$). Greater information through the MPO can be seen in the ECEA group with 3 or more pathogens compared to the groups 3 or more pathogens without ECEA and the group without pathogens ($p < 0.001$; $p = 0.013$). Subclinical infection in the ECEA group with 3 or more co-pathogens influenced smaller growth deficits as evidenced by the length-for-age Z-score ($p = 0.004$). **CONCLUSION:** This analysis indicates that more severe damage to the gastrointestinal functional barrier and subsequent reduction in infant growth are associated with environmental enteric dysfunction (EASD), and are often associated with the presence of ECEA combined with other enteropathogens in this studied infant population.

Descriptors: *Escherichia coli*. Risk factors. Asymptomatic infections. Molecular Diagnostic Techniques. Growth.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Padrão de adesão agregativo (AA).....	17
Figura 2 -	Patobiologia da ECEA e os principais genes relacionados à virulência com relevância clínica.....	19
Figura 3 -	Patobiologia da Disfunção Entérica Ambiental (DEA) e Desnutrição (DN).....	24
Figura 4 -	Fluxograma do estudo.....	30
Figura 5 -	Resumo das coletas de dados e variáveis de estudo distribuídas no tempo	32
Quadro 1-	Enteropatógenos diagnosticados na plataforma de PCR em tempo real no <i>TaqMan Array Card</i> no estudo MAL-ED.....	34
Quadro 2-	Variáveis socioeconômicas, educação materna, insegurança alimentar avaliada contra grupos de crianças com infecções subclínicas de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (ECEA) com e sem outros patógenos entéricos.....	35
Quadro 3-	Vigilância: variáveis clínicas e amamentação avaliada contra grupos de crianças com infecções subclínicas de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (ECEA) com e sem outros patógenos entéricos.....	37
Quadro 4-	Variáveis antropométricas avaliada contra grupos de crianças com infecções subclínicas de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (ECEA) com e sem outros patógenos entéricos.....	39
Quadro 5-	Variáveis laboratoriais para avaliar integridade da barreira intestinal, biomarcadores imunológicos e inflamatórios entre os grupos de crianças com infecções subclínicas de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (ECEA) com e sem outros patógenos entéricos.....	41
Figura 6 -	Distribuição das crianças do estudo a partir da proporção de ECEA identificada com base na detecção cumulativa em fezes mensais (não diarreicas) (n=1.659).....	44
Figura 7 -	Impacto no crescimento infantil aos 6 meses de idade através dos escores antropométricos (delta zlen, zwei, zfl 0-6m) por ECEA com ou sem co-patógenos em comparação com crianças sem patógenos entéricos.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variáveis categóricas determinantes associadas à presença de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa de fezes não diarreicas ao longo de 0 a 6 meses de idade.....	45
Tabela 2 – Variáveis quantitativas determinantes associadas à presença de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa de fezes não diarreicas ao longo de 0 a 6 meses de idade.....	48
Tabela 3 – Biomarcadores associados a nenhum patógeno ou com <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa e coinfeções com outros agentes patogênicos.....	51
Tabela 4 – Correlação das concentrações de biomarcadores para avaliação da barreira funcional gastrointestinal e resposta imuno-inflamatória.....	52
Tabela 5 – Infecções subclínicas de ECEA isoladamente ou combinadas com qualquer outro patógeno no crescimento infantil cumulativo.....	54
Tabela 6 – Regressão linear dos escores antropométricos (delta LAZ, WAZ, WLZ 0-6m) pelos grupos de crianças investigados.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT	Alfa-1 antripsina
AA	Aderência Agregativa
AAF-I	Fímbria de aderência agregativa I
AAF-II	Fímbria de aderência agregativa II
AAF-III	Fímbria de aderência agregativa III
AAF-IV	Fímbria de aderência agregativa IV
AAF-V	Fímbria de aderência agregativa V
aagR	Gene regulador transcricional
Aai	Responsável pelo sistema de secreção do tipo VI
aaiC	Gene codificador da ilha de ativação do aggR
aap	Proteína antiagregação de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
aar	Gene regulador negativo do aagR
aatA	Gene codificador do transportador da dispesina
AD	Aderência Difusa
COMEPE	Comitê de ética e pesquisa da Universidade Federal
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DEA	Disfunção entérica ambiental
Delta Zlen	Mudanças no escore de comprimento para idade
Delta Zwei	Mudanças no escore de peso para idade
Delta Zwfl	Mudanças no escore de peso para comprimento
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
ECEA	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica do Ceará
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
ECD	<i>Escherichia coli</i> diarreiogênica
EAST-1	Enterotoxina termostável 1 de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
HAZ	Escore altura-pela-idade (<i>Height-for-Age</i>)
HeLa	Linhagem celular

HEp-2	Linhagem celular derivada de carcinoma laríngeo humano
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IL-A	Interleucina A
LDI	Laboratório de Doenças Infecciosas
L/M	lactulose/manitol
LPS	Lipopolissacarídeo
MAL-ED	Etiologia, fatores de risco e interação das infecções entéricas com a desnutrição e consequências para a saúde da criança (<i>The Etiology, Risk Factors, and Interactions of Enteric Infections and Malnutrition and the Consequences for Child Health</i>)
MPO	Mieloperoxidase
N	Número de amostras
NEO	Neopterin
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NUBIMED	Núcleo de Biomedicina
OMS	Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization, WHO</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
pAA	Plasmídeo de aderência agregativa
Pet	Toxina codificada por plasmídeo
Pic	Proteína envolvida na colonização
SepA	Proteína extracelular de <i>Shigella</i>
SPATE	Serino proteases autotransportadora de Enterobacteriaceae
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
STEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica produtora da toxina Shiga
TAC	<i>TaqMan Array Card</i> (Cartão de Ensaio TaqMan)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGI	Trato gastrointestinal
UFC	Universidade Federal do Ceará
WAZ	Escore Peso-por-idade (<i>Weight-for-age Z-score</i>)
WHZ	Escore Peso-por-altura (<i>Weight-for-height Z-score</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
µg	Microgramas
µM	Micromolar
Da	Dalton
g	Gramas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IC	Intervalo de confiança
kDa	Kilodalton
M	Molar
Mb	Megabases
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mOsm	Miliosmol
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
°C	Graus Celsius
p	Nível descritivo, probabilidade de se obter uma estatística de teste igual ou mais extrema que aquela observada em uma amostra.
pb	Pares de bases
µl	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Definição e aspectos epidemiológicos das infecções por <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa.....	16
1.2	Patobiologia e fatores de virulência associados à infecção por ECEA.....	18
1.3	Manifestações clínicas e subclínicas causadas por espécies de ECEA.....	22
1.4	Diagnóstico clássico e molecular da ECEA.....	25
1.5	Tratamento da infecção por ECEA.....	25
1.6	Hipótese.....	26
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	Objetivo geral.....	27
2.2	Objetivos específicos.....	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1	Aspectos éticos	28
3.2	Delineamento do estudo e caracterização da população.....	28
3.2.1	<i>Critérios de inclusão</i>	29
3.2.2	<i>Critérios de inclusão</i>	29
3.3	Coleta de dados	31
3.3.1	<i>Diagnóstico de ECEA e coinfeções por cartões de matriz TaqMan (TAC)</i>	33
3.3.2	<i>Status socioeconômico, educação materna, insegurança alimentar</i>	35
3.3.3	<i>Vigilância: variáveis clínicas (relacionados com a doença) e amamentação</i>	37
3.3.4	<i>Variáveis antropométricas</i>	38
3.3.5	<i>Variáveis laboratoriais: barreira funcional gastrointestinal, biomarcadores imunológicos e inflamatórios</i>	39
3.3.5.1	<i>Procedimento para coleta de amostras</i>	39
3.3.5.2	<i>Amostra de urina para avaliação da barreira gastrointestinal - teste de lactulose/manitol</i>	39

3.3.5.3	<i>Amostra fecal (alfa-1antitripsina, mieloperoxidase, neopterin)</i>	40
3.4	Análise estatística dos dados	42
4	RESULTADOS	44
4.1	Características gerais da população de estudo e grupos de crianças com ECEA e coinfeções	44
4.2	Associação de potenciais determinantes de risco com infecção subclínica por <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa, isoladamente ou em combinação com outros patógenos	46
4.3	Marcadores de barreira funcional gastrointestinal e repostas imuno-inflamatórias	50
4.4	Associação das infecções subclínicas de ECEA isoladamente ou combinadas com qualquer outro patógeno no crescimento infantil	53
5	DISCUSSÃO	57
6	PERSPECTIVAS	66
7	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68
	ANEXOS	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição e aspectos epidemiológicos das infecções por *Escherichia coli* enteroagregativa

A *Escherichia coli* é a espécie tipo do gênero *Escherichia* que contém bacilos gram-negativos móveis que se enquadram na família *Enterobacteriaceae*. É um anaeróbio facultativo predominante da flora intestinal humana, que coloniza o trato gastrointestinal infantil dentro de algumas horas de vida e, posteriormente, confere e recebe do hospedeiro benefícios por décadas (KAPER et al., 2004).

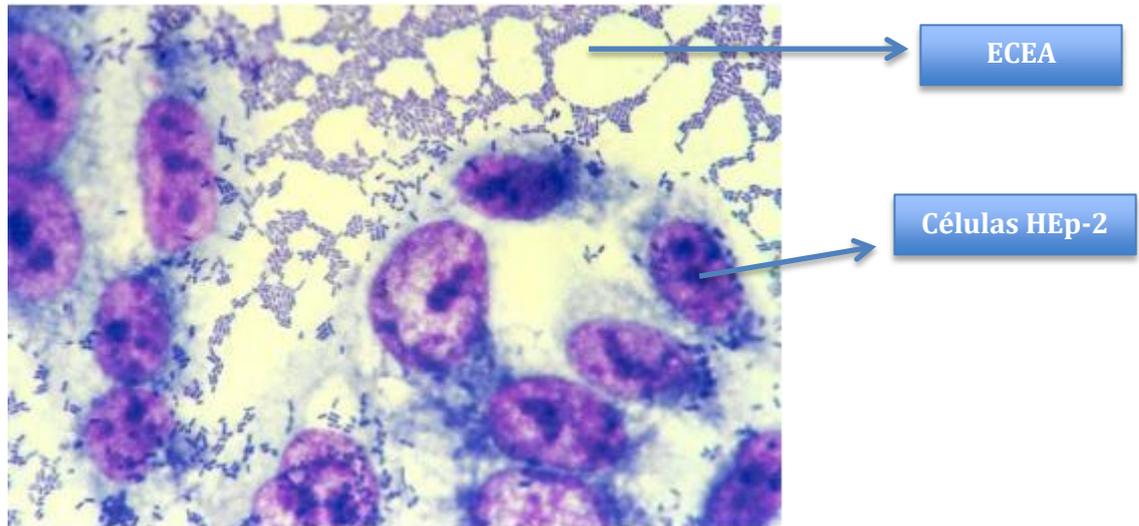
Enquanto essas bactérias não adquirirem elementos genéticos que codificam fatores de virulência, elas permanecem comensais benignas. As cepas que adquirem DNA codificando enterotoxinas, adesinas ou fatores de invasão tornam-se virulentas, aumentando sua capacidade de adaptação a novos nichos e permitindo assim um amplo espectro de doenças, como episódios de diarreia aquosa simples ou disenteria inflamatória (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006). Três síndromes clínicas gerais podem resultar da infecção por cepas patogênicas de *E. coli*: doença entérica/diarreica, infecção do trato urinário e sepse/meningite (NATARO; KAPER, 1998).

As *E. coli* diarreiogênicas (ECDs) apresentam-se como um dos principais agentes infecciosos nos casos de diarreia e desnutrição infantil. Atualmente as ECDs são classificadas em seis categorias ou patótipos, considerando seus diferentes mecanismos de virulência, síndromes clínicas que causam, sorotipos e os tipos de interação com linhagens celulares, sendo: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* enteroinvasiva (EIEC); *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC); *E. coli* enteropatogênica ou padrão de adesão localizado (EPEC); *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (LIMA; MEDEIROS; HAVT, 2018).

Em 1987, Nataro e colaboradores realizaram um estudo com cepas de *E. coli* isoladas de fezes de crianças chilenas com quadro clínico de doença diarreica aguda, cepas em que se observaram distintos padrões de aderência em células de carcinoma cervical humano (HEp-2): localizado, difuso aderente e agregativo. As cepas com a habilidade de produzir o padrão de aderência agregativa (AA) indicavam uma nova classe das ECDs (**Figura 1**), posteriormente denominada como

EAEC. O padrão AA caracteriza-se como a ligação de bactérias às células epiteliais de uma maneira de tijolos empilhados (NATARO; STEINER; GUERRANT, 1998).

Figura 1- Padrão de aderência agregativa (AA)



Padrão de adesão agregativo em células HEp-2 infectadas com a cepa 042, protótipo de EAEC.

Fonte: Elias, 1999.

Desde a primeira descrição em 1987, ECEA têm sido cada vez mais reconhecida como patógeno que causa infecção subclínica, diarreia aguda e persistente (maior de 14 dias) em países em desenvolvimento e com surtos de diarreia em países desenvolvidos em crianças e adultos (NATARO; STEINER; GUERRANT, 1998).

Além disso, EAEC tem sido identificada em casos de diarreia de viajantes de países desenvolvidos para países subdesenvolvidos (ADACHI, JIANG, MATHEWSON et al., 2002) em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (POLOTSKY; NATARO, KOTLER et al., 1997; WANKE, MAYER, WEBER et al., 1998). Também foram identificadas associações entre EAEC com crescimento linear vacilante durante a infância e com a disfunção entérica ambiental (DEA) (KOSEK et al., 2013; ROGAWSKI et al., 2017; RINA et al., 2021). Reconhecida desde a década de 1960, a DEA caracteriza-se por uma série de alterações histopatológicas da mucosa intestinal, incluindo diminuição da altura das vilosidades, aumento da profundidade das criptas e infiltração linfocítica da lâmina própria, em ambientes com repetidas exposições a patógenos entéricos; essas alterações podem ser encontradas no início da infância e são associadas com

permeabilidade intestinal aumentada e estado inflamatório crônico, podendo resultar em diminuição da imunidade entérica a patógenos gastrointestinais e, possivelmente, a antígenos de vacinas orais (BECKER-DRIPS et al., 2017).

EAEC é um patótipo emergente principalmente nos países em desenvolvimento e, por conta da sua alta heterogeneidade genética, é reconhecida como um dos microrganismos mais versáteis, detectado frequentemente nos dois primeiros anos de vida de crianças, durante os casos diarreicos e de desnutrição infantil (LIMA et al., 2000; ROGAWSKI et al., 2017; LIMA et al., 2013). Este fenômeno, de associações da EAEC com diferentes desfechos de infecção clínica (com sintomas evidentes) e até subclínica (sem sintomas clínicos ou sintomas muito leves e não específicos), poderia ser explicado por modificações em sua plasticidade fenotípica a partir de variações genéticas de aquisição ou perda dos genes de virulência que influenciariam nos mecanismos de patogenicidade.

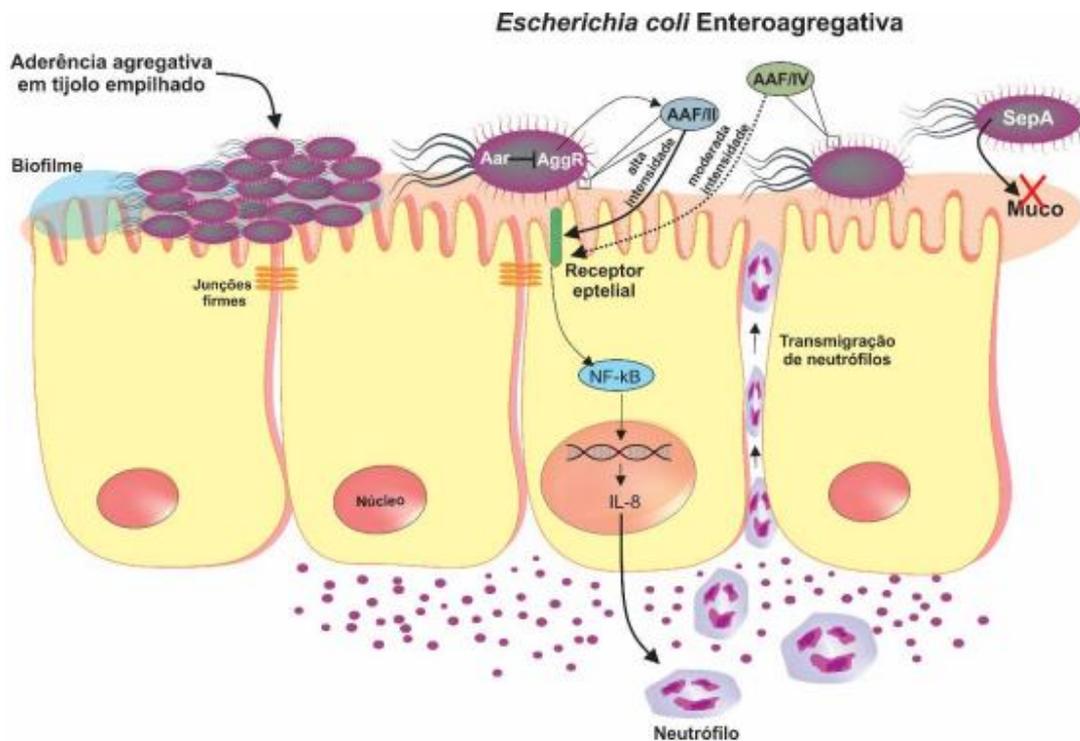
Característica importante deste patótipo reside no fato de que número considerável de pacientes pode ser colonizado de forma assintomática (subclínica), permanecendo em um estado de inflamação intestinal persistente, o que pressupõe que a manifestação da doença gastrointestinal depende da cepa e de fatores do hospedeiro (STEINER et al., 2000). Esse estado de colonização, além de manter essas cepas diarreiogênicas circulando na comunidade, tem consequências no desenvolvimento físico e cognitivo da criança (OKHUYSEN; DUPONT, 2010).

1.2 Patobiologia e fatores de virulência associados à infecção por ECEA.

Apesar da ECEA ser encontrada e identificada em todas as regiões do mundo e ser considerada um patógeno emergente, a patobiologia de ECEA é menos conhecida em comparação aos outros patótipos de ECDs (HARRINGTON et al., 2006; HUANG et al., 2006).

As três principais características da patogênese de ECEA são: aderência abundante à mucosa intestinal e formação de biofilme (comunidade microbiana complexa que adere a uma superfície incorporadas em uma matriz extracelular produzida por eles mesmos) na superfície do enterócito; produção de enterotoxinas e citotoxinas; indução da inflamação da mucosa, secreção intestinal e danos às células epiteliais (ESTRADA et al., 2012; NAVARRO; ELIAS, 2011; LIMA; MEDEIROS; HAVT, 2018), conforme pode ser visto na **Figura 2** abaixo.

Figura 2- Patobiologia da ECEA e os principais genes relacionados à virulência com relevância clínica.



Fonte: LIMA; MEDEIROS; HAVT, 2018. As bactérias ECEA promovem a formação de biofilme e liberação de marcadores inflamatórios através da interação com o epitélio intestinal. Alguns fatores de virulência específicos podem desempenhar papéis importantes na patobiologia. O principal regulador de virulência, AggR (*Aggregative adherence Regulation*), controla a expressão de vários genes, incluindo genes que codificam as AAF (Fímbrias de adesão agregativa). O AAF/II (Fímbrias de adesão agregativa do subtipo II) promove a ligação com receptores epitéliais (como a fibronectina) e contribui para o biofilme e a inflamação intestinal, que é caracterizada pela indução de NF-κB, liberação de interleucina-8 (IL-8) e migração de neutrófilos.

O primeiro passo para a infecção por ECEA é a aderência agregativa à mucosa intestinal, caracterizada pela formação de um biofilme composto por agregados de bactéria em associação com a camada mucosa. Inúmeros fatores de virulência têm sido associados com a capacidade de adesão de ECEA (HUANG et al., 2004).

Muitas adesinas, toxinas e proteínas envolvidas na patogênese da infecção por ECEA têm sido descritas, mas a prevalência dos genes que codificam esses fatores de virulência é altamente variável e até o momento, nenhum desses tem sido encontrado em todas as cepas (PIVA et al., 2003; ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012; LIMA et al., 2013; HAVT et al. 2017).

Posteriormente, a ECEA foi classificada como típica e atípica, conforme a presença ou não do gene *AggR* (*Aggregative adherence Regulation*) (SARANTUYA

et al., 2004). Esse gene codifica uma proteína reguladora global dos genes de virulência de ECEA e está localizado no plasmídeo de virulência comumente presente em cepas deste patótipo (BAUDRY et al.; 1990; HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006).

Um dos fatores de maior impacto são as estruturas fimbriais conhecidas como fimbrias de adesão agregativa (AAFs). Estas fimbrias, junto à adesinas não fimbriais, atuam no primeiro estágio da patogênese, a aderência à mucosa intestinal, um passo essencial à colonização e produção da doença pela ECEA. Os genes que codificam estas adesinas são sempre encontrados em baixa prevalência, o que indica a alta diversidade de estruturas adesivas responsáveis pelo padrão AA (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011). Cinco variantes da fimbria AAF foram até agora descritas: AAF/I, II, III, IV e V; sendo todas elas reguladas pelo ativador transcricional AggR (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011; CROXEN et al., 2013; JONSSON et al., 2015). O gene AggR também possui o papel de regular a transcrição do gene *aap* que codifica a proteína dispersina e do seu transportador, codificado pelo gene *aatA* (SHEIKH et al., 2001).

Outros fatores de virulência específicos podem desempenhar papéis importantes na patobiologia. O AAF/II promove a ligação com receptores epiteliais (como a fibronectina) e contribui para o biofilme e a inflamação intestinal, que é caracterizada pela indução de NF- κ B, liberação de interleucina-8 (IL-8) e migração de neutrófilos (ANDRADE et al., 2017).

A capacidade de adesão representa um passo fundamental na virulência de ECEA, entretanto mecanismos patogênicos adicionais são requeridos para o desenvolvimento dos sintomas diarreicos. Outro fator de virulência importante na infecção causada por ECEA é a dispersina. Essa proteína codificada pelo gene *aap* e secretada pela ECEA liga-se de forma não covalente ao lipopolissacarídeo (LPS), neutralizando sua carga e assim permitindo que as fimbrias se desprendam para que a bactéria possa infectar outras regiões (SHEIKH et al., 2001). No entanto, o papel desempenhado por essa proteína no contexto da patogenicidade da ECEA necessita de mais esclarecimentos, pois o gene codificador da dispersina (*aap*) não está presente em todas as cepas de ECEA. Além do mais, *aap* tem sido detectado também em cepas comensais de *E. coli* (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011).

Outra característica de ECEA é a habilidade de formar biofilme, resultado da agregação bacteriana, que confere respostas induzidas pelo microorganismo. A

formação de um biofilme persistente pode estar intimamente relacionada a capacidade de induzir diarreia e com a habilidade de provocar uma colonização persistente (SHEIK et al., 2001; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011).

O biofilme também pode contribuir para infecções subclínicas e manifestações persistentes da doença, ao permitir que as bactérias invadam o sistema imunológico local, podendo inibir a quimiotaxia, a fagocitose e a proliferação de linfócitos, além de limitar a atuação dos macrófagos, prevenir o transporte de fatores antibacterianos e o transporte celular de antibióticos (PEREIRA et al., 2007; TOKUDA et al., 2010; VASUDEVAN et al., 2003). Existem diversos fatores e genes que contribuem para o estabelecimento do biofilme, conforme estudo realizado por Mohamed et al. (2007) que associou os genes AggR, set1A, aatA e irp2 de ECEA a este processo.

Após o estabelecimento da colonização e da formação de biofilme por ECEA, há liberação de diversas toxinas e proteases no tecido do hospedeiro, causando inflamação e lesão tecidual (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006).

Outra característica das enterobactérias diz respeito a secreção de proteínas serino-proteases com ação similar à tripsina, que são denominadas coletivamente de SPATEs (*Serine proteases autotransporters of Enterobacteriaceae*) (BOISEN et al., 2009). As SPATEs compreendem serino-proteases com funções diversas, tais como proteases, toxinas e adesinas (RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014).

Filogeneticamente, as SPATEs são categorizadas em duas classes: Classe I, que são proteínas com atividade citotóxica para células epiteliais, que contêm os seguintes genes: toxina autotransportadora secretada (Sat), toxina codificada por plasmídeo (pet), protease homóloga de IgA de *Shigella* (sigA), codificador da enterotoxina EspC – espC e serino-protease extracelular – espP; e Classe II, que referem-se às proteínas com atividades mais diversificadas apesar de muitas serem conhecidas por sua ação sobre a degradação de mucinas que incluem os genes, proteína envolvida na colonização (pic), hemaglutinina sensível à temperatura (tsh), toxina autotransportadora vacuolização (vat), protease extracelular da *Shigella* (sepA), proteína autotransportadora de *E. coli* enterotoxigênica – (eatA) e *Escherichia coli* secretora de protease (espL). (BOISEN et al., 2009; MOAL et al., 2011; RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014).

Vale ressaltar que a EAST-1 (toxina termoestável de ECEA – *heat - stable enterotoxin*) codificada pelo gene astA, não pertence ao grupo das SPATEs e

partilha algumas propriedades funcionais com a enterotoxina secretada pela ETEC. Esta toxina causa um aumento da secreção de cloreto e tem sido associada à diarreia (MÉNARD; DUBREUIL, 2002). Apesar disso, a presença de cepas de ECEA expressando esta toxina foi similar entre doentes e pessoas saudáveis (NATARO; KAPER, 1998).

Investigações posteriores demonstraram que o gene *astA*, que codifica a proteína EAST-1, está presente em outras categorias de *E. coli* e tem sido encontrada em 38% de cepas não-patogênicas (MÉNARD; DUBREUIL, 2002; SAVARINO et al., 1996; YAMAMOTO; ECHEVERRIA, 1996). Cepas de *E. coli* produzindo EAST-1 têm sido associadas com diarreia em vários estudos (FLORES et al., 2008; JAIN et al., 2008).

Ademais, o fato dos marcadores de virulência, descritos até o momento, não serem encontrados em todos os isolados de ECEA (HARRINGTON et al., 2006), demonstra a heterogeneidade e a plasticidade genômica deste patotipo de *E. coli* diarreiogênica. Outro fato importante a ser destacado no cenário epidemiológico atual é a detecção do patotipo ECEA tanto em fezes de indivíduos diarreicos como em fezes de indivíduos saudáveis (BUERIS et al., 2007; SPANO et al., 2008; DIAS et al., 2016), indicando a dificuldade em evidenciar os isolados de ECEA com o verdadeiro potencial patogênico.

1.3 Manifestações clínicas e subclínicas causadas por espécies de ECEA

A transmissão de ECEA ocorre pela via fecal-oral, através de ingestão de água e alimentos contaminados, atingindo assim o intestino, onde poderá iniciar o processo infeccioso e acarretar manifestações clínicas (sinais e sintomas observáveis e mensuráveis) e subclínicas (sem sintomas evidentes ou muito leves para serem notados) no hospedeiro (HUANG et al., 2006).

A variabilidade nos sinais e sintomas, assim como na duração destas manifestações, é atribuída à heterogeneidade genética das cepas de ECEA, à dose de bactéria ingerida e aos fatores inerentes ao hospedeiro (HUANG et al., 2004).

Alguns autores têm apontado a capacidade das diferentes cepas de ECEA de aderir a diferentes regiões do trato gastrointestinal. Algumas cepas ligam-se preferencialmente à mucosa do jejuno e outras aderem ao íleo ou cólon (ARAUJO et

al., 2010). A adesão à mucosa intestinal é um aspecto essencial à colonização e produção da doença pela ECEA.

As manifestações clínicas das infecções causadas por ECEA variam desde infecções assintomáticas a quadros diarreicos agudos e persistentes, de intensidade leve a severa (HUANG et al., 2004). O período de incubação nesses voluntários que desenvolveram diarreia varia de sete a vinte e duas horas, com uma média de 14 horas (NATARO et al., 1995). Outros autores relatam um período de incubação de oito a dezoito horas (HUANG et al., 2004).

Cabe ressaltar, que além dos episódios de diarreia aquosa apresentados, podendo ser acompanhados por muco, estes quadros podem ser seguidos de náuseas, vômitos, febre, dor abdominal, e em alguns casos, fezes sanguinolentas (CROXEN et al., 2013; ALI et al., 2014). Embora os casos assintomáticos sejam os mais prevalentes, há evidências de outras manifestações clínicas tais como déficit de crescimento infantil e enteropatia ambiental (GUTIERREZ et al., 2014; HAVT et al., 2017; ROGAWSKI et al., 2017; RINA et al., 2021).

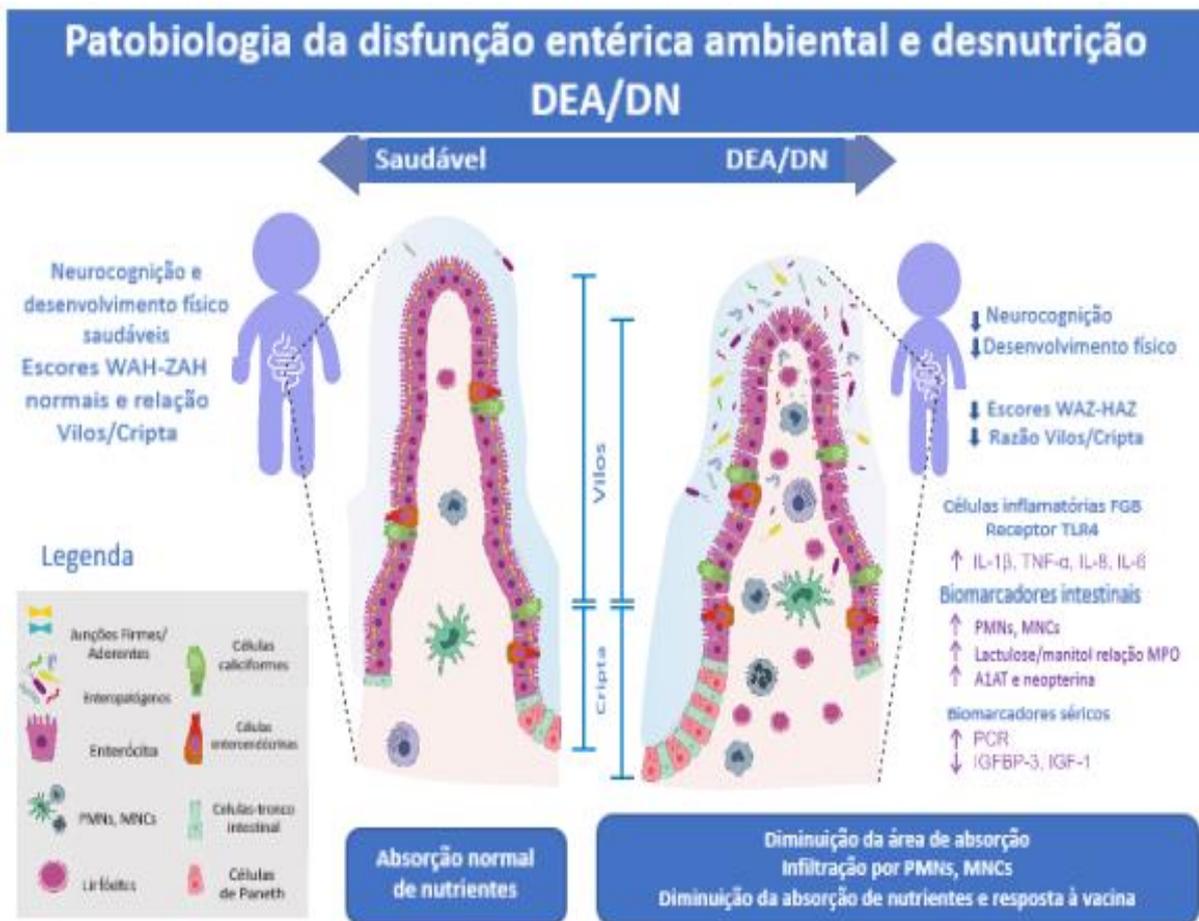
Além desse patógeno já ter sido associado como importante causa de infecções diarreicas em diversos países no mundo, a ECEA em casos assintomáticos foi associada com a diminuição do crescimento em crianças, além de induzir inflamação e diminuição das funções da barreira intestinal, caracterizando-se como um patógeno potencialmente envolvido na Disfunção Entérica Ambiental (DEA) em países em desenvolvimento (ROGAWSKI et al., 2017, RINA et al., 2021). Associações entre Infecções assintomáticas por ECEA e desnutrição (HAVT et al., 2017) e co-detectação de patógenos com redução no crescimento infantil (LIMA et al., 2018) também têm sido relatadas.

No que concerne a DEA, trata-se de uma doença subclínica adquirida, que pode ser reversível, sendo associada com atrofia parcial dos vilos intestinais, aumento da profundidade das criptas e infiltração de linfócitos T na lâmina própria e no epitélio do intestino delgado em consequência da exposição frequente do intestino a patógenos exógenos durante a infância (KEUSCH et al., 2014).

Ademais, a DEA está associada ao aumento da permeabilidade intestinal e influxo de elementos inflamatórios através do epitélio intestinal. Histologicamente, suas alterações estão associadas à uma má absorção, prejuízo no desenvolvimento cognitivo, capacidade de resposta reduzida a intervenção nutricional, déficit de

crescimento e redução da imunogenicidade de vacinas orais (GUERRANT et al., 2013; MAHFUZ et al., 2017).

Figura 3 – Patobiologia da disfunção entérica ambiental (DEA) e desnutrição (DN)



Modelo de patologia disfunção entérica ambiental (DEA) e desnutrição (DN). DEA e DN são doenças comuns principalmente em crianças pertencentes a populações pobres com baixo índice de desenvolvimento humano (IDH), insegurança alimentar e más condições de higiene e saneamento. Em ambas as doenças, estudos histopatológicos de biópsias do intestino superior mostraram redução significativa do comprimento das vilosidades e hipertrofia das criptas intestinais. A lâmina própria apresenta um infiltrado predominante de células mononucleares (MNCs), seguido menos frequentemente por células polimorfonucleares (PMNs). Estudos recentes mostram que DEA e DN foram associados a infecções subclínicas por agentes enteropatógenos e por alterações na microflora intestinal. Essas alterações muitas vezes resultam na liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, IL-1 β , TNF- α , IL-8 e IL-6 por meio de estimulação em células MNCs e PMNs. No lúmen intestinal, foi documentado um aumento significativo de biomarcadores inflamatórios como mieloperoxidase (MPO) e neopterina (NEO), bem como alterações nos biomarcadores de função e permeabilidade da barreira gastrointestinal funcional (FGB). Essas alterações resultam em redução da área de absorção intestinal, diminuição da absorção de nutrientes e redução da resposta às vacinas. No nível sanguíneo, a inflamação sistêmica foi documentada por um aumento na proteína C reativa (PCR) e uma redução nos fatores de crescimento ósseo, como o fator de crescimento da insulina-I (IGF-I) e a proteína β de ligação ao IGF-I 3 (IGF β P-3). WAZ: escore z peso/idade; HAZ: escore z de altura para idade. Ilustração cedida por LIMA et al. e ainda não publicados.

1.4 Diagnóstico clássico e molecular da ECEA

Para o diagnóstico da ECEA o teste de adesão em células HeLa ou HEp-2 é utilizado como padrão ouro para sua classificação (NATARO; KAPER, 1998; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011). Este teste requer instalações especializadas e, portanto, só pode ser realizado em laboratórios de referência, sendo necessária a adesão estrita ao protocolo (VIAL et al., 1990). É importante observar que algumas cepas de ECEA não apresentam o padrão de aderência agregativo, e isso também pode ser exibido por algumas cepas de EPEC (LIMA; MEDEIROS; HAVT, 2018).

Atualmente, o uso da biologia molecular é uma ferramenta comumente empregada para um diagnóstico ECEA e, apesar de diversos critérios para diagnóstico terem sido propostos até o momento, nenhum demonstrou a especificidade e sensibilidade necessárias para sua detecção. Recentemente, dois grandes estudos multicêntricos usaram os genes codificador da ilha de ativação do regulador transcricional (*aaiC*) e transportador de proteína de anti-agregação (*aatA*) como marcadores, enquanto a presença de pelo menos um gene definiu o diagnóstico positivo de ECEA (PLATTS-MILLS et al., 2015; KOTLOFF et al., 2013).

Adota-se que o uso do critério de presença concomitante de pelo menos dois genes (tanto de dentro como de fora do pAA) deve permitir a identificação de cepas clássicas de ECEA. No entanto, as cepas que não atendem a estes critérios também podem possuir virulência em potencial (LIMA; MEDEIROS; HAVT, 2018).

Deste modo, para diagnóstico de ECEA, além da identificação da bactéria a partir das fezes do doente, outros fatores devem ser considerados, como o desenvolvimento da doença durante um surto deste microorganismo, quando o isolado pertence a um sorotipo já associado com a doença ou quando a bactéria é isolada repetidamente, principalmente se o paciente apresenta diarreia persistente e na ausência de diagnóstico de outro enteropatógeno (NATARO; KAPER, 1995; OKEKE; NATARO, 2001).

1.5 Tratamento da infecção por ECEA

A infecção por ECEA geralmente é autolimitada e o tratamento padrão recomendado é a terapia de reidratação oral. No entanto, os sintomas podem ser debilitantes e ter um alto impacto socioeconômico, particularmente em ambientes de

baixa renda, e o tratamento com antibióticos pode ser procurado se a diarreia e a dor abdominal forem graves e/ou prolongadas.

A resistência antimicrobiana (RAM) tem sido comum em isolados bacterianos em todo o mundo. A Vigilância Regular da Resistência aos Antibióticos fornece informações para garantir a eficácia da terapia antibiótica e controlar a resistência. Estudos globais destacaram uma alta incidência de resistência antimicrobiana em cepas de *E. coli* pertencentes ao patótipo ECEA em comparação com outros patótipos de *E. coli* (ASLANI et al., 2011).

Alguns fatores contribuem para RAM como os mecanismos diretamente relacionados à virulência, que tem sido apontado como um dos fenômenos mais relevantes que contribuem para a elevação das taxas de morbimortalidade.

Outro aspecto importante que vem sendo descrito é a resistência a múltiplos antibióticos em isolados bacterianos de origem diversa. Particularmente para as ECEA, a observação de que marcadores genéticos de virulência são co-transferidos com genes codificadores de resistência a antimicrobianos vem sugerir, cada vez mais, que esta propriedade pode desempenhar um papel importante ou mesmo contribuir para a virulência desses microrganismos (ASLANI et al., 2011).

Ainda no que diz respeito à resistência aos antibióticos, a variabilidade fenotípica e genotípica comumente observada no grupo de ECEA e descrita nas investigações epidemiológicas, sugerem que a patogenicidade seja um atributo de subpopulações dentro da categoria, as quais compartilham propriedades específicas (HELALAT, 2020). A ação dos antimicrobianos na infecção por ECEA pode ser difícil, uma vez que o biofilme da mucosa cria uma barreira que impede a penetração de antibióticos e fatores antimicrobianos do hospedeiro (VIJAY et al., 2015).

1.6 Hipótese

Acredita-se que uma abordagem de diagnóstico molecular utilizando plataforma *TaqMan array* possa melhorar a caracterização em nível populacional dos fatores determinantes da infecção por ECEA e co-infecção com enteropatógenos possibilitando uma melhor compreensão da patobiologia a nível de barreira funcional gastrointestinal e seu impacto no crescimento infantil.

2 OBJETIVOS

2.2 Geral

Avaliar os fatores de risco, a integridade da barreira funcional gastrointestinal, indicadores de inflamação e de resposta imune inata associada com ECEA isolada ou em combinação com outros patógenos entéricos utilizando diagnóstico molecular (*TaqMan array*) e o impacto no crescimento infantil aos seis meses de vida em uma coorte de crianças.

2.3 Específicos

1. Caracterizar fatores determinantes: socioeconômicos, clínicos e antropométricos nos grupos investigados com e sem ECEA e 28 outros copatógenos analisados por microbiologia molecular nos primeiros seis meses de vida;
2. Associar potenciais determinantes de risco com infecção subclínica por ECEA isoladamente ou em combinação com outros enteropatógenos;
3. Avaliar barreira funcional gastrointestinal através do teste de excreção urinária de lactulose e manitol;
4. Comparar os níveis de biomarcadores de enteropatia ambiental (alfa-1-antitripsina, mieloperoxidase e neopterin) entre grupos com e sem ECEA e copatógenos;
5. Correlacionar os biomarcadores para avaliação da barreira funcional gastrointestinal e imuno-inflamatórios;
6. Determinar o impacto das infecções subclínicas de ECEA e coinfeções nos escores-Z nutricionais (LAZ, WAZ, WLZ) em crianças de 0 - 6 meses de idade.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Aspectos éticos

O seguinte projeto é um recorte de um estudo de coorte multicêntrico, que acompanhou crianças durante os seus primeiros 5 anos de vida, denominada “Estudo da Etiologia, Fatores de Risco e Interações de Infecções Entéricas e de Desnutrição e suas Consequências para a Saúde e Desenvolvimento Infantil” (*The Etiology, Risk Factors and Interactions of Enteric Infections and Malnutrition and the Consequences for Child Health and Development*, MAL-ED), o qual foi conduzido em 8 países em desenvolvimento, localizados nos continentes da Ásia, África e América do Sul, sendo eles: Dhaka, Bangladesh; Fortaleza, Brasil; Vellore, Índia; Bhaktapur, Nepal; Naushahro Feroze, Paquistão; Loreto, Peru; Venda, África do Sul e Haydom, Tanzânia. O estudo MAL-ED foi um projeto colaborativo apoiado pela Fundação Bill & Melinda Gates, pela *Foundation for the National Institutes for Health* (FNIH) e pelo *Fogarty International Center* (FIC) (número de concessão OPP47075) (MAL-ED, 2014).

Os protocolos do estudo foram aprovados pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, com parecer nº029/10, registro nº157001 e processo nº25000.9836/2009-76 (**ANEXO A**). Também houve aprovação junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, em carta de aprovação, com protocolo nº246/09 (**ANEXO B**). O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi assinado pelos pais ou responsáveis da criança e pode ser observado no (**ANEXO C**).

As crianças receberam números codificados, não sendo identificadas pelo nome em nenhum documento do estudo. Os dados foram mantidos em local seguro no Sistema de Segurança e Gerenciamento de Dados (SSGD), na Unidade de Pesquisas Clínicas / Instituto de Biomedicina (UPC/IBIMED), na UFC.

3.2 Delineamento do estudo e caracterização da população

O estudo MAL-ED concentrou-se em coortes de nascimento internacional e multidisciplinar acompanhadas longitudinalmente (até 24 meses de idade) em cada um dos 8 locais de estudo. Esta pesquisa incluiu dados coletados durante os

primeiros 6 meses de vida. No geral, 2.145 recém-nascidos foram inscritos em uma base contínua ao longo de um período de 2,25 anos, registrados entre novembro de 2009 e fevereiro de 2012 conforme critérios descritos abaixo.

3.2.1 Critérios de inclusão

- Bebês saudáveis inscritos até 17 dias após o nascimento.
- O cuidador relatou que não tinha planos de se mudar da área de abrangência por pelo menos 6 meses após a inscrição no estudo.
- Disponibilidade do cuidador em ser visitado no domicílio duas vezes por semana.

3.2.2 Critérios de exclusão

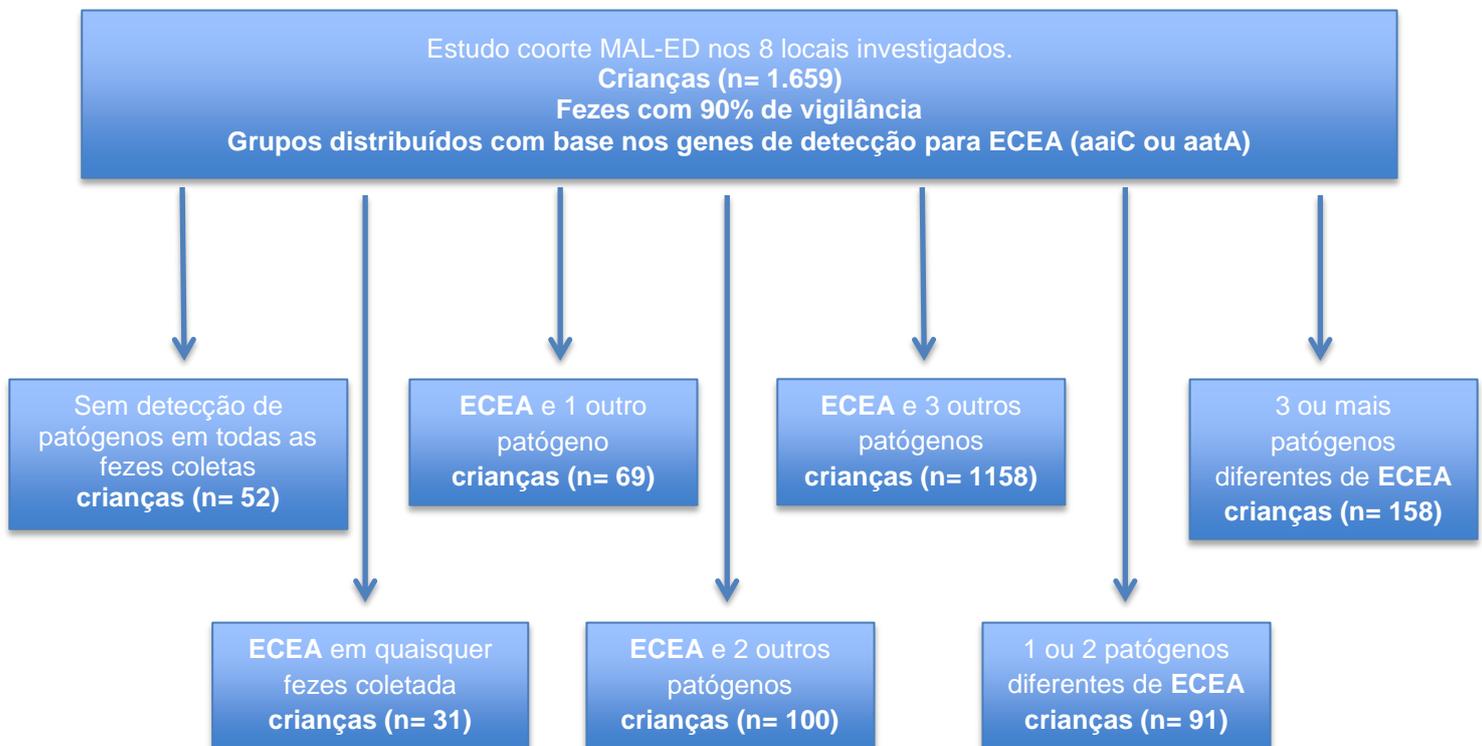
- A família tinha planos de se mudar da área de captação por >30 dias consecutivos durante os primeiros 6 meses de acompanhamento.
- A mãe tinha menos de 16 anos de idade.
- A mãe já tinha outro filho inscrito no estudo de coorte MAL-ED.
- A criança nasceu de gravidez gemelar
- O bebê tinha qualquer uma das seguintes indicações de doença grave:
 - Hospitalização por algo diferente de um parto normal e saudável;
 - Condição grave ou crônica diagnosticada por um médico (por exemplo, distúrbio neonatal; doença renal, hepática, pulmonar e / ou cardíaca; doenças congênitas); ou
 - Enteropatias diagnosticadas por médico.
- O responsável pela criança não forneceu consentimento informado assinado.
- O peso ao nascimento ou inscrição foi <1500 g.

Para essa pesquisa, utilizou-se o desenho de pesquisa caso-controle aninhado não pareado no tempo, tendo como base primária o uso da coorte previamente identificada, minimizando assim viés de seleção e viés de informação. O viés de causalidade reversa também pôde ser minimizado pelo uso de casos incidentes identificados na referida coorte.

Amostras fecais da coorte foram coletadas durante os dois primeiros anos de vida dessas crianças e serviram ao diagnóstico de 29 enteropatógenos através da análise quantitativa molecular *TAC array* (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, EUA), descrito em detalhes na seção 3.3.1. Especificamente para ECEA detectadas em fezes não diarreicas, os genes *aatA* e *aiiC* foram alvo de PCR. As amostras foram consideradas positivas para ECEA se pudessem ser detectados um dos dois genes diagnósticos.

A partir desse diagnóstico, as crianças foram divididas em sete grupos distintos com base na detecção mensal acumulada de patógenos entéricos em amostras de fezes, a saber: crianças sem detecção de patógenos em todas as amostras coletadas, ECEA em qualquer das amostras coletadas, ECEA e 1 outro patógeno em qualquer das amostras, ECEA e 2 outros patógenos em qualquer das amostras, ECEA e 3 outros patógenos em qualquer das amostras, 1 ou 2 patógenos diferentes de ECEA em qualquer das amostras, 3 ou mais patógenos diferentes de ECEA em qualquer das amostras, totalizando 1.659 crianças. O fluxograma do estudo pode ser observado na **Figura 4** abaixo.

Figura 4 – Fluxograma do estudo

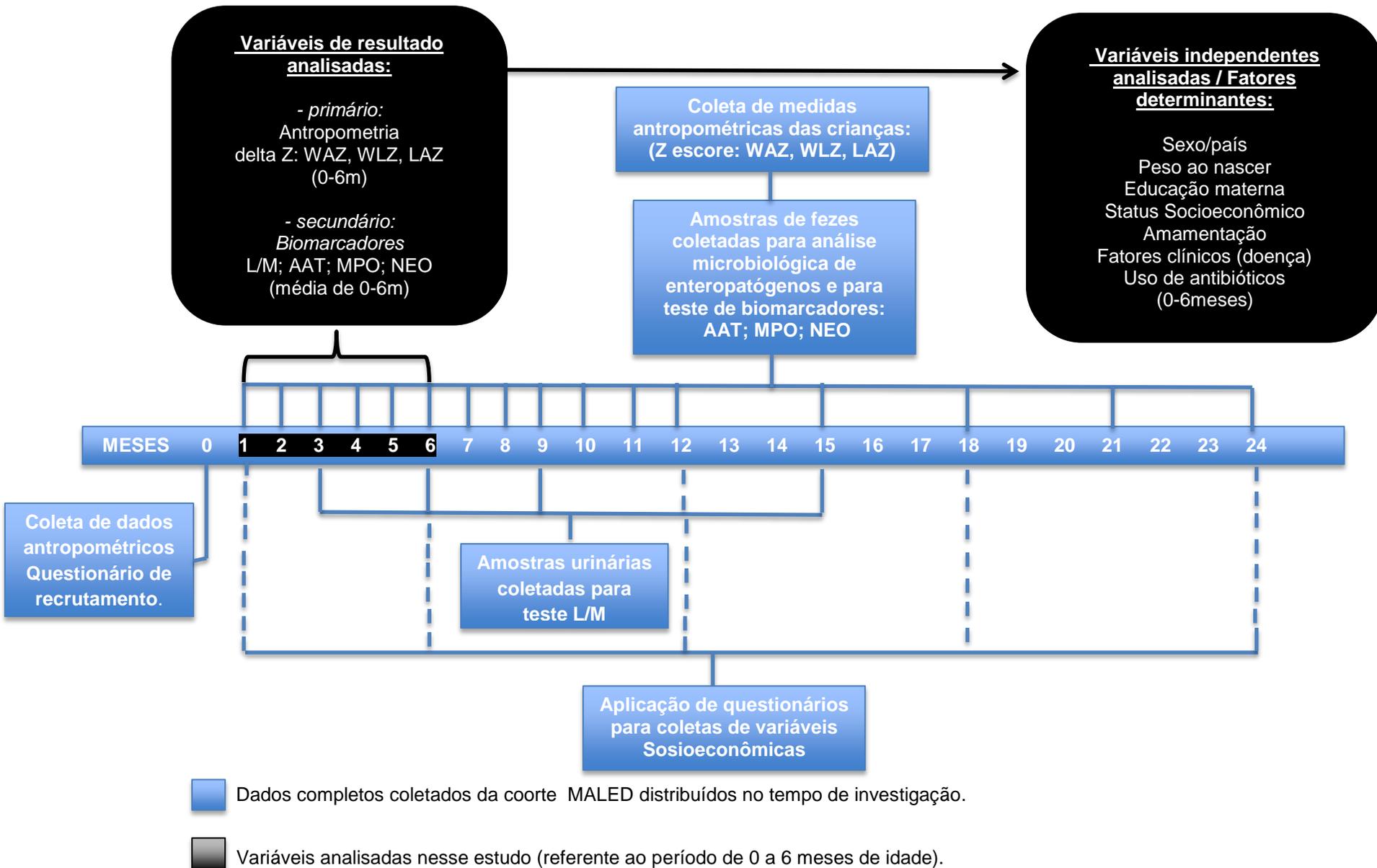


Distribuição das crianças nos grupos de estudo com base na detecção de ECEA e coinfeção de forma cumulativa pela plataforma *TaqMan array* em amostras de fezes não diarreicas coletadas mensalmente (0-6 meses) com 90% de vigilância (monitoração ativa e contínuo de dados).

3.3 Coleta de dados

Diversos dados foram coletados ao longo dos 24 meses de investigação, por uma equipe treinada e vigilância ativa, utilizando questionários e protocolos padronizados. Para esse estudo, consideraram-se os dados coletados referentes aos primeiros 6 meses, entre eles: status socioeconômico, educação materna e insegurança alimentar aos 6 meses; variáveis determinantes como amamentação, uso de antibióticos, episódios de doença (diarreica e respiratória), febre, desidratação em porcentagem de dias, integridade da função intestinal, biomarcadores imunológicos e inflamatórios; medidas antropométricas. Resumo das variáveis utilizadas e dados completos coletados pode ser visualizado na **Figura 5** a seguir.

Figura 5 – Resumo das coletas de dados e variáveis de estudo distribuídas no tempo.



3.3.1 Diagnóstico de ECEA e coinfeções por cartões de matriz TaqMan (TAC)

As amostras não diarreicas foram analisadas de acordo com um protocolo de microbiologia padronizado, que foi implementado em todos os locais do estudo. Resumidamente, o ácido nucleico total (tanto DNA quanto RNA) foi extraído das amostras fecais usando o kit *QIAamp Fast DNA Stool Mini (Qiagen)*, conforme orientações do fabricante. Dois controles externos, a saber: bacteriófago MS2 e *Phocine herpesvirus (PhHV)* foram adicionados às amostras para confirmação da extração de ácidos nucleicos e eficiência de amplificação (LIU et al., 2014) .

Para a detecção de enteropatógenos, uma reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) com o uso de um *TaqMan Array Card (TAC)* personalizado envolvendo ensaios de PCR em tempo real baseados em sondas compartimentadas foi usado para a detecção de possíveis 29 patógenos (incluindo bactéria, vírus, fungos e protozoários) de cada uma das amostras (ver **Quadro 1** abaixo) (ROGAWSKI et al., 2017) . O valor de Ct (ciclo de quantificação) de 35 foi definido como um limite para análise, sendo que um Ct > 35 foi considerado negativo, conforme mencionado por Liu et al. (2014) . No estudo MAL-ED, foi investigada a ocorrência de genes relacionados à virulência (VRG) de ECEA , a saber: *aatA* , *aggR*, *Aar* e *aaiC* . Contudo, para diagnosticar ECEA, foram usados apenas os genes *aatA* (proteína transportadora de dispersina) e *aaiC* (proteína secretada), onde a presença de um deles confirmou diagnóstico positivo para ECEA.

Quadro 1: Enteropatógenos diagnosticados na plataforma de PCR em tempo real no *TaqMan Array Card* no estudo MAL-ED.

	Patógeno	Gene alvo
Vírus	Adenovírus 40/41	Fiber gene
	Astrovírus	Capsid
	Norovírus GI/GII	GI ORF1-2 e GII ORF1-2
	Rotavirus	NSP3
	Sapovirus	<i>RdRp</i>
Bactéria	ECEA	<i>aaIC, aatA, aggR</i>
	EPEC atípica	<i>eae</i>
	EPEC típica	<i>bfpA</i>
	ETEC	<i>LT, STh e STp</i>
	STEC	<i>stx1, stx2</i>
	<i>Aeromonas</i>	Aerolysin
	<i>Campylobacter spp.</i>	<i>adF (C. jejuni/coli)</i> <i>cpn60 (Campylobacter spp)</i>
	<i>Helicopacter pylori</i>	<i>ureC</i>
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>gyrB</i>
	<i>Salmonella</i>	<i>ttr</i>
	<i>Shigella/EIEC</i>	<i>ipaH</i>
	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>hlyA</i>
Fungos	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	<i>ITS</i>
	<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	SSU rRNA
Protozoário	<i>Cryptosporidium</i>	18S rRNA
	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	18S rRNA
	<i>Cystoisospora bell</i>	18S rRNA
	<i>Entamoeba histolytica</i>	18S rRNA
	<i>Giardia</i>	18S rRNA
Helmintos	<i>Ancylostoma duodenale</i>	<i>ITS2</i>
	<i>Ascaris lumbricoides</i>	<i>ITS1</i>
	<i>Necator americanus</i>	<i>ITS2</i>
	<i>Strongyloides stercoralis</i>	<i>Dispersed repetitive sequence</i>
	<i>Trichuris trichiura</i>	18S rRNA
Controles	MS2	<i>MS2g1</i>
	PhHV	<i>gB</i>

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica; ECEA: *Escherichia coli* enteroagregativa; ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica; EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva; STEC: *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga.

Fonte: Adaptado de Platts-Mills *et al.*, 2018.

3.3.2 Status socioeconômico, educação materna, insegurança alimentar.

No momento do recrutamento ao estudo, a data de nascimento, sexo e peso de nascimento de cada criança (se disponível) foram registrados. Questionários foram desenvolvidos para coletar informações sobre antropometria da criança, cuidados com a criança, características da mãe ou cuidador, família, pessoas que geralmente dormem em casa, além de informações sobre fatores socioeconômicos, dados demográficos, sanitários e outros parâmetros relacionados. No **Quadro 2** descrição das variáveis utilizadas neste estudo.

Quadro 2. Variáveis socioeconômicas, educação materna, insegurança alimentar avaliada contra grupos de crianças com infecções subclínicas de *Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA) com e sem outros patógenos entéricos.

Categoria	Conceito para capturar	Variável definida
Identificação e características infantis	Identificação infantil e local de estudo	<p>Identificação infantil = adoção de código para cada criança</p> <p>Local do estudo = adoção de código para categorização de cada país investigado.</p>
	Característica infantil	<p>Sexo da criança = categorizado em feminino ou masculino</p> <p>Peso ao nascer = variável categórica em dois níveis: < que 2.500 g “e” >que 2.500 g</p> <p>Peso ao nascer = variável quantitativa com o peso do nascimento relatado em (kg).</p>
	Água / saneamento, bens domésticos, educação materna e renda familiar	<p>Ativos/bens* = soma de 8 pontuações de ativos que correspondem aos bens domésticos adquiridos pela família, sendo eles: colchão, cadeira, mesa, televisão, geladeira, conta bancária, cozinha, <2 pessoas por cômodo. As respostas positivas para cada um deles obtêm uma pontuação de 1, enquanto as respostas negativas obtêm 0 (total: 0-8).</p> <p>Renda familiar = renda declarada multiplicada pela taxa de câmbio de US \$ (dólares).</p> <p>Escolaridade da mãe = variável categórica, sendo: < que 6 anos de escolaridade da mãe e > que 6 anos de escolaridade.</p>

Status Socioeconômico, educação materna, insegurança alimentar.		<p>Escolaridade da mãe = variável quantitativa em anos de escolaridade atingidos pela mãe.</p> <p>Fonte de água potável** = refere-se a principal fonte de água utilizada pelos membros da família, sendo: 0 = inadequado; 4 = adequado.</p> <p>Saneamento** = refere-se às condições sanitárias da família, sendo: 0 = inadequado; 4 = adequado.</p>
	Índice WAMI (Água / saneamento, bens domésticos, educação materna e renda familiar)***	<p>Água / Saneamento**: definidas pelo acesso a água e saneamento melhorados, onde cada variável recebe pontuações 0 ou 4, sendo: as famílias com acesso a água melhorada ou saneamento melhorado recebem pontuação 4 para cada. As famílias sem acesso a água potável ou saneamento básico recebem uma pontuação de 0 para cada. Ao final, essas pontuações são somadas (0-8).</p>
		<p>Ativos/bens*: Oito ativos prioritários foram selecionados, para cada ativo, as famílias receberam 1 caso o tivessem e 0 se não o tivessem. Essas pontuações foram somadas (total: 0-8).</p>
		<p>Educação Materna: A mãe de cada criança forneceu o número de anos de escolaridade que ela completou, variando de 0 a 16 anos. Este número foi dividido por 2 (total: 0-8).</p>
	<p>Renda: A renda familiar mensal foi convertida em dólares americanos usando a taxa de câmbio de janeiro de 2010. A renda foi dividida em categorias usando as seguintes pontuações e pontos de corte: 1 (0-26), 2 (26,01-47), 3 (47,01-72), 4 (72,01-106), 5 (106,01-135), 6 (135,01-200), 7 (200,01-293), 8 (293+) (total: 0-8).</p>	
	<p>Total: As pontuações em água e saneamento, bens, educação da mãe e renda foram somadas e divididas por 32 (total: 0-1).</p>	
Insegurança alimentar****	<p>Insegurança alimentar**** = Categoria da escala de acesso à insegurança alimentar doméstica, sendo: 1 = nenhuma instabilidade, 4 = alguma instabilidade.</p>	

*Adaptado a partir dos inquéritos dos *Demographic and Health Surveys* (DHS) (RUTSTEIN; JOHNSON, 2004).

**Baseado nas definições da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2008).

***Índice *Water, Assets, Maternal education and household Income* (WAMI), validado por Psaki et al. (2014).

****Estabelecido com base em Coates, Swindale, Bilinsky (2007) – FANTA.

3.3.3 Vigilância: variáveis clínicas (relacionados com a doença) e amamentação.

Durante as visitas domiciliares realizadas duas vezes por semana por equipe de campo treinada, os cuidadores responderam a um questionário padronizado desenvolvido para coletar um registro diário para coletar informações gerais sobre saúde infantil (sintomas de tosse, febre, vômito, diarreia entre outros) e ingestão alimentar básica (aleitamento materno) e uso de medicamentos conforme demonstrado abaixo (**Quadro 3**).

Quadro 3. Vigilância: variáveis clínicas e amamentação avaliada contra grupos de crianças com infecções subclínicas de *Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA) com e sem outros patógenos entéricos.

Categoria	Conceito para capturar	Variável definida
Variáveis de vigilância	Morbidades e aleitamento	<p>IRPA = soma dos dias com Infecção Respiratória Pulmonar Aguda (IRPA) diagnosticada por profissional médico no período de 0-6 meses.</p> <p>Antibióticos = Relato materno de uso de antibióticos pela criança no período de 0-6 meses, sendo: 1 = sim, 0 = não.</p> <p>Aleitamento materno = dias com qualquer tipo de aleitamento.</p> <p>Desidratação = gravidade máxima de desidratação durante o episódio de diarreia (1 = alguma desidratação, 2 = desidratação grave)</p> <p>Diarreia = Variável binária que indica se a criança teve diarreia no período de 0-6 meses definida pelo estudo ou não, sendo: 1 se > 2 fezes soltas nas 24hs ou presença de sangue nas fezes (disenteria).</p> <p>Febre = variável definida com base nos relatos durante episódio da doença no decorrer do 0-6 meses. A febre foi caracterizada como 0 se a temperatura máxima relatada durante o episódio foi <37,5, 1 se a temperatura fosse > 37,5 (definição de febre AIDPI)</p> <p>Dias = total de dias de observação.</p>

		<p><u>Para estudo foram considerados:</u></p> <p>% de dias com doença respiratória inferior = Porcentagem de dias em relação ao episódio com IRPA considerando o período de 0-6 meses.</p> <p>% de dias de antibiótico = Porcentagem de dias em relação ao episódio com uso de antibiótico relatado nos considerando o período de 0-6 meses.</p> <p>% de dias com aleitamento = Porcentagem de dias que a criança esteve em aleitamento materno considerando o período de 0-6 meses.</p> <p>% de dias com desidratação = Porcentagem de dias em relação ao episódio com desidratação considerando o período de 0-6 meses.</p> <p>% de dias com diarreia = Porcentagem de dias em relação ao episódio com diarreia considerando o período de 0-6 meses.</p> <p>% de dias com febre = Porcentagem de dias em relação ao episódio que a criança esteve com febre considerando o período de 0-6 meses.</p>
--	--	---

3.3.4 Variáveis antropométricas

As medidas antropométricas foram coletadas mensalmente em todas as crianças do estudo através de procedimentos padronizados (**Quadro 3**). O protocolo do estudo usou uma prancha de medição de comprimento inclinada padrão (*Schorr Productions, Olney, MD*) para medir o comprimento mensal de todas as crianças inscritas com aproximação de 0,1 cm. Balanças digitais também foram usadas mensalmente para medir o peso com aproximação de 100 g. Os escores *z* de peso para idade (WAZ), comprimento para idade (LAZ) e peso para comprimento (WLZ) foram calculados usando o Estudo de Referência de Crescimento Multi-País da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006). Dados antropométricos do Paquistão foram excluídos devido a preocupações com a qualidade da medição.

Quadro 4. Variáveis antropométricas avaliada contra grupos de crianças com infecções subclínicas de *Escherichia coli enteroagregativa* (ECEA) com e sem outros patógenos entéricos.

Categoria	Conceito para capturar	Variável definida
Parâmetros antropométricos	Avaliação de crescimento	<p>Delta LAZ: escore delta do comprimento para idade considerando o período de 0-6 meses.</p> <p>Delta WAZ: escore delta peso para idade considerando o período de 0-6 meses.</p> <p>Delta WHZ: escore delta do comprimento para peso considerando o período de 0-6 meses.</p>

3.3.5 Variáveis laboratoriais: barreira funcional gastrointestinal, biomarcadores imunológicos e inflamatórios.

3.3.5.1 Procedimento para coleta de amostras

Amostras de fezes foram coletadas pela vigilância ativa em visitas domiciliares duas vezes por semana, durante episódios diarreicos (definidos como ≥ 3 fezes soltas em um período de 24 horas e separadas por ≥ 2 dias sem diarreia) e durante visitas domiciliares mensais (amostras não diarreicas). Para esta pesquisa, utilizaram-se espécimes não diarreicos que foram coletados durante a vigilância entre 1 a 6 meses de idade. Amostras urinárias também foram coletadas pela equipe durante o período de investigação para a realização de testes relacionados à função de barreira intestinal a ser descrito a seguir.

3.3.5.2 Amostra de urina para avaliação da barreira gastrointestinal - teste de lactulose/manitol

O teste lactulose/manitol foi usado para avaliar permeabilidade intestinal e a capacidade de absorção, respectivamente, e foi administrado em crianças aos 3 e 6 meses através de protocolo padronizado, onde a média dessas 2 medições foi usada para a análise. Sobre o protocolo, as crianças foram mantidas em jejum por 2 h antes e 30 min após a administração da solução de açúcares, com exceção do leite materno, que foi permitido. Cabe ressaltar que, assim como ocorre com os

medicamentos orais, vitaminas ou probióticos para cólicas, isso não é considerado uma violação da prática do aleitamento materno exclusivo pelos profissionais de saúde.

Um volume da solução de Lactulose/Manitol foi oferecido à criança por via oral na seguinte proporção: 250 mg/mL de lactulose, 50 mg/mL de manitol e osmolaridade de 1002 mOsm/L; numa dose de 2 mL/kg a uma dose máxima administrada de 20 mL. A urina da criança foi coletada continuamente por 5 h após a administração da solução e o volume total urinário foi registrado. Após a coleta e mensuração da urina, adicionou-se 1-2 gotas de clorexidina (2,35%), em seguida as amostras foram armazenadas no gelo para limitar o crescimento bacteriano. As alíquotas de urina foram armazenadas a -70°C antes do teste (KOSEK et al., 2013).

Para mensurar as concentrações de lactulose e manitol, foi utilizada duas técnicas a depender dos países. Cinco locais (Brasil, Nepal, Paquistão, Tanzânia e África do Sul) usaram o sistema de HPLC no laboratório do Brasil; o Peru usou um sistema comercialmente disponível de cromatografia líquida / espectrometria de massa (LC-MSMS) (*Oregon Analytix Eugene, OR*); e dois locais (Bangladesh e Índia) usaram seus próprios sistemas de HPLC para medir as concentrações urinárias de lactulose e manitol, expresso como uma razão molar de lactulose para manitol presente na urina. Em todo o processo utilizou-se protocolos padronizados e atividades de controle de qualidade (LEE et al., 2014). Dados utilizados nesse estudo foram relatados no **Quadro 5**.

3.3.5.3 Amostra fecal (*alfa-1-antitripsina, mieloperoxidase, neopterin*)

Através de um protocolo padronizado e ferramentas de coleta de dados específicos, três biomarcadores adicionais também foram medidos mensalmente em fezes não diarréicas entre 0 e 6 meses de idade e a média dessas medidas foi usada para esta análise para avaliar enteropatia ambiental, que incluíram: alfa-1-antitripsina (AAT), mieloperoxidase (MPO) e neopterin (NEO), conforme demonstrado no **Quadro 5**. As amostras de fezes foram coletadas em um recipiente estéril, divididas em alíquotas e armazenadas em criotubos a -20 ° C até a análise. As amostras foram avaliadas utilizando kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) para AAT (*Biovendor, Candler, North Carolina*), MPO (*Alpaco Salem, New Hampshire*) e

NEO (*GenWay Biotech, San Diego, CA*), conforme descrição do fabricante (KOSEK *et al.*, 2013; MALED, 2014).

Quadro 5. Variáveis laboratoriais para avaliar integridade da barreira intestinal, biomarcadores imunológicos e inflamatórios entre os grupos de crianças com infecções subclínicas de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) com e sem outros patógenos entéricos.

Categoria	Conceito para capturar	Variável definida
Biomarcadores	Biomarcadores para respostas imuno-inflamatórias e função intestinal	<p>Escore Z da % de manitol: escores z ajustados das porcentagens de excreção de manitol na urina (%M) baseado na média das duas medições realizadas no estudo (3 e 6 meses).</p> <p>Escore Z da % de lactulose: escores z ajustados das porcentagens de excreção de lactulose na urina (%L) baseado na média das duas medições realizadas no estudo (3 e 6 meses).</p> <p>Escore Z da Lactulose/Manitol: escores z ajustados das porcentagens de excreção na urina a partir da relação lactulose e manitol (proporção), baseado na média das duas medições realizadas no estudo (3 e 6 meses).</p> <p>Mediana de AAT: concentrações de alfa-1-antitripsina obtidas pela média das medições coletadas em amostras mensais não diarreicas (0-6 meses)</p> <p>Mediana de MPO: concentrações de mieloperoxidase obtidas pela média das medições coletadas em amostras mensais não diarreicas (0-6 meses)</p> <p>Mediana de NEO: concentrações neopterinina obtidas pela média das medições coletadas em amostras mensais não diarreicas (0-6 meses)</p>

3.4 Análise estatística dos dados

Um *TaqMan Array Card* personalizado (*Thermo Fisher, Carlsblad, CA, EUA*) compartimentalizou os ensaios de qPCR baseados em sonda para 29 enteropatógenos. Para identificação da EAEC, foram considerados no estudo os genes *aaiC* ou *aatA*, sendo o impacto da infecção EAEC sozinha e em combinação com qualquer outra coinfeção de patógeno entérico avaliados através de PCR quantitativo organizados em 7 grupos da coorte da seguinte forma: crianças sem detecção de patógenos em todas as amostras de fezes coletadas; crianças com presença apenas de EAEC em qualquer das amostras de fezes coletadas; crianças com EAEC e apenas 1 outro patógeno; crianças com EAEC e 2 outros patógenos; crianças com EAEC e 3 ou mais outros patógenos; crianças com 1 ou 2 patógenos diferentes de EAEC; e crianças com 3 ou mais patógenos diferentes de EAEC.

As principais variáveis de resultado foram delta Z: WAZ, WLZ, LAZ 0-6 meses. As variáveis de desfecho secundário incluíram: a função da barreira intestinal, inflamação e associação de marcador de resposta imune inata nos grupos de estudo, obtida pela média das medições nos primeiros 6 meses de vida da criança.

Para análise das variáveis categóricas, foi utilizado o teste do qui-quadrado ou exato de Fisher, sendo utilizada análise de resíduos, onde, aqueles que apresentaram valores de resíduos acima de 3 foram identificados entre os grupos investigados. Os testes *ANOVA* ou *Kruskal-Wallis* foram usados para comparar variáveis contínuas entre esses grupos, com análise *POST-HOC* e correção de *Bonferroni*.

Os coeficientes de correlação de *Pearson* também foram determinados para analisar correlações entre as concentrações dos diferentes biomarcadores investigados no estudo.

O impacto nos escores de crescimento da criança nos primeiros 6 meses de vida foram analisados através da regressão linear múltipla, onde as diferenças nas pontuações do delta escore WAZ, WLZ e LAZ entre a inscrição e 6 meses foram analisadas contra a exposição EAEC com e sem outros patógenos entéricos, ajustadas para sexo, local, peso e comprimento na inscrição, Índice WAMI (água / saneamento, bens, escolaridade materna e renda), proporção de dias de

amamentação, sintomas de infecção respiratória inferior aguda, uso de antibióticos e grupos com e sem EAEC e coinfeções para estimativa geral.

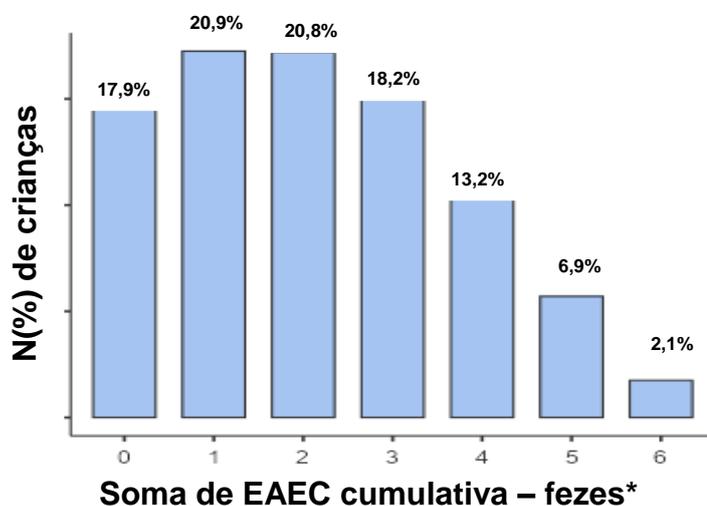
A análise estatística para fatores determinantes foi realizada através do *software SPSS Statistics 20.0* e regressão linear múltipla e gráficos usando *The jamovi project (2021). jamovi. (Version 1.8) [Computer Software]*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Características gerais da população de estudo e grupos de crianças com ECEA e coinfeções.

De 2.145 crianças inscritas na coorte, 1.659 tiveram acompanhamento completo com vigilância ativa de 90% (monitoramento ativo e contínuo dos dados de saúde) até os 6 meses de idade. Ao longo desse período, todas as amostras de fezes coletadas dos participantes nos diferentes locais de estudo foram avaliadas quanto à presença de genes portadores de cepas associados com ECEA e coinfeções usando *TaqMan Array Cards* (TAC). A distribuição das crianças do estudo a partir da proporção de ECEA identificada com base na detecção cumulativa em fezes mensais - não diarreicas, são apresentadas na **Figura 6** abaixo.

Figura 6 - Distribuição das crianças do estudo a partir da proporção de ECEA identificada com base na detecção cumulativa em fezes mensais (não diarreicas) (n=1.659).



A coluna representa a proporção de crianças do estudo que apresentou ECEA em alguma das coletas de fezes realizadas mensalmente (nos 6 primeiros meses do estudo).

*Soma de ECEA cumulativa – fezes: contagem de ECEA detectada nas amostras de fezes coletadas no período (0: proporção de crianças sem EAEC nas fezes coletas; 1: proporção de crianças com ECEA detectada em 1 amostra coletada no período; 2: proporção de crianças com ECEA detectada em 2 amostras coletadas no período; 3: proporção de crianças com ECEA detectada em 3 amostras coletadas no período; 4: proporção de crianças com ECEA detectada em 4 amostras coletadas no período; 5: proporção de crianças com ECEA detectada em 5 amostras coletadas no período; 6: proporção de crianças com ECEA detectada em 6 amostras coletadas).

Tabela 1 – Variáveis categóricas determinantes associadas à presença de *Escherichia coli* enteroagregativa de fezes não diarreicas ao longo de 0 a 6 meses de idade.

		1 ou 2 Patógenos sem ECEA	3 ou mais Patógenos sem ECEA	ECEA_P0	ECEA_P1	ECEA_P2	ECEA_P3	Sem patógenos detectados	p
Local n (%)	BG	3 (3.3%) _a	23 (14.6%) _a	0 (0%) _a	5 (7.2%) _a	7 (7%) _a	167 (14.4%) _a	0 (0%) _a	<0,001*
	BR	28 (30.8%) _{a, b}	27 (17.1%) _b	8 (25.8%) _{a, b}	12 (17.4%) _{a, b}	16 (16%) _b	53 (4.6%) _c	21 (40.4%) _a	
	IN	4 (4.4%) _a	5 (3.2%) _a	1 (3.2%) _{a, b}	6 (8.7%) _{a, b}	5 (5%) _a	205 (17.7%) _b	0 (0%) _a	
	NP	32 (35.2%) _a	31 (19.6%) _a	9 (29%) _a	15 (21.7%) _a	21 (21%) _a	104 (9%) _b	15 (28.8%) _a	
	PE	2 (2.2%) _a	18 (11.4%) _a	3 (9.7%) _a	4 (5.8%) _a	13 (13%) _a	144 (12.4%) _a	3 (5.8%) _a	
	PK	8 (8.8%) _a	24 (15.2%) _a	6 (19.4%) _a	13 (18.8%) _a	11 (11%) _a	158 (13.6%) _a	7 (13.5%) _a	
	SA	14 (15.4%) _{a, b}	27 (17.1%) _{a, b}	4 (12.9%) _{a, b}	11 (15.9%) _{a, b}	23 (23%) _b	135 (11.7%) _a	5 (9.6%) _{a, b}	
	TZ	0 (0%) _{a, c}	3 (1.9%) _{a, c}	0 (0%) _{a, b, c}	3 (4.3%) _{a, b, c}	4 (4%) _c	192 (16.6%) _b	1 (1.9%) _{a, b, c}	
	Total n (%)	91 (100%)	158 (100%)	31 (100%)	69 (100%)	100 (100%)	1158 (100%)	52 (100%)	
Sexo n (%)	(masc.)	46 (50.5%) _a	84 (53.2%) _a	11 (35.5%) _a	39 (56.5%) _a	53 (53%) _a	591 (51%) _a	24 (46.2%) _a	0,573
	Total n (%)	91 (100%)	158 (100%)	31 (100%)	69 (100%)	100 (100%)	1158 (100%)	52 (100%)	
Peso ao nascer <2500g n (%)	(sim)	9 (10.7%) _a	15 (10.9%) _a	2 (7.4%) _a	6 (10.9%) _a	8 (9.2%) _a	103 (11%) _a	2 (4.4%) _a	0,873
	Total n (%)	84 (100%)	138 (100%)	27 (100%)	55 (100%)	87 (100%)	935 (100%)	45 (100%)	
Escolaridade da mãe <6 anos n (%)	(sim)	22 (25%) _a	58 (38.9%) _a	9 (32.1%) _a	21 (33.3%) _a	24 (26.4%) _a	440 (39.6%) _b	12 (24%) _a	0,007*
	Total n (%)	88 (100%)	149 (100%)	28 (100%)	63 (100%)	91 (100%)	1110 (100%)	50 (24%)	
Fonte de água potável n (%)	(inadequada)	2 (2.3%) _a	5 (3.4%) _a	1 (3.6%) _{a, b}	4 (6.3%) _{a, b}	5 (5.5%) _{a, b}	150 (13.5%) _b	1 (2%) _{a, b}	<0,001*
	Total n (%)	88 (100%)	149 (100%)	28 (100%)	63 (100%)	91 (100%)	1111 (100%)	50 (100%)	
Saneamento n (%)	(inadequado)	5 (5.7%) _a	26 (17.4%) _a	4 (14.3%) _{a, b}	12 (19%) _a	18 (19.8%) _a	426 (38.3%) _b	5 (10%) _a	<0,001*
	Total n (%)	88 (100%)	149 (100%)	28 (100%)	63 (100%)	91 (100%)	1112 (100%)	50 (100%)	
Insegurança alimentar n (%)	(alguma)	39 (51.3%) _{a, b}	80 (56.7%) _a	16 (61.5%) _{a, b}	32 (50%) _{a, b}	46 (53.5%) _{a, b}	455 (42.4%) _b	30 (62.5%) _{a, b}	0,001*
	Total n (%)	76 (100%)	141 (100%)	26 (100%)	64 (100%)	86 (100%)	1074 (100%)	48 (100%)	

*Teste qui-quadrado ou exato de Fisher.

Cada letra subscrita denota um subconjunto de grupos de categorias de crianças cujas proporções de coluna não diferem significativamente umas das outras no nível 0,05.

Escherichia coli enteroagregativas (EAEC) com nenhum (P0), 1 (P1), 2 (P2) e 3 (P3) ou mais quaisquer outros patógenos.

4.2 Associação de potenciais determinantes de risco com infecção subclínica por *Escherichia coli* enteroagregativa, isoladamente ou em combinação com outros patógenos.

A **Tabela 1** resume as variáveis de risco categóricas associadas a infecções subclínicas de ECEA de fezes não diarreicas durante os primeiros 6 meses de idade. Com relação ao local de estudo, uma diferença significativa esteve presente entre os grupos ($p < 0,001$). Quanto ao sexo e peso ao nascer $< 2.500\text{g}$, não houve diferenças entre os grupos testados. Mães com < 6 anos de escolaridade, saneamento e fontes de água potável inadequada e que apresentavam alguma insegurança alimentar foram significativamente mais frequentes em crianças com infecções subclínicas de ECEA com ≥ 3 outros patógenos em comparação com todos os outros grupos de crianças ($p = 0,007$; $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p = 0,001$, respectivamente).

A **Tabela 2** mostra as variáveis de risco quantitativas associadas a infecções subclínicas de ECEA de fezes não diarreicas durante os primeiros 6 meses de idade. O peso ao nascer não diferiu entre os grupos investigados. Uma menor renda mensal foi constatada no grupo ECEA e 3 ou mais patógenos com diferenças significativas quando comparada com todos os demais grupos ($p < 0,01$), seguida por ECEA com mais 1 outro patógeno e 3 ou mais patógenos sem ECEA contra o grupo sem patógeno detectado patógenos ($p < 0,05$). A variável anos de escolaridade das mães foi menor no grupo ECEA com ≥ 3 outros patógenos com diferença significativa em comparação com os grupos: nenhum patógeno, ECEA e 2 outros patógenos e 1 ou 2 patógenos diferentes de ECEA patógenos ($p < 0,05$). O Status socioeconômico medido por meio da pontuação de 8 ativos/bens obteve menores escores no grupo ECEA combinada com 3 ou mais co-patógenos contra todos os grupos de crianças ($p < 0,05$). Achados semelhantes também pode ser observado no índice wami (água / saneamento, bens domésticos, educação materna e renda familiar). Ainda sobre o índice WAMI, proporções reduzidas no grupo 3 ou mais patógenos na ausência de ECEA contra o grupo sem patógenos também foram detectadas ($p < 0,05$).

A proporção de dias de uso de antibióticos foi significativamente maior no grupo de crianças com infecção subclínica com ECEA e 3 ou mais patógenos do que nos grupos sem patógenos, 1 ou 2 patógenos sem ECEA; ECEA e 2 outros patógenos ($p < 0,01$, $p < 0,001$, $p < 0,05$). A proporção de dias com infecção respiratória

aguda, amamentação, diarreia e febre não se diferiu entre os grupos investigados. Apenas uma tendência a uma maior proporção de dias com desidratação esteve associada ao grupo de crianças com ECEA com 2 outros co-patógenos ($p < 0,064$), conforme mostrado na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Variáveis quantitativas determinantes associadas à presença de *Escherichia coli* enteroagregativa de fezes não diarreicas ao longo de 0 a 6 meses de idade.

	1 ou 2 Patógenos sem ECEA	3 ou mais patógenos sem ECEA	ECEA_P0	ECEA_P1	ECEA_P2	ECEA_P3	Sem patógenos detectados	p
Peso ao nascer (kg)								
Mediana	3.01	3.1	3	3.15	3.03	3	3.2	0,329
(P25 - P75)	(2.8 - 3.42)	(2.7 - 3.4)	(2.8 - 3.25)	(2.8 - 3.4)	(2.8 - 3.46)	(2.72 - 3.3)	(2.8 - 3.5)	
Ativos/bens (soma dos escores de 8 ativos)								
Mediana	6	5	6	5	6	4*	7	<0,001
(P25 - P75)	(5 - 7)	(3 - 7)	(4 - 7)	(4 - 7)	(4 - 7)	(2 - 6)	(5 - 8)	
Renda mensal (US\$)								
Mediana	193.6	148.38	194.05	147	154.66	103.27*	325.05***	<0,001
(P25 - P75)	(94.15 - 339.95)	(92.4 - 287.63)	(110.8 - 309.88)	(77 - 290)	(100 - 315)	(54.59 - 172.5)	(176.8 - 395.36)	
Anos de escolaridade da mãe								
Mediana	9	8	9	7	9	7 ^o	9	<0,001
(P25 - P75)	(5.5 - 12)	(4 - 11)	(5 - 12)	(4 - 11)	(5 - 11)	(3 - 9)	(6 - 10)	
Índice WAMI								
Mediana	0.74	0.64 [‡]	0.77	0.63	0.7	0.5*	0.82	<0,001
(P25 - P75)	(0.6 - 0.86)	(0.5 - 0.8)	(0.56 - 0.83)	(0.55 - 0.77)	(0.5 - 0.84)	(0.34 - 0.67)	(0.63 - 0.88)	
% de dias com doença respiratória inferior								
Mediana	3.33	1.36	0	0.81	2.16	0.54	0	0,675
(P25 - P75)	(0 - 4.32)	(0 - 2.99)	(0 - 0)	(0.27 - 1.63)	(0 - 3.26)	(0 - 3.32)	(0 - 0)	
% de dias com antibiótico								
Mediana	0	2.75	2.73	3.01	1.09	4.08**	0	<0,001
(P25 - P75)	(0 - 5.41)	(0 - 10.33)	(0 - 8.24)	(0 - 16.94)	(0 - 7.44)	(0 - 10.73)	(0 - 4.19)	

Testes Anova ou Kruskal-Wallis com análise POST-HOC e correção de Bonferroni.

Escherichia coli enteroagregativa (ECEA) sem nenhum (P0), 1 (P1), 2 (P2) e 3 (P3) ou mais quaisquer outros patógenos.

Ativos/bens (soma de 8 pontuações; possui colchões, cadeira, mesa, TV, geladeira, conta bancária, cozinha, <2 pessoas por cômodo)

WAMI (soma das seguintes variáveis: água/saneamento, bens, escolaridade materna e renda; divisão do total por 32)

*ECEA_P3 versus todos os outros grupos (p<0,05).

** ECEA e 3 ou mais patógenos versus grupos sem patógenos, 1 ou 2 patógenos sem ECEA; ECEA e 2 outros patógenos (p<0,05);

***ECEA_P1 e 3 ou mais patógenos sem ECEA versus nenhum patógeno (p<0,05).

^oECEA_P3 versus nenhum patógeno, EAEC_P2, 1 ou 2 patógenos detectados (p<0,05).

[‡]grupo 3 ou mais patógenos na ausência de ECEA versus grupo sem patógenos (p<0,05).

Tabela 2 – Variáveis quantitativas determinantes associadas à presença de *Escherichia coli* enteroagregativa de fezes não diarreicas ao longo de 0 a 6 meses de idade (continuação).

	1 ou 2 Patógenos sem ECEA	3 ou mais patógenos sem ECEA	ECEA_P0	ECEA_P1	ECEA_P2	ECEA_P3	Sem patógenos detectados	p
% de dias com aleitamento								
Mediana (P25 – P75)	98.36 (94.59 - 99.46)	97.83 (94.59 - 98.9)	98.29 (94.02 - 99.39)	97.84 (95.11 - 98.91)	98.37 (95.64 - 99.45)	98.27 (96.55 - 98.88)	98.82 (95.11 - 100)	0,148
% de dias com desidratação								
Mediana (P25 – P75)	8.24 (3.26 - 22.16)	9.24 (4.89 - 20.22)	9.84 (3.55 - 39.72)	8.11 (1.09 - 9.19)	11.64 (2.22 - 16.94)	4.37 (2.17 - 8.65)	11.54 (5.95 - 27.57)	0,062
% de dias com diarreia								
Mediana (P25 – P75)	0 (0 - 7.07)	1.1 (0 - 4.95)	0.57 (0 - 7.69)	1.15 (0 - 6.56)	0.83 (0 - 7.38)	1.14 (0 - 4.86)	1.7 (0 - 5.43)	0,996
% de dias com febre								
Mediana (P25 – P75)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,157

Testes Anova ou Kruskal-Wallis com análise POST-HOC e correção de Bonferroni.

Escherichia coli enteroagregativa (ECEA) sem nenhum (P0), 1 (P1), 2 (P2) e 3 (P3) ou mais quaisquer outros patógenos.

Ativos/bens (soma de 8 pontuações; possui colchões, cadeira, mesa, TV, geladeira, conta bancária, cozinha, <2 pessoas por cômodo)

WAMI (soma das seguintes variáveis: água/saneamento, bens, escolaridade materna e renda; divisão do total por 32)

*ECEA_P3 versus todos os outros grupos ($p < 0,05$).

** ECEA e 3 ou mais patógenos versus grupos sem patógenos, 1 ou 2 patógenos sem ECEA; ECEA e 2 outros patógenos ($p < 0,05$);

***ECEA_P1 e 3 ou mais patógenos sem ECEA versus nenhum patógeno ($p < 0,05$).

◊ECEA_P3 versus nenhum patógeno, ECEA_P2, 1 ou 2 patógenos detectados ($p < 0,05$).

◊grupo 3 ou mais patógenos na ausência de ECEA versus grupo sem patógenos ($p < 0,05$).

4.3 Marcadores da barreira funcional gastrointestinal e respostas imunoinflamatórias

Marcadores para avaliação da integridade da barreira gastrointestinal foram investigados, onde a medida pela relação lactulose/manitol foi alterada ($p=0,043$). Essa resposta provavelmente foi impulsionada pelos escores z ajustados das porcentagens de lactulose excretado na urina nos respectivos grupos, sendo significativamente maior entre o grupo 3 ou mais patógenos com ECEA quando comparado com o grupo 1 e 2 patógenos na ausência de ECEA ($p=0,022$). Os escores z ajustados das porcentagens de manitol não diferiram entre os grupos de crianças (**Tabela 3**).

As concentrações de MPO nas fezes foram significativamente maiores na infecção subclínica de ECEA com ≥ 3 outros grupos de patógenos do que nos grupos 3 ou mais patógenos sem ECEA ($p<0,001$) e sem patógenos detectados ($p=0,013$). Os marcadores de alfa-1 antitripsina e neopterinina nas fezes não apresentaram diferenças quando seus valores foram comparados entre todos os grupos investigados conforme demonstrado na **Tabela 3**.

Tabela 3- Biomarcadores associados a nenhum patógeno ou com *Escherichia coli* enteroagregativa e coinfeções com outros agentes patogênicos.

	1 ou 2 Patógenos sem ECEA	3 ou mais patógenos sem ECEA	ECEA_P0	ECEA_P1	ECEA_P2	ECEA_P3	Sem patógenos detectados	p
Z escore % lactulose								
Mediana (P25 – P75)	0.71 (0.18 - 1.23)	0.91 (0.4 - 1.62)	0.51 (0.1 - 1.34)	0.88 (0.36 - 1.56)	0.92 (0.21 - 1.56)	0.98* (0.27 - 1.69)	0.67 (-0.05 - 1.12)	0,022
Z escore % manitol								
Mediana (P25 – P75)	0.38 (-0.09 - 0.98)	0.4 (-0.1 - 0.96)	0.12 (-0.55 - 0.86)	0.4 (-0.06 - 0.86)	0.23 (-0.28 - 0.76)	0.44 (-0.13 - 0.98)	0.43 (-0.18 - 1.06)	0,524
Z escore lactulose/manitol razão								
Mediana (P25 – P75)	0.05* (-0.29 - 0.49)	0.3 (-0.03 - 0.62)	0.5 (-0.29 - 0.8)	0.34 (-0.25 - 0.79)	0.31 (-0.12 - 0.83)	0.25 (-0.15 - 0.67)	0.08 (-0.26 - 0.46)	0,043
Mieloperoxidase ng/mL								
Mediana (P25 – P75)	6906.51 (3613.36 -14387.87)	5789.24 (2948.16 - 11264.99)	4630.37 (3752.58 - 8697.56)	7545.12 (4174.41 - 13693.33)	6649.14 (3229.12 - 11705.15)	8646.83** (4538.1 - 15770.02)	5057.09 (2319.9 -10103.98)	<0,001
Neopterina nmol/L								
Mediana (P25 – P75)	1876.69 (1340.15 - 3070.77)	1954.13 (1108.28 - 3262.19)	1841.93 (1255.25 -3160.03)	1978.48 (1295.64 - 3690.69)	1976.04 (1231.95 - 3131.16)	1868.26 (1028.28 - 2956.05)	1588.35 (1128.89 -2900.94)	0,703
Alfa-1-antitripsina, mg/g								
Mediana (P25 – P75)	0.43 (0.25 - 0.75)	0.43 (0.27 - 0.71)	0.44 (0.26 - 0.98)	0.48 (0.23 - 0.8)	0.36 (0.22 - 0.66)	0.39 (0.24 - 0.64)	0.39 (0.26 - 0.68)	0,140

Escherichia coli enteroagregativa (ECEA) sem nenhum (P0), 1 (P1), 2 (P2) e 3 (P3) ou mais quaisquer outros patógenos.

% Lactulose, % Manitol e Lactulose: As pontuações z da proporção de manitol atribuíram valores médios ao longo de 3 e 6 meses para a faixa etária cumulativa de 0 a 6 meses.

Mieloperoxidase, neopterina e alfa-1-antitripsina atribuíram valores médios no intervalo cumulativo de 0 a 6 meses.

Testes Anova ou Kruskal-Wallis com análise POST-HOC e correção de Bonferroni.

* ECEA_P3 versus 1 e 2 patógenos na ausência de ECEA (p<0,05)

** ECEA_P3 versus 3 ou mais patógenos sem ECEA e sem patógenos detectados (p<0,05)

Análise de correlação foi utilizada entre os biomarcadores do estudo, onde as concentrações de lactulose correlacionaram-se positivamente com as concentrações de manitol ($p < 0,001$, $R = 0,601$), Razão Lactulose/Manitol ($p < 0,001$, $R = 0,271$), Neopterinina ($p = 0,011$, $R = 0,062$), Alfa-1-antitripsina ($p = 0,002$, $R = 0,075$). Concentrações da alfa-1-antitripsina também correlacionaram-se positivamente com as concentrações de manitol ($p = 0,004$, $R = 0,070$) e Mieloperoxidase ($p < 0,001$, $R = 0,188$). A relação Lactulose/Manitol correlacionou-se inversamente com as concentrações de Manitol ($p < 0,001$, $R = -0,500$) e Mieloperoxidase ($p = 0,008$, $R = -0,065$), de acordo com **Tabela 4**.

Tabela 4 – Correlação das concentrações de biomarcadores para avaliação da barreira funcional gastrointestinal e resposta imuno-inflamatória.

		Z escore da % lactulose	Z escore da % manitol	Z escore da % lactulose/ manitol	Mieloperoxidase	Neopterinina	Alfa-1- antitripsina
Z escore % lactulose	R	-					
	P	-					
Z escore % mannitol	R	0,602***	-				
	P	<0,001	-				
Z escore lactulose/manitol razão	R	0,269***	-0,501***	-			
	P	<0,001	<0,001	-			
Mieloperoxidase	R	-0,028	0,031	-0,070***	-		
	P	0,258	0,202	0,004	-		
Neopterinina	R	0,059*	0,043	0,018	-0,007	-	
	P	0,017	0,084	0,475	0,771	-	
Alfa-1-antitripsina	R	0,076**	0,069**	-0,034	0,189***	0,036	-
	P	0,002	0,005	0,174	<0,001	0,149	-

Análise de Correlação de Pearson's

* p valor <0.05

**p valor <0.01

***p valor <0.001

4.4 Associação das infecções subclínicas de ECEA isoladamente ou combinadas com qualquer outro patógeno no crescimento infantil.

As infecções subclínicas dos grupos de ECEA e coinfeções foram associados com o crescimento cumulativo medido até os 6 meses de idade. A **Tabela 5** resume as pontuações delta *escore* WHZ, WAZ e LAZ, onde o grupo de ECEA com ≥ 3 outros patógenos mostraram um delta LAZ prejudicado em comparação com os grupos: crianças com 1 e 2 patógenos sem ECEA ($p < 0,001$), ECEA apenas ($p = 0,035$) e no grupo sem patógenos ($p < 0,001$). Para o delta *escore* WAZ, uma redução significativa esteve associada entre o grupo ECEA com ≥ 3 outros patógenos quando comparado com os seguintes grupos: crianças com 1, 2 e ≥ 3 patógenos sem ECEA ($p < 0,001$; $p = 0,06$) e ECEA com 2 outros patógenos ($p < 0,001$). Menores *escores* do WHZ foram associados com o grupo ECEA e 3 ou mais co-patógenos em comparação com o grupo 1 e 2 patógenos na ausência de ECEA ($p = 0,040$) e com o grupo de ECEA e 2 outro patógenos ($p = 0,022$).

Tabela 5 – Infecções subclínicas de ECEA isoladamente ou combinadas com qualquer outro patógeno no crescimento infantil cumulativo.

	1 ou 2 Patógenos sem ECEA	3 ou mais patógenos sem ECEA	ECEA_P0	ECEA_P1	ECEA_P2	ECEA_P3	Sem patógenos detectados	p
Delta LAZ								
Median	0.27	0.12	0.29	-0.14	-0.02	-0.23*	0.26	<0,001
(P25 – P75)	(-0.43 - 0.91)	(-0.67 - 0.54)	(-0.18 - 0.75)	(-0.67 - 0.78)	(-0.64 - 0.85)	(-0.89 - 0.38)	(-0.20 - 1.20)	
Delta WAZ								
Median	0.76	0.46	0.53	0.44	0.55	0.06**	0.38	<0,001
(P25 – P75)	(-0.06 - 1.53)	(-0.22 - 1.20)	(-0.09 - 1.39)	(-0.29 - 1.29)	(-0.04 - 1.47)	(-0.59 - 0.88)	(-0.01 - 1.01)	
Delta WLZ								
Median	1.07	0.71	0.79	0.73	0.95	0.48***	0.34	0,001
(P25 – P75)	(0,04 - 1.77)	(0.04 - 1.68)	(-0.38 - 2.42)	(-0.37 - 1.66)	(-0.09 - 2.03)	(-0.35 - 1.46)	(-0.37 - 1.29)	

Escores z cumulativos (0–6 meses de acompanhamento) para peso por altura (WLZ), peso por idade (WAZ) e comprimento por idade (LAZ).

Escherichia coli enteroagregativa (ECEA) sem nenhum (P0), 1 (P1), 2 (P2) e 3 (P3) ou mais quaisquer outros patógenos.

Os dados do Paquistão foram excluídos da análise.

Testes Anova ou Kruskal-Wallis com análise POST-HOC e correção de Bonferroni.

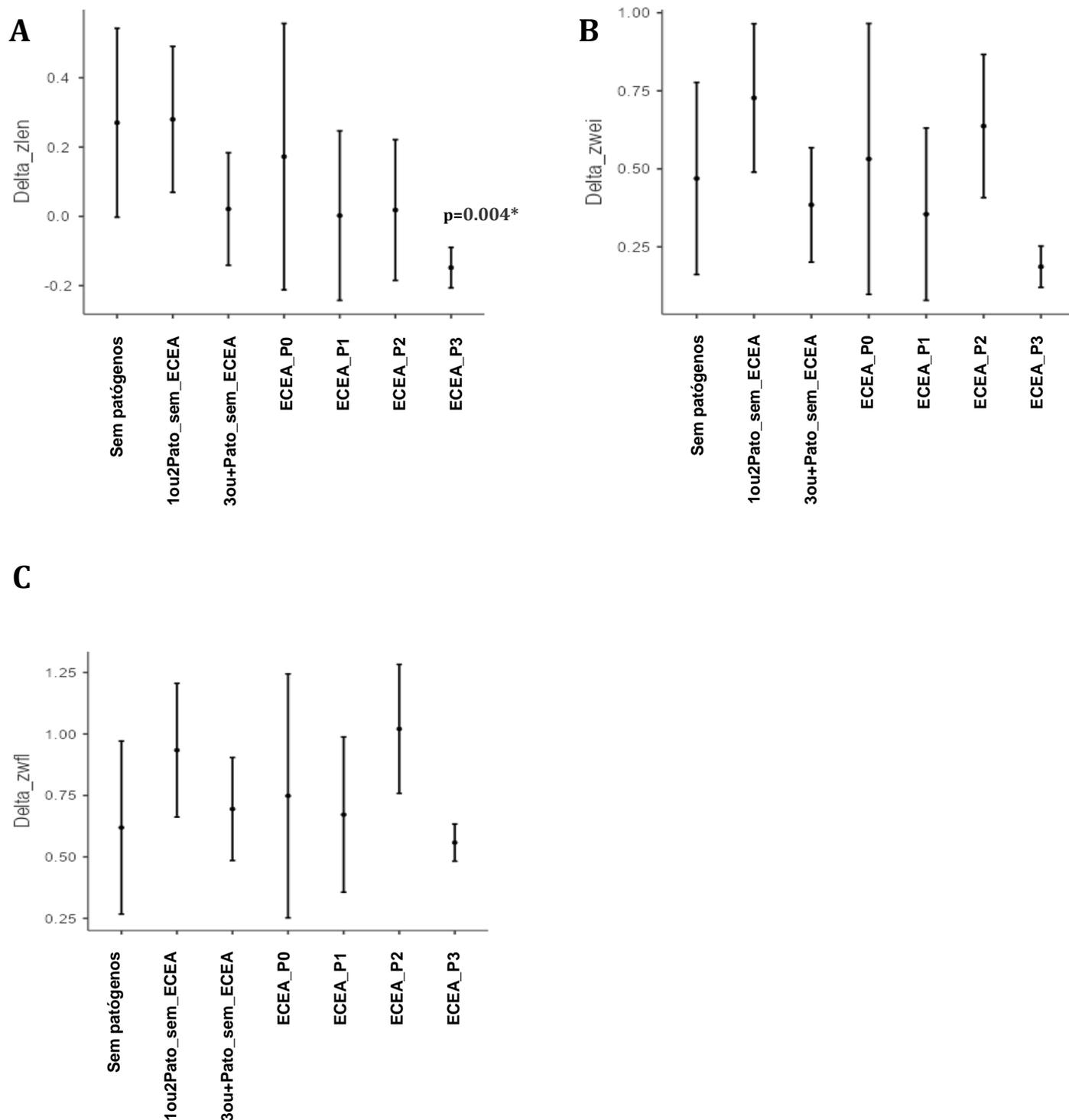
*ECEA_P3 versus nenhum patógeno, ECEA_P0, 1 ou 2 patógenos sem ECEA ($p < 0,05$)

**ECEA_P3 versus ECEA_P2, 1, 2 e 3 ou mais patógenos sem ECEA ($p < 0,05$)

***ECEA_P3 versus ECEA_P2, 1, 2 e 3 ou mais patógenos sem ECEA ($p < 0,05$)

Uma regressão linear para avaliação de múltiplos fatores foi realizada. Embora na análise não tenha sido detectado uma diferença estatística no grupo de ECEA isoladamente, ao avaliar o crescimento ao longo dos primeiros 6 meses de vida, uma diferença significativa pode ser observada no delta LAZ quando ECEA estava presente com 3 ou mais co-patogenos (redução de 0,418 do delta comprimento/idade em comparação com crianças sem patógenos, $p = 0,004$), conforme demonstrado na **Figura 7-A**. Detalhes da regressão pode ser visto na **Tabela 6**.

Figura 7 - Impacto no crescimento infantil aos 6 meses de idade através dos escores antropométricos (delta LAZ, WAZ, WHZ 0-6m) por ECEA com ou sem co-patógenos em comparação com crianças sem patógenos entéricos.



Ajustado em modelo de regressão linear para sexo, peso e comprimento na matrícula, Índice WAMI (água/saneamento, bens, escolaridade materna e renda), proporção de dias de amamentação, insegurança alimentar, uso de antibióticos e grupos com e sem ECEA, e co-infecções para estimativa geral.

Variável dependente: escores antropométricos (delta LAZ, WAZ, WLZ 0-6m);

Variáveis independentes: grupos associados à ECEA : *Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA) sem nenhum (P0), 1 (P1), 2 (P2) e 3 (P3) ou mais quaisquer outros patógenos.

Os dados do Paquistão foram excluídos da análise.

Tabela 6– Regressão linear dos escores antropométricos (delta LAZ, WAZ, WLZ 0-6m) pelos grupos de crianças investigados.

GRUPOS	ESTIMATIVAS (BETA)	ERRO PADRÃO	t	p
Delta LAZ				
1ou2Pato_sem_ECEA – No_pato	0,00970	0.17224	0,0563	0.955
3ou+Pato_sem_ECEA – No_pato	-0.24903	0.15951	-1.5612	0.119
ECEA_P0 – No_pato	-0.09796	0.23714	-0.4131	0.680
ECEA_P1 – No_pato	-0.26804	0.18490	-1.4496	0.147
ECEA_P2 – No_pato	-0.25195	0.17090	-1.4742	0.141
ECEA_P3 – No_pato	-0.41816	0.14352	-2.9136	0.004*
Delta WAZ				
1ou2Pato_sem_ECEA – No_pato	0.25809	0.19448	1.3271	0.185
3ou+Pato_sem_ECEA – No_pato	-0.08463	0.18011	-0.4699	0.639
ECEA_P0 – No_pato	0.06262	0.26777	0.2338	0.815
ECEA_P1 – No_pato	-0.11436	0.20879	-0.5477	0.584
ECEA_P2 – No_pato	0.16793	0.19298	0,8702	0.384
ECEA_P3 – No_pato	-0.28274	0.16206	-1.7447	0.081
Delta WLZ				
1ou2Pato_sem_ECEA – No_pato	0.3147	0.22234	1.4155	0.157
3ou+Pato_sem_ECEA – No_pato	0.0754	0.20591	0,3664	0.714
ECEA_P0 – No_pato	0.1289	0.30612	0.4210	0.674
ECEA_P1 – No_pato	0.0528	0.23869	0.2213	0.825
ECEA_P2 – No_pato	0.4013	0.22062	1,8191	0.069
ECEA_P3 – No_pato	-0.0611	0.18527	-0.3297	0.742

Ajustado em modelo de regressão linear para sexo, peso e comprimento na matrícula, Índice WAMI (água/saneamento, bens, escolaridade materna e renda), proporção de dias de amamentação, insegurança alimentar, uso de antibióticos e grupos com e sem ECEA, e co-infecções para estimativa geral.

Variável dependente: escores antropométricos (delta LAZ, WAZ, WLZ 0-6m);

Variáveis independentes: grupos associados à ECEA : *Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA) sem nenhum (P0), 1 (P1), 2 (P2) e 3 (P3) ou mais quaisquer outros patógenos. No_pato: sem patógenos detectados.

Os dados do Paquistão foram excluídos da análise.

5 DISCUSSÃO

A ECEA tem sido cada vez mais reconhecida como um enteropatógeno que apresenta impacto relevante na saúde infantil, reconhecido como principal patógeno bacteriano entérico em países menos desenvolvidos, principalmente entre crianças nos primeiros 2 anos de vida, com e sem diarreia evidente (FAGUNDES; AFFONSO, 2000; MONDAL et al., 2009).

Vários estudos relataram uma associação entre variáveis determinantes e infecção por ECEA (MORAIS, 1997; AKTER, 2013), no entanto, poucos estudos investigaram também a infecção subclínica (ROGAWSKI et al., 2017) e a codeteção simultaneamente (LIMA et al., 2018). Outro aspecto que continua indeterminado tem sido os mecanismos envolvidos na associação entre a ocorrência de prejuízo no crescimento linear e inflamação entérica em crianças, que também têm sido apontados como desfechos (ROGAWSKI et al., 2018; RINA et al., 2021). Cabe ressaltar que associações comparáveis entre infecção subclínica por ECEA e a co-deteção com outros enteropatógenos foi relatada apenas no estudo de Lima et al. (2018), utilizando da análise por microbiologia convencional para detecção dos genes diagnósticos.

Diante desse contexto, o presente trabalho se concentrou em investigar as variáveis associadas às coinfeções por ECEA subclínica diagnosticados através da plataforma *Taqman* para melhor compreender o impacto da ECEA sozinha e coinfeções nos escores de crescimento e disfunção entérica ambiental. Através dessa plataforma foi possível realizar análise da expressão gênica em larga escala com algumas vantagens em relação aos métodos convencionais, como: alta multiplexação, precisão e sensibilidade, automatização e padronização, quantificação absoluta, amostragem em larga escala e minimização do risco de contaminação cruzada entre amostras, contribuindo para resultados mais confiáveis.

Conforme relatado anteriormente, utilizou-se do estudo caso-controle aninhado a partir da coorte MAL-ED para investigar os grupos de ECEA e coinfeções a partir de variáveis determinantes. Com essa abordagem, os controles (excluídos) foram determinados após a identificação dos casos (ECEA e co-patógenos) detectados nas fezes não diarreicas.

Cabe ressaltar que em primeiro estudo do MAL-ED, no qual utilizou um protocolo de microbiologia padronizado para análise, foi documentada a detecção

frequente de ECEA na ausência de sintomas diarreicos, assumindo o segundo lugar como patógeno mais prevalente em fezes assintomáticas no primeiro ano de vida (PLATTS MILLS et al., 2018). Com a reanálise, utilizando a plataforma de ensaio TAC, infecções causadas por ECEA foram para a décima primeira colocação em nível de prevalência nos primeiros 2 anos de vida, ainda assim assumindo forte impacto entre os 29 enteropatógenos investigados (PLATTS-MILLS et al., 2018).

No estudo do MAL-ED et al. (2014) foi realizada uma ampla investigação dos potenciais fatores que estariam associados com a infecções por vários enteropatógenos, bem como ajustes robustos para possíveis fatores de confusão, como sexo, peso ao nascer, local do estudo, fatores relacionados a doença, amamentação e nível socioeconômico dos participantes, além de informações sobre a mãe ou cuidador da criança. Dados que foram coletados criteriosamente por equipe de campo em visitas realizadas duas vezes na semana junto às famílias participantes.

Reportando-se às variáveis determinantes investigadas, componentes do nível socioeconômico (menor renda mensal e escolaridade das mães, saneamento e fontes de água potável inadequados) foram significativamente mais comuns em crianças com infecções subclínicas de ECEA com ≥ 3 outros patógenos em comparação com todos os outros grupos de crianças. Achados semelhantes também foram evidenciados com o status socioeconômico medido através da soma de 8 ativos e índice WAMI (água / saneamento, bens domésticos, educação materna e renda familiar). Desse modo, os dados dessa pesquisa são consistentes e reforçam dados de um estudo anterior, o qual também considerou a ECEA, coinfeção e os fatores determinantes acima, porém com a possibilidade de análise de maior precisão e automação através da plataforma utilizada. (LIMA et al., 2018).

Segundo Keusch et al. (2006), embora não seja possível distinguir classe social, raça ou sexo, as doenças diarreicas acometem principalmente crianças de países em desenvolvimento, diretamente relacionadas com contextos de pobreza para uma maior frequência e severidade dos quadros diarreicos. A pobreza está, em geral, associada com condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, aglomeração de pessoas habitando a mesma residência, armazenamento e acesso inadequado dos alimentos, dificuldade de acesso à água potável e condições sanitárias desfavoráveis, além de co-habitação com animais domésticos que podem abrigar muitos patógenos humanos (KEUSCH et al., 2006).

Como estratégias de intervenção em variáveis determinantes, WHO (2004) aponta que melhorias no abastecimento de água, saneamento e higiene podem prevenir vários agravos, principalmente as doenças diarreicas, que é considerada um problema de saúde pública geograficamente abrangente podendo atingir várias idades, considerada como uma das principais causas de morbimortalidade em países em desenvolvimento, especialmente em crianças menores de 5 anos, que vivem em condições sanitárias desfavoráveis.

Ensaio clínico randomizado recente também demonstraram bons resultados ao empregar estratégias que visassem manejo adequado da água, boas práticas de higiene e saneamento básico para reduzir doenças entéricas (NULL et al., 2018; LUBY et al., 2018). Contudo, esses fatores já foram documentados como alternativas imprescindíveis para o combate de infecções entéricas.

Outro fator analisado foi o nível de escolaridade materna (< 6 anos), onde mães com menor escolaridade do grupo de crianças com ECEA e 3 ou mais copatógenos foram mais prevalentes entre todos os grupos investigados. Em estudo recente dentro da mesma coorte, a educação materna deficiente entre outros fatores, também foi considerada como possíveis fatores de risco para infecções ECEA por diferentes cepas genômicas, contribuindo para um crescimento linear reduzido na infância (RINA et al., 2021).

Diversos estudos têm relatado as consequências das infecções entéricas, mesmo as assintomáticas, e da desnutrição ocorridas nos primeiros anos de vida no crescimento e desenvolvimento das crianças. Cabe ressaltar que as doenças diarreicas na primeira infância têm sido associadas com prejuízos ao ganho de peso e altura, com consequente risco para o desenvolvimento de desnutrição, que, por sua vez, gera um aumento na frequência e duração de novos episódios diarréicos. O impacto desse ciclo vicioso a longo prazo inclui distúrbios metabólicos, com deficiências na absorção e re-captção intestinal de nutrientes e drogas, gerando danos físicos e cognitivos e dificuldade no tratamento de outras doenças sérias (GUERRANT et al., 2008).

Registros sobre amamentação também foram avaliados e, embora a porcentagem de dias de amamentação até os 6 meses de idade tenha sido identificada numa menor frequência no grupo de infecção apenas por ECEA, não houve significância estatística. Vale salientar que o aleitamento materno no primeiro ano de vida desempenha um importante papel como fator de proteção para infecção

por enteropatogenos, conforme evidenciado em diversos estudos (ROUGAWSKY et al., 2017; DAVISSE-PATURET, 2019). A amamentação também foi relacionada a um risco reduzido de infecções gastrointestinais no primeiro ano de vida em um ensaio randomizado sobre promoção do aleitamento materno (KRAMER et al., 2001).

Segundo recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS), a prática do aleitamento exclusivo deve ocorrer por 6 meses, ou no mínimo nos primeiros 4 meses de vida (WHO, 2003). Essas recomendações foram baseadas principalmente no efeito protetor da amamentação contra a morbimortalidade infecciosa (VICTORA et al., 2016), já que componentes do leite materno, como imunoglobulina A (IgA) ou leucócitos maternos, podem complementar e promover o sistema imunológico imaturo do recém-nascido (FILD, 2006). Esses anticorpos integram-se à mucosa gastrointestinal, dificultando a aderência e colonização da mucosa do trato digestivo infantil por patógenos entéricos. Outras células imunes, como macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, e substâncias com propriedades probióticas e antibióticas, como a lisozima e o fator bífido, também estão presentes no leite materno e contribuem para a sua característica protetora, combatendo a instalação de agentes envolvidos na etiologia das doenças diarréicas (ARAÚJO et al., 2007).

Fatores clínicos relacionados aos episódios de doença nos primeiros 6 meses também foram analisados através da proporção de dias nesse período como: infecção respiratória aguda, desidratação, diarreia e febre, porém não houve diferença estatística entre os grupos analisados. Cabe ressaltar que apenas uma tendência ($p=0,064$) a uma maior proporção de dias com desidratação nos primeiros 6 meses esteve associada a infecção por ECEA com 2 outro co-patogenos presentes. Esse achado poderia ser justificado por manifestações clínicas em algum momento anterior associado à ECEA, tendo em vista que infecções por esse patógeno se caracterizam por episódios de diarreias com quadros persistentes (acima de 14 dias), podendo também apresentar vômitos levando a uma perda de líquido aumentada; assim como ser atribuída a uma ingestão líquida reduzida, promovendo assim a desequilíbrios hidroeletrólíticos na criança.

Uma maior proporção de dias de antibiótico também foi significativamente maior no grupo ECEA com 3 ou mais patógenos com algumas associações comparáveis, como por exemplo contra 1 e 2 patógenos sem ECEA. Esse dado pode ser preocupante, tendo em vista que não só a elevada carga de patógenos,

mas sim, a presença de ECEA foi responsável por impulsionar essa associação no grupo investigado, o que faz refletir sobre um ponto importante, possibilidade de resistência microbiana em decorrência do uso indiscriminado desse tipo de medicação, problema com forte impacto na saúde pública.

Um estudo anterior que avaliou dados da mesma coorte para uso de antibióticos identificou que a exposição repetida a antibióticos era comum no início da vida, e o tratamento de diarreia não sanguinolenta e doenças respiratórias não específicas não era consistente com as recomendações internacionais de saúde (ROGAWSKY, 2017). Cabe ressaltar, que para as doenças diarreicas, a reidratação oral adequada, suplementação de zinco e a manutenção do balanço eletrolítico são as principais fontes de tratamento utilizado, sendo restrito uso de antibióticos apenas a casos graves, disenteria ou infecções extra-intestinais; e apenas infecções respiratórias que acometem o trato respiratório inferior podem necessitar de terapia antimicrobiana (WHO, 2006; TERNHAG et al., 2007; SMITH & FRATAMICO, 2010).

O TGI normal regula a absorção e secreção de água e eletrólitos de acordo com as necessidades fisiológicas corporais. As TJs são estruturas dinâmicas, capazes de adaptação a diversas condições fisiológicas e patológicas, e representam a principal barreira entre os enterócitos, controlando o movimento de água e solutos entre o lúmen intestinal e o espaço intersticial (ANDERSON; VAN ITALLIE, 1995). Um elevado número de microorganismos tem se mostrado capaz de exercer efeitos lesivos diretos e indiretos às TJs e a outras estruturas intestinais, comprometendo, assim, o papel do epitélio intestinal como mediador central na interação entre o organismo e o ambiente externo (UZZAU; FASANO, 2000; GEWIRTZ et al., 2002; FASANO; NATARO, 2004).

Em se tratando da Disfunção Entérica Ambiental (DEA), esta é caracterizada por uma desordem intestinal subclínica de alta prevalência em países de baixa e média renda e atribuível à infecção por muitos enteropatógenos ambientais de natureza bacteriana, viral e parasitária. Os mecanismos que contribuem para a falha de crescimento na DEA incluem aumento da permeabilidade intestinal, inflamação intestinal, translocação bacteriana, má absorção de nutrientes e inflamação sistêmica (RINA et al., 2021).

Não há evidências claras que apontem a(s) causa(s) de DEA que precedem a desnutrição significativa quando a incidência de infecção entérica com efeitos conhecidos na estrutura e função do intestino aumenta. Ademais, nenhum

biomarcador único conhecido atualmente indica de forma confiável a presença de déficits intestinais funcionais precoces que contribuem para a falha de crescimento. Para estabelecer critérios diagnósticos é necessário avaliar os parâmetros cuidadosamente escolhidos de função e lesão o mais cedo possível após o nascimento e, posteriormente, em série (KEUSCH et al., 2014).

A avaliação supracitada inclui: função absorptiva, a permeabilidade da mucosa, a inflamação e a ativação imune. Alguns biomarcadores podem ser citados: manitol e captação paracelular de lactulose (Absorção intestinal e permeabilidade da mucosa), mieloperoxidase (para inflamação), neopterinina (Translocação microbiana e ativação imune) (KEUSCH et al., 2014).

No que concerne a função da barreira intestinal, medida pela relação lactulose/manitol, os escores razão LM foram significativamente maiores entre os grupos ECEA com 3 ou mais patógenos e 3 ou mais patógenos sem ECEA quando comparado com o grupo de 1 ou 2 patógenos sem ECEA ($p= 0,043$), resposta provavelmente foi impulsionada pelos escores z ajustados das porcentagens de lactulose excretado na urina nos respectivos grupos ($p=0,022$).

Esses achados demonstram que a maior carga de patógenos, mesmo na ausência de sintomas clínicos, estiveram associadas com alteração da barreira intestinal por aumentar a permeabilidade e lesão. Vale ressaltar que esse foi o primeiro estudo que mostrou alteração de barreira intestinal através da infecção assintomática e co-deteção de patógenos, uma vez que esses dados não foram encontrados em outras investigações.

No presente estudo, a concentração de MPO das crianças também foi analisada, sendo esta significativamente maior em crianças com ECEA e 3 ou mais patógenos em comparação com as concentrações em crianças: sem patógeno detectado, 3 ou mais co-patógeno sem ECEA e ECEA mais 2 outros patógenos ($p= 0,001$), indicando uma resposta inflamatória gastrointestinal substancial mesmo em crianças assintomáticas. Esses resultados são consistentes com base em evidências de estudo anterior que analisou colonização por ECEA sem sintomas evidentes e codeteção por microbiologia convencional (LIMA, et al., 2018) e reforçam o impacto da ECEA para indução da resposta inflamatória intestinal frente a outros patógenos em infecção subclínica.

Outros biomarcadores fecais foram investigados no estudo. A AAT caracteriza-se como um biomacador de perda proteica pelo tudo digestivo, utilizado

para avaliar lesão na barreira intestinal, sendo um marcador de ruptura mais severa da barreira intestinal (GUERRANT et al., 2016). Já a NEO é definida como um marcador de respostas imunes, onde maiores níveis sugere uma maior proteção nas respostas imunes intestinais (SEKI et al., 1996). Embora esses marcadores sejam importantes na detecção do DEA, não houve diferença desses níveis nos grupos investigados.

Estudo recente que avaliou diferentes genes de virulência das cepas de ECEA para inflamação entérica e baixo crescimento infantil na mesma coorte, relatou que a presença concomitante geral de *aaiC* e *aatA* genes portadores de cepas foram mais fortemente associados ao aumento da pontuação DEA, implicando em uma maior inflamação intestinal (RINA et al., 2021). Embora o presente estudo não tenha usado como definição os respectivos genes de forma concomitante, as evidências sugerem que a presença de pelo menos um desses genes e a co-deteção de entropatógenos estiveram associados com marcadores de permeabilidade e respostas inflamatórias intestinais nos grupos investigados.

A antropometria pode ser utilizada como uma forte ferramenta preditora da saúde, para avaliação da nutrição e desempenho ao longo do tempo para a população em geral, sendo as curvas de crescimento amplamente utilizada na pediatria para avaliação da saúde e do desenvolvimento infantil (DIBLEY et al., 1987). Associação de medidas antropométricas também foram investigadas entre os grupos do estudo, através das pontuações dos escores delta WLZ, WAZ e LAZ coletadas no intuito de avaliar estado nutricional e crescimento das crianças ao longo dos 6 meses.

Os dados antropométricos são usados para definir o estado nutricional e o crescimento das crianças, onde as medidas estatura e peso podem ser convertidos em escores-z, calculados com base em valores de referência disponíveis e que avaliam essas medidas em função da idade da criança, tendo como principal vantagem a possibilidade de cálculo da média e desvio padrão da população estudada (WHO, 1995). A OMS classifica a desnutrição de acordo com a gravidade, que é definida clinicamente por um valor de score $z < -1,0$ desvio padrão (DP), como desnutrição leve; $< -2,0$ DP como desnutrição moderada; e $< -3,0$ DP como desnutrição severa (WHO, 2006; 2017). Assim, os índices antropométricos são utilizados para definir os diferentes tipos de desnutrição, onde a desnutrição aguda, ou baixo peso (do inglês, *wasting*) é definida com o índice de baixo peso para altura

(WHZ), a desnutrição crônica ou nanismo (do inglês, stunting) é definida como o índice de baixa altura para a idade (HAZ) e a subnutrição é definida com o índice de baixo peso para a idade (WAZ) (WHO, 2017).

A partir da avaliação desses dados nos grupos de estudo, foi possível determinar que menores escores de crescimento estiveram associados às crianças com ECEA e 3 ou mais patógenos com algumas associações comparáveis. Dentre elas, cabe ressaltar a diferença presente quando comparado com os grupos 1, 2, 3 ou mais patógenos sem ECEA, o que evidencia que não apenas a carga, mas sim, a necessidade da presença de ECEA para induzir menores escores de crescimento (LAZ, WAZ), associação também sendo mantida para WHZ com 1 e 2 patógenos sem ECEA.

No intuito de refinarmos essa análise, foi realizada uma regressão linear múltipla, onde foi incluída co-variáveis de ajuste no modelo, sendo estas eleitas por plausibilidade biológica conforme descrito anteriormente. Em síntese, as variáveis: sexo, peso ao nascer, Índice WAMI (água / saneamento, bens, escolaridade materna e renda), insegurança alimentar, proporção de dias de amamentação e de uso de antibióticos foram preditores investigados, sendo incluído grupos com e sem ECEA e coinfeções para estimativa geral.

O resultado da regressão da associação entre a exposição à ECEA, na ausência de outros patógenos, com o crescimento ao longo dos primeiros 6 meses de vida foi estatisticamente significativo para delta zlen-LAZ (redução de 0,418 do delta comprimento/idade em comparação com crianças sem patógenos, $p=0,004$). Resultado condizente com estudo anterior, que relatou uma associação negativa com escores de crescimento a partir do aumento da codeteção de patógeno na presença de ECEA (LIMA et al., 2018).

Resultados consistentes com este achado também foi evidenciado nos estudos de coorte iniciais. Uma análise anterior de ECEA no estudo MAL-ED mostrou que a detecção consistente de ECEA nos primeiros 2 anos de vida estava associada a déficits de crescimento linear aos 2 anos de idade (ROGAWSKY et al., 2017). Esses resultados sugerem uma interação patobiológica entre ECEA e outros patógenos, onde parte da fisiopatologia da infecção induzida pela ECEA pode ser devida à liberação de citocinas pró-inflamatórias do epitélio intestinal estimulada pela ECEA ou suas toxinas, tendo como desfecho um forte impacto no desenvolvimento inicial infantil, mesmo na ausência de diarreia (STEINER et al., 1998).

Um estudo recente da mesma coorte, estimou que as taxas de incidência específica por local de cepas portadoras de genes de ECEA e suas possíveis associações com o escore composto DEA e a consequente redução de crescimento em crianças aos 24 meses de idade, o qual identificou crescimento linear reduzido e aumento da inflamação entérica entre várias cepas genômicas de ECEA investigadas (RINA et al., 2021), o que corrobora com a nossa pesquisa.

O estudo teve algumas limitações, uma delas foi a possibilidade de codeteção subclínica do patógeno ter sido perdida entre as coletas na análise mensal das fezes no período de estudo. Outro fator está relacionado com a definição do grupo de estudo e as análises do projeto, que não levam em conta a duração das infecções subclínicas. Além disso, a investigação através de outros biomarcadores como, por exemplo, de inflamação sistêmica, poderia ajudar em uma melhor caracterização da DEA e devem ser considerados em estudos adicionais sobre a patobiologia e o impacto de ECEA subclínicas isoladas e infecções por patógenos co-detectados contribuindo para estabelecer ligação mais forte entre as interações dos enteropatógenos com o déficit no crescimento dessas crianças.

6 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados gerados por esse estudo que incluiu análise das amostras do coorte MALED até os 6 meses, será realizado o mesmo desenho incluindo o período total de investigação (até os 2 anos), possibilitando avaliar o impacto das infecções por ECEA e coinfeção em crianças em um maior período de tempo, bem como a possibilidade de incluir no estudo outros marcadores séricos que foram coletados no período de 7, 15 e 24 meses, como o zinco plasmático e alfa-1-glicoproteína ácida (AGP), considerado um biomarcador para inflamação sistêmica.

7 CONCLUSÃO

Dentre os fatores de riscos determinantes investigados, a menor escolaridade da mãe, renda, escores de oito ativos e wami, assim como fonte de água potável e condições de saneamento inadequados e a maior proporção de dias de antibiótico estiveram associados às infecções causadas com uma maior carga de patógenos associados, porém exigindo a presença de ECEA nesses achados.

A função intestinal medida pela relação lactulose/manitol impulsionada pelos escores z ajustados das porcentagens de lactulose excretado na urina foi alterada, sendo significativamente maior entre os grupos com e sem ECEA com 3 ou mais patógenos presentes. Embora o dano e respostas imunes através dos marcadores ALA e NEO respectivamente não tenham sido associados entre os grupos investigados, uma maior inflamação através do MPO esteve associada no grupo de ECEA com 3 ou mais patógenos, sugerindo DEA.

A infecção subclínica entre os grupos investigados influenciou no déficit de crescimento quando 3 ou mais patógenos estavam associados junto a ECEA.

Essa análise aponta que danos mais severos que possam caracterizar a presença de DEA, só acontecem se ECEA estiver associado a outro enteropatógeno na população estudada. A patobiologia da infecção subclínica por ECEA com codeteção de patógenos parece ser mais complexa do que se pensava anteriormente.

REFERÊNCIAS

- ADACHI, et al. Natural history of enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli* infection among US travelers to Guadalajara, Mexico. *J. Infect. Dis.*, v. 185, n. 11, p. 1681-1683, 2002. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/185/11/1681/837287?login=false>. Acesso em: 06 out. 2021.
- Aslani et al. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. *Int J Infect Dis.*;15(2):e136-9, 2011. Disponível em: [https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(10\)02525-7/fulltext](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(10)02525-7/fulltext). Acesso em: 01 out. 2021.
- ALI et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* in diarrheic children in Egypt: molecular characterization and antimicrobial susceptibility, *The Journal of Infection Developing Countries*, v. 8, n. 5, p. 589-596, 2014. Disponível em: <https://jidc.org/index.php/journal/article/view/24820462/1062>. Acesso em: 02 set. 2021.
- ANDRADE et al. Distribution of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae in typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 50, p. 83-86, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1567134817300710>. Acesso em: 15 set. 2021.
- ARAUJO et al. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrheal-associated pathotypes among Brazilian children. *J Clin Microbiol.*, v. 45, n. 10, p. 3396-3399, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2045331/>. Acesso em: 06 set. 2021.
- BAUDRY et al. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. *J. Infect. Dis.*, v. 161, p. 1249-1251, 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2189007/>. Acesso em: 22 set. 2021.
- BECKER-DREPS et al. Associação entre biomarcadores fecais de enteropatia ambiental e resposta à vacina contra rotavírus em bebês da Nicarágua. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 36(4):p 412-416, abril de 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6947780/>. Acesso em: 22 jul. 2021.
- BOISEN et al. Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am J Trop Med Hyg.*, v. 80, n. 2, p. 294-301, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2660206/>. Acesso em: 30 set. 2021.
- BUERIS et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 7, p. 839-844, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/MBctx3grThdksGhbmKvn58N/>. Acesso em: 29 set. 2021.

CROXEN et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24092857/>. Acesso em: 25 out. 2021.

Davisse-Paturet et al. Breastfeeding Status and Duration and Infections, Hospitalizations for Infections, and Antibiotic Use in the First Two Years of Life in the ELFE Cohort. *Nutrients* vol. 11,7 1607. 15 Jul. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6682893/>. Acesso em: 27 out. 2021.

DIAS et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. *Apmis*, v. 124, n. 4, p.299-308, 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/apm.12501>. Acesso em: 11 set 2021.

DUTTA et al. Functional comparison of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae. *Infect Immun.*, v. 70, p. 7105–7113, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC133081/>. Acesso em: 16 nov 2021.

ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 66, p. 281-298, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22775224/>. Acesso em: 02 nov 2021.

Fagundes, N. U., Affonso, S. I. C. *Escherichia coli* infections and malnutrition. *Lancet*. 2000 Dec;356 Suppl:s27. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11191483/>. Acesso em: 03 nov 2021.

Field C.J. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J. Nutr.* 2006;135:1–4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15623823/>. Acesso em: 03 set 2021.

FLORES, J. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin seroconversion in US travelers to Mexico. *J. Travel Med.*, v. 15, n. 3, p. 156-161, 2008. Disponível em: <https://academic.oup.com/jtm/article/15/3/156/1821189>. Acesso em: 22 nov 2021.

GUERRANT, R. L. et al. Biomarkers of Environmental Enteropathy, Inflammation, Stunting, and Impaired Growth in Children in Northeast Brazil. *Plos One*, v. 11, 2016. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0158772>. Acesso em: 22 nov 2021.

GUERRANT, R. L. et al. The impoverished gut – a triple burden of diarrhea, stunting and chronic disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. v. 10, n. 4, p. 220-229, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3617052/>. Acesso em: 23 nov 2021.

GUTIERREZ, E. J. et al. Enteric parasites and enteroaggregative *Escherichia coli* in children from Cañazas County, Veraguas Province, Panama. *American Journal of*

Tropical Medicine and Hygiene. v. 91, n. 2, p. 267-272, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4125247/>. Acesso em: 06 nov 2021.

Helalat, H., et al. Genotypic and phenotypic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) isolates from diarrheic children: An unresolved diagnostic paradigm exists. *Iranian journal of basic medical sciences*, 23(7), 915–921, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7395180/>. Acesso em: 12 nov 2021.

Havt, A et al. Prevalência e perfil gênico de virulência de *Escherichia coli* enteroagregativa em crianças brasileiras desnutridas e nutridas. *Diagnóstico Microbiol Infect Dis*. 2017 out;89(2):98-105. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28780245/>. Acesso em: 22 dez 2021.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 254, p. 12-18, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16451173/>. Acesso em: 11 dez 2021.

HUANG, D. B. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.*, v. 43, p. 556-563, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16886146/>. Acesso em: 20 dez 2021.

HUANG, D. B. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. *Am. J. Gastroenterol.*, v. 99, n. 2, p. 383-389, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15046233/>. Acesso em: 12 jul 2021.

Hebbelstrup ,J., B et al. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 27(3), 614–630, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24982324/>. Acesso em: 13 dez 2021.

HUANG, D. B. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. *Am. J. Gastroenterol.*, v. 99, n. 2, p. 383-389, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15046233/>. Acesso em: 15 dez 2021.

HUANG, D. B. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.*, v. 43, p. 556-563, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16886146/>. Acesso em: 11 dez 2021.

JAIN, S. et al. An outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with sushi restaurants in Nevada, 2004. *Clin. Infect. Dis.*, v. 47, n. 1, p. 1-7, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18491967/>. Acesso em: 14 dez 2021.

JONSSON, R. et al. A novel Aggregative Adherence Fimbriae (AAF/V) of Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). *Infect. Immun.*, v. 83, p. 1396-1405, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4363450/>. Acesso em: 14 dez 2021.

KEUSCH, G. T. et al. Environmental Enteric Dysfunction: Pathogenesis, Diagnosis,

and Clinical Consequences. *Clinical Infectious Diseases*, v. 59, n. 4, p.207-212, 1 nov. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4481570/>. Acesso em: 20 dez 2021.

KHAN, M. A.; KANG, J.; STEINER, T. S. Enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin-induced interleukin-8 secretion requires Toll-like receptor 5-dependent p38 MAP kinase activation. *Immunology*, v. 112, n. 4, p. 651-660, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15270737/>. Acesso em: 23 dez 2021.

Kramer, M. S. et al. Promotion of Breastfeeding Intervention Trial (PROBIT) *JAMA*; 285:413–420. doi: 10.1001/jama.285.4.413, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11242425/>. Acesso em: 30 dez 2021.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 2, p. 123-140, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15040260/>. Acesso em: 21 dez 2021.

Kosek, M.; Haque, R., Lima, A. et al. Fecal markers of intestinal inflammation and permeability associated with the subsequent acquisition of linear growth deficits in infants. *Am J Trop Med Hyg.*, v. 88, p. 390–396, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3583335/>. Acesso em: 11 dez 2021.

Kotloff, K. L., et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*. Jul 20;382(9888):209-22, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23680352/>. Acesso em: 25 dez 2021.

Lee, G. O. et al. The lactulose:mannitol diagnostic test by HPLC and LC-MSMS platforms: considerations for field studies of intestinal barrier function and environmental enteropathy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 59: 544–550, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4222705/>. Acesso em: 13 dez 2021.

Liu, J., Kabir, F., Manneh, J. et al. Development and assessment of molecular diagnostic tests for 15 enteropathogens causing childhood diarrhoea: a multicentre study. *Lancet. Infect. Dis.*;14(8):716–724, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25022434/>. Acesso em: 26 dez 2021.

LIMA, A. A. M. et al. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. *The Journal of infectious diseases*, v. 181, n. 5, p.1643-1651, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10823764/>. Acesso em: 12 nov 2021.

LIMA, I. F. N. et al. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. *Journal Of Medical Microbiology*, v. 62, n. 5, p. 683-693, 21 fev. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3709657/>. Acesso em: 12 dez 2021.

Lima, A. A. M., Medeiros, P. H. Q. S., Havt, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* subclinical and clinical infections. *Curr Opin Infect Dis.* Oct;31(5):433-439, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30063473/>. Acesso em: 12 dez 2021.

Lima, A. A. M. et al. Determinant Variables, Enteric Pathogen Burden, Gut Function and Immune-related Inflammatory Biomarkers Associated With Childhood Malnutrition: A Prospective Case-Control Study in Northeastern Brazil. *The Pediatric infectious disease journal* vol. 36,12: 1177-1185, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5568907/>. Acesso em: 12 dez 2021.

LUBY, S.P. et al. Effects of water quality, sanitation, handwashing, and nutritional interventions on diarrhoea and child growth in rural Bangladesh: a cluster randomised controlled trial. *Lancet Glob Health*, v. 6, p. 302–e315, 2018. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X\(17\)30490-4/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X(17)30490-4/fulltext). Acesso em: 13 dez 2021.

Mahfuz M, Das S, Mazumder, R. N. Bangladesh Environmental Enteric Dysfunction (BEED) study: protocol for a community-based intervention study to validate non-invasive biomarkers of environmental enteric dysfunction *BMJ Open*;7:e017768, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28801442/>. Acesso em: 13 dez 2021.

MOHAMED, J. A. et al. Association of putative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 1, p. 121-126, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1828990/>. Acesso em: 13 dez 2021.

MÉNARD, L. P., DUBREUIL, J. D. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): A new toxin with an old twist. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 28, n.1, p. 43-60, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12003040/>. Acesso em: 03 dez 2021.

MAL-ED Network Investigators. The MAL-ED study: a multinational and multidisciplinary approach to understand the relationship between enteric pathogens, malnutrition, gut physiology, physical growth, cognitive development, and immune responses in infants and children up to 2 years of age in resource-poor environments. *Clinical Infectious Diseases*, v. 59, p. 193-206, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25305287/>. Acesso em: 12 dez 2021.

Mondal, D. et al. Attribution of malnutrition to cause-specific diarrheal illness: evidence from a prospective study of preschool children in Mirpur, Dhaka, Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg.* May;80(5):824-6, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19407131/>. Acesso em: 01 nov 2021.

MOAL, V.L. et al. Secreted autotransporter toxin (Sat) triggers autophagy in epithelial cells that relies on cell detachment. *Cell Microbiol.*, v. 13, n. 7, p. 992-1013, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21501364/>. Acesso em: 03 out 2021.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9457432/>. Acesso em: 03 out 2021.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V.; VIAL, P.; LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, v. 6, p. 829-831, 1987. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3313248/>. Acesso em: 13 out. 2021.

Nataro JP, Steiner T, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* Apr-Jun;4(2):251-61, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9621195/>. Acesso em: 15 dez 2021.

NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. *Gut Microbes.*, v. 2, p. 13-24, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21637014/>. Acesso em: 25 dez 2021.

NULL, C. et al. Effects of water quality, sanitation, handwashing, and nutritional interventions on diarrhoea and child growth in rural Kenya: a cluster-randomised controlled trial. *Lancet Glob Health*, v. 6, p. 316–e329, 2018. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X\(18\)30005-6/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X(18)30005-6/fulltext). Acesso em: 12 nov 2021.

OKHUYSEN, P. C.; DUPONT, H. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. *J. Infect. Dis.*, v. 202, p. 503-505, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20594108/>. Acesso em: 23 dez 2021.

OKEKE, I. N.; NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Lancet Infect. Dis.*, v. 1, p. 304–313, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11871803/>. Acesso em: 22 dez 2021.

PEREIRA, A. L.; FERRAZ, L. R.; SILVA, R. S.; GIUGLIANO, L. G. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence markers: positive association with distinct clinical characteristics and segregation into 3 enteropathogenic *E. coli* sero- groups. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 195, p. 366-374, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17205475/>. Acesso em: 25 nov 2021.

PLATTS-MILLS, J.; et al. Use of quantitative molecular diagnostic methods to assess the aetiology, burden, and clinical characteristics of diarrhea in children in low-resource settings: a reanalysis of the MAL-ED cohort study. *Lancet Glob Health.*, v. 6, n. 12, p. 1309-1318, 2018. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X\(18\)30349-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X(18)30349-8/fulltext). Acesso em: 30 nov 2021.

PIVA, I. C. et al. Virulence markers of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children and adults with diarrhea in Brasilia, Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, v. 41, n. 5, p. 1827-1832, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC154701/>. Acesso em: 26 nov 2021.

PLATTS-MILLS, J. A. et al. Pathogen-specific burdens of community diarrhea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). *Lancet Glob Health*, v. 3, n. 9, p. 564- 575, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26202075/>. Acesso em: 22 nov 2021.

PLATTS-MILLS, J. et al. Use of quantitative molecular diagnostic methods to assess the aetiology, burden, and clinical characteristics of diarrhea in children in low-resource settings: a reanalysis of the MAL-ED cohort study. *Lancet Glob Health*, v. 6, n. 12, p. 1309-1318, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30287127/>. Acesso em: 23 nov 2021.

POLOTSKY, Y. et al. HEp-2 cell adherence patterns, serotyping, and DNA analysis of Escherichia coli isolates from eight patients with AIDS and chronic diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, v. 35, n. 8, p. 1952-1958, 1997. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC229883/pdf/351952.pdf>. Acesso em: 26 out 2021.

Psaki SR, Seidman JC, Miller M, Gottlieb M, Bhutta ZA, Ahmed T, et al. Measuring socioeconomic status in multicountry studies: results from the eightcountry MAL-ED study. *Popul Health Metr.* 2014;12(1):8. Disponível em: <https://pophealthmetrics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1478-7954-12-8>. Acesso em: 28 dez 2021.

RINA et al. Site specific incidence rate of virulence related genes of enteroaggregative Escherichia coli and association with enteric inflammation and growth in children. *Scientific reports* vol. 11,1 23178. 30 Nov. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34848801/>. Acesso em: 22 dez 2021.

ROGAWSKI, E. T. et al. Epidemiology of enteroaggregative Escherichia coli infections and associated outcomes in the MAL-ED birth cohort. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 7, p. 1-1, 24 jul. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5542697/>. Acesso em: 26 dez 2021.

ROGAWSKI, E. T. et al. The Burden of Enteropathy and “Subclinical” Infections. *Pediatric Clinics Of North America*, v. 64, n. 4, p.815-836, ago. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5523808/>. Acesso em: 23 nov 2021.

Rogawsk, E. T. et al. Use of quantitative molecular diagnostic methods to investigate the effect of enteropathogen infections on linear growth in children in low-resource settings: longitudinal analysis of results from the MAL-ED cohort study. *Lancet Global Health*. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30287125/>. Acesso em: 13 nov 2021.

Rogawski, E. T. et al. Use of antibiotics in children younger than two years in eight countries: a prospective cohort study. *Bulletin of the World Health Organization*, 95 (1), 49 – 61, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5180352/>. Acesso em: 05 nov 2021.

Rutstein SO, Johnson K. The DHS Wealth Index [Internet]. DHS Comparative Reports No. 6. Calverton, Maryland: ORC Macro; 2004

RUIZ-PEREZ, F.; NATARO, J. P. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 71, p. 745-770, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3871983/>. Acesso em: 02 dez 2021.

SARANTUYA, J. et al. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, p.133-139, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14715743/>. Acesso em: 03 dez 2021.

SEKI, T. et al. The Regulation of Neopterin Production by Cytokines. *Pteridines*, v. 7, p. 5–9, 1996.

STEINER, T. S. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. *J. Clin. Invest.*, v. 105, p. 1769-1777, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10862792/>. Acesso em: 12 dez 2021.

SHEIKH, J. et al. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, v. 41, p. 983-997, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11555281/>. Acesso em: 12 dez 2021.

SPANO, L. C. et al. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology*, v. 57, n. 3, p. 359-363, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18287300/>. Acesso em: 26 dez 2021.

TOKUDA, K. et al. Characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: biofilm formation and acid resistance. *Microbiology and Immunology*, v. 54, p. 320-329, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20536730/>. Acesso em: 12 nov 2021.

VIAL, P. A et al. Comparison of two assay methods for patterns of adherence to HEp-2 cells of *Escherichia coli* from patients with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 28:882–885, 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2191011/>. Acesso em: 08 dez 2021.

VASUDEVAN, P. et al. *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary Microbiology*, v. 92, p. 179-185, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12488081/>. Acesso em: 16 dez 2021.

VIJAY D. et al. Characterization and biofilm forming ability of diarrhoeagenic enteroaggregative *Escherichia coli* isolates recovered from human infants and young animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*; 38:21–31, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014795711400071X>. Acesso em: 16 dez 2021.

VICTORA, C. G. et al. Breastfeeding in the 21st century: Epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet.* 2016;387:475–490. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01024-

7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26869575/>. Acesso em: 13 nov 2021.

WANKE, C. A. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a potential cause of diarrheal disease in adults infected with human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.*, v. 178, n. 1, p. 185-190, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9652439/>. Acesso em: 12 out 2021.

World Health Organization (WHO). Child Growth Standards. *Acta Paediatr*, v. 95, p. 1-302, 2006.

World Health Organization (WHO). The global burden of disease: 2004 update. Geneva: WHO; 2004.

World Health Organization . Feeding and Nutrition of Infants and Young Children, Guidelines for the WHO European Region, with Emphasis on the Former Soviet Countries. WHO; Geneva, Switzerland: 2003.

WHO. Indicators for assessing infant and young child feeding practices: part 1 definitions. Geneva: WHO, 2008.

ANEXOS

ANEXO A - Parecer do COMEPE

Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N° 135/10

Fortaleza, 28 de junho de 2010

Protocolo COMEPE n° 246/ 09

Pesquisador responsável: Aldo Ângelo Moreira Lima

Dept°./Serviço: Departamento de Fisiologia e Farmacologia/ UFC

Título do Projeto: "Etiologia, fatores de risco e interações das infecções entéricas e desnutrição e suas conseqüências no desenvolvimento e saúde da criança"

Levamos ao conhecimento de V.S^a, que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução n° 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou na reunião do dia 24 de junho de 2010 as respostas apresentadas no projeto supracitado, pois atende as recomendações da CONEP.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deve se comprometer a enviar o relatório parcial e final do referido projeto.

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink is written over a circular stamp. The stamp contains the text: "Dr. Fernando R. Tavares Pereira", "Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa", and "COMEP/UFCE".

Dr. Fernando R. Tavares Pereira
Coordenador do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEP/UFCE

Cont. Parecer: CONEP nº 029/2010

adequação da mesma, uma vez que, conforme disposto na Resolução CNS 196/96 que preconiza, no seu item V: Considera-se que toda pesquisa envolvendo seres humanos envolve risco. O dano eventual poderá ser imediato ou tardio, comprometendo o indivíduo ou a comunidade. Solicita-se adequação do texto.

3. Solicita-se deixar explícito no TCLE a garantia ao sujeito de pesquisa sobre os direitos à indenização, conforme itens V.5, V.6 e V.7 da Resolução CNS 196/96.
4. Solicita-se a inclusão do endereço do CEP no tópico 'Quem eu posso contatar para Questões sobre Direitos como Sujeito de Pesquisa?'.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se por aguardar o atendimento às questões acima para emissão de seu parecer final.

Situação: Protocolo com pendência.

De acordo com a Resolução CNS 196/96, as pendências devem ser respondidas exclusivamente pelo pesquisador responsável no prazo de 60 dias, a partir da data de envio do parecer pelo CONEP. Após esse prazo o protocolo será arquivado. A resposta do pesquisador principal deve ser avaliada pelo CEP com a emissão de parecer consubstanciado e, se aprovada, deve ser encaminhada à CONEP. Solicita-se ainda que as respostas sejam enviadas de forma ordenada, conforme os itens de consideração deste parecer, e a indicação da localização das possíveis alterações no protocolo.

Brasília, 27 de janeiro de 2010.


Giselle Gaddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

ANEXO B – Parecer do CEP

194 00 33 04127

CONEP

30152701

P-1



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 029/18

Registro CONEP 16781 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro no CEP – 24028

Processo nº 24006.659636/2009-76

Projeto de Pesquisa: "Etiologia, Fatores de Risco e Interações das Infecções Entéricas e Desnutrição e seus Consequências no Desenvolvimento e Saúde da Criança". Protocolo versão 01 data da capa de 05/03/2009, data do corpo de texto 20/08/2009; Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para o estudo CAS-CONTROL, versão 2.1 de 15/04/2009, TCLE para o estudo COHORT versão 4 de 15/04/2009.

Pesquisador Responsável: Dr. Aldo Ângelo Moraes Lima

Instituição: Universidade Federal do Ceará (CENTRO UNICC)

CEP de origem: Universidade Federal do Ceará

Área Temática Especial: Pesquisas com cooperação estrangeira

Patrocinador: SV & Melinda Gates Foundation

Síntese geral do protocolo

A desnutrição é considerada um dos fatores de risco mais prevalentes para morbidade e mortalidade em crianças abaixo de cinco anos. Estima-se que 20% das crianças nos países em desenvolvimento são desnutridas e deficits nutricionais estão associados com mais da metade das causas de morte a nível mundial. A desnutrição na infância pode levar a deficits físicos e cognitivos e pode resultar deficits similares em gerações futuras com mães desnutridas que dão à luz crianças de baixo peso. Além disso, a desnutrição aumenta a susceptibilidade à infecções e está associada com a diminuição da resposta às vacinas. O crescimento das relações complexas e sinérgicas entre infecções entéricas e a desnutrição é fundamental para planejar melhores estratégias de prevenção. Apesar dos grandes avanços terapêuticos, as infecções entéricas causadoras de diarreia permanecem entre a cause primária de mortes em crianças, estimada em 11-20% (até 5,1 milhões de mortes) por ano em crianças abaixo de 5 anos de vida. Embora a mortalidade causada por patógenos entéricos tenha reduzido mundialmente nos últimos três décadas, estima-se que a taxa global de mortalidade devido à diarreia tenha aumentado no mesmo período.

A origem da desnutrição infantil é complexa com uma variedade de fatores diretos e indiretos relacionados não apenas com a escassez de alimentos, incluindo aleitamento materno insuficiente e inadequado suporte de suplementos alimentares, mas também estados crônicos devido às infecções, à resposta inadequada do hospedeiro e da sua resposta resultando em déficit calórico. Restrições fisiológicas, vitais e doenças intestinais parecem comprometer o estado nutricional em duas maneiras distintas: 1) Os patógenos entéricos impedem a absorção de nutrientes, reduzem a capacidade absorptiva do intestino, dessa forma, causando desnutrição proteico-energética e da micronutrientes; 2) As infecções entéricas podem também comprometer a barreira intestinal, resultando na permeabilidade aumentada de patógenos, endotoxinas e outros macromoléculas que podem resultar em coaçãoção ativa do sistema imune.

Tanto as deficiências de nutrientes como a estimulação crônica imune parecem comprometer o crescimento e aumentar a susceptibilidade de doenças

Out-Project/CONEP/1300016

inteciosas. A microbiota intestinal alterada e patógenos podem reduzir a eficácia das vacinas ministradas por via oral.

Entanto já se sabe que infecções crônicas podem induzir desnutrição, a literatura avaliano impacto da etiologia de enteropatógenos à limitada devido a amostragem pequena, sites geográficos restritos e qualidade dos dados diagnósticos. Apesar de que a maior parte da atenção do tratamento para diarreia aguda ocorre através da rehidratação, ainda existem poucos estudos da morbidade e mortalidade resulte da infecções entéricas crônicas e recorrentes, envolvendo microrganismos e parasitas, e sua contribuição para a morbidade global em crianças abaixo de 5 anos e as consequências a longo-prazo na vida adulta.

Também não existem estudos sistemáticos que elucidaram as relações entre crescimento/desenvolvimento e microrganismos específicos, tanto de incidência como fase etária particular na infância, no infecções crônicas. Além disso, não existem estudos demonstrando associações conclusivas desses fatores com indicadores imediatistas, como infecção intestinal, no qual provavelmente associa infecções entéricas com crescimento e desenvolvimento. Também existe limitação na literatura avaliando a resposta às vacinas associada a infecção mista e o papel da sustentação da microbióticas em países em desenvolvimento.

Este projeto estabelecerá e operará uma rede multicêntrica em populações com elevada prevalência de desnutrição e infecções entéricas, num estudo compreensivo, utilizando protocolo comum e bem organizados, para determinar fatores que influenciam o desenvolvimento e saúde infantil. A vigilância epidemiológica intensiva em crianças durante os primeiros anos críticos de vida, nos centros propostos, permitirá elucidar algumas dessas complexas inter-relações, possibilitando intervenções com melhor custo-benefício e com maior impacto.

A pesquisa de tempo-serials ajudará a elucidar os fatores de risco para desnutrição e infecções entéricas nessas populações. Também existe a necessidade de expandir os estudos para outros locais com prevalências altas de morbidade devido às infecções entéricas, mas com falta de dados específicos.

Os principais objetivos deste projeto são: 1. Estabelecer uma rede coordenada de forma multicêntrica em países em desenvolvimento na Ásia, África e América do Sul; 2. Conduzir estudos epidemiológicos iniciais utilizando protocolos padronizados comuns a todos, no nível-público crítica, para elucidar a sustentação do fardo de risco para o desnutrição e doenças entéricas. Esse entendimento aumentará nosso conhecimento de seus efeitos no desenvolvimento e crescimento físico e cognitivo e a susceptibilidade às doenças e sua resposta às intervenções de saúde pública em crianças de países em desenvolvimento; 3. Estabelecer mecanismos que permitam neste projeto financiados que possam ser aplicados no desenvolvimento de políticas e intervenções de saúde pública; 4. Desenvolver ferramentas que permitam extrair os achados desses estudos para outras populações em que há quantificação precisa da prevalência de doenças.

Este projeto será executado através de três principais atividades: 1. Estabelecer uma estrutura administrativa para desenvolver e gerenciar uma rede multicêntrica em países em desenvolvimento para estudar a desnutrição e infecções entéricas; 2. Conduzir um estudo epidemiológico longitudinal prospectivo e de caso-controle para identificar os fatores associados com o risco de infecções entéricas, diarreia crônica, desnutrição, assim como comprometimento da função intestinal, resposta às vacinas e desenvolvimento e coletar dados fisiológicos e ambientais nos centros de pesquisa, permitir a integração de futuros estudos através das colaborações de pesquisa e atividades de pesquisa em parceria, desígnios para reduzir a mortalidade infantil; 3. Desenvolver e testar modelos temporais e geoespaciais, utilizando dados de fontes secundárias, assim como dados primários, para estimar a

Outra fonte: CEPID #1028211

desenvolvimento e subrecarga da desnutrição e infecções intestinais, assim como, as benéficas alterações de várias intervenções.

A rede multicêntrica proposta aqui irá obter dados e amostras para avaliar a contribuição de cada um desses fatores para ocorrência e suas consequências. Espera-se não apenas encontrar associações e partir destas estudar observacionais, mas produzir novas hipóteses e serem testadas, e também proporcionar uma infraestrutura colaborativa para apoiar financiamentos para descobertas científicas. A partir da natureza de acordos, espera-se que essa rede forme uma ponte para estudos colaborativos em saúde e desenvolvimento infantil em áreas com menos recursos.

O protocolo propõe a nível internacional um estudo multicêntrico epidemiológico para estabelecer a relação entre as várias infecções intestinais, desnutrição e relação nutricional em crianças desde o nascimento até a idade de 24 meses em países em desenvolvimento. Incluem a avaliação de dados geográficos, ambientais, socioeconômicos e diversidade de etiologias. Será conduzido na Ásia, América do Sul e África em três populações bem estabelecidas, utilizando uma agenda de pesquisa com ênfase para função intestinal, microbiologia, antropometria, nutrição, função cognitiva e imunogenética de vacinas orais, bem como vigilância em comunidade para doenças infecciosas. O estudo envolve a mistura de comunidades urbanas e rurais, com média e alta prevalência de infecções intestinais e baixa cobertura, com uma intervenção alvo para ter um impacto significativo no resgate da infecção intestinal e desnutrição.

O estudo envolve os aspectos de saúde desde longitudinal e estudo caso-controle. No estudo de coorte longitudinal o desenho do estudo inclui prospectivo e longitudinal permitirá capturar o tempo e a sequência dos episódios de diarreia e as ligações destes com a função intestinal, indicadores nutricionais e métodos de crescimento e desenvolvimento. Após realização de TGLT, muitas grávidas terão seguimento regularmente e a partir do nascimento do criança a mesma será seguida por, no máximo, 24 meses de idade. Nesse período será avaliada a função intestinal, microbiologia, estado nutricional, rituais e a função cognitiva das crianças. Cada local de estudo irá estudar cerca de 200 crianças na escola. A vigilância ativa geral e para doenças infecciosas irá incluir visitas semanais (2x) nas casas para seguimento das crianças do estudo. Todos os locais deverão nos participantes, padrões regionais de qualidade para o tratamento de doenças comumente observadas.

O estudo caso-controle será realizado no Brasil e Bangladesh. Casos e controles serão identificados em áreas comunitárias e clínicas. O desenho do estudo seguirá com 500 casos e 500 controles, residentes por idade e comunidade (em cada local), idade de 6 a 24 meses, seguidos no 1^o, 2^o, 8^o e 12^o meses. Cada local deve manter um número de frequência mínima de testes e avaliações, incluindo prova funcional intestinal, medição antropométrica, dosagem de micronutrientes, imunogenética vacinal e avaliação da função cognitiva testes R 25, 34, e 35. No admissível, as características familiares e Q1 maternas serão verificadas.

Local de realização

Trata-se de um projeto internacional multicêntrico, com cooperação estrangeira que no Brasil será realizado em um só centro. Além do Brasil, participantes do estudo, na América do Sul (Brasil e Peru), na África (África do Sul e Tanzânia) e na Ásia (Índia, Bangladesh, Paquistão e Nepal). Foi apresentado documento de aprovação do estudo nos EUA (página 07 a 17-01, número do CEP). Além disso, consta documento referido "Esclarecimento de não participação americana no estudo" (página 11, numeração do CEP) em que o pesquisador nepalês informa que a Universidade de Virginia (EUA) terá o direito de submissão de uma parte do projeto, porém por não ser um país em desenvolvimento, as atividades do protocolo não serão realizadas em tal país. Na "Declaração de uso de direito do material biológico e dados coletados"

Item Anexo CDNEP nº 002016

página 13, numeração do CEP) o pesquisador responsável informa que os materiais biológicos e dados pessoais serão utilizados de acordo com as orientações estabelecidas no presente projeto e que o "possível envio dos mesmos para o exterior seguirá as direções exigidas pela Resolução CNS 347/2005".

As todo o projeto o recrutamento de 1200 sujeitos da pesquisa no estudo, todos no perfil em tela. Foi apresentada "Declaração de Infra-estrutura das instalações da UFPA (página 09-10, numeração do CEP), demonstrando que o centro em tela se encontra adequado para realização do estudo.

Aprovação do protocolo

A falta de risco encontra-se preventiva e eliminada.

Na "Declaração de Compromisso com o Projeto" (página 12, numeração do CEP) o pesquisador responsável informa que o mesmo fez parte da equipe idealizadora do projeto e que está plenamente de acordo com o mesmo. Consta (p. 08, numeração do CEP) Declaração do Presidente do IPREDE (Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento e Responsabilidade) estabelecida a realização da pesquisa na instituição, bem como Declaração de Infra-estrutura das instalações da UFPA (Unidade de Pesquisa Clínica da Universidade Federal do Pará), demonstrando a sua adequação para a realização do estudo. Consta Declaração de Compromisso do pesquisador principal quanto ao cumprimento das Resoluções 195/96 e 347/2004 do CNS.

O orçamento financeiro (página 16, numeração do CEP) informa que o valor total previsto para o estudo em tela é de R\$ 2.501.197,95.

O currículo do pesquisador responsável (páginas 109-132, numeração do CEP) demonstra que o mesmo se encontra apto para condução do estudo.

Foram apresentadas nos moldes do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para participação no estudo COHORT (páginas 104-106, numeração do CEP) e para participação no estudo CASE-CONTROL (página 107, numeração do CEP), ambas redigidas em linguagem clara e objetiva e em formato simples.

Comentários/Considerações

1. Nas páginas 106 e 107 dos TCLEs (numeração do CEP) encontramos a alternativa: "Armazenaremos saliva e sangue de sua criança, urina, fezes e DNA coletadas como parte deste estudo em câmaras seguras de armazenamento, sob um congelador, que foram localizadas em salas que podem abrigar outros estudos por algum membro de nossa equipe científica. Algumas dessas amostras coletadas poderão ser enviadas a um laboratório na Universidade de Virginia(SUA) para obter resultados de testes iguais à doença e identificação. Todas as amostras serão codificadas com número, assim não terá nenhuma identificação das informações (do id, nome e endereço) e serão associadas com os resultados de seus testes. Se você mudar de ideia sobre manter suas amostras você poderá entrar em contato com a equipe e as suas amostras serão destruídas. Caso você concorde em participar deste estudo suas amostras ficarão armazenadas e sob a responsabilidade do grupo de estudo durante no dia todo da realização do estudo". Solicita-se, portanto, esclarecimento sobre a formação de banco de materiais e, em caso afirmativo de constituição do banco, é necessário apresentar os documentos cabíveis regulamentados pelas Resoluções CNS 347/2004 (para coleta genética) e 347/2005, incluindo a definição de como se dará a autorização para uso do material armazenado após cinco anos, de acordo com as Resoluções supracitadas.
2. Nas mesmas páginas dos TCLEs (106 e 107, numeração do CEP), encontramos ainda a alternativa: "Não existem mais vinculados a este estudo". Solicita-se

Em Resposta CONEP 174/2014

identificação de meios, uma vez que, conforme disposto na Resolução CNS 196/96 que trata sobre os seus itens V: Considera-se que toda pesquisa envolvendo seres humanos envolve risco. O dado eventual poderá ser incluído no termo, compreendendo o indivíduo ou a comunidade. Solicita-se atenuação do risco.

2. Solicita-se deixar explícito no TCLE a garantia do acesso de pesquisa sobre os direitos a indenização, conforme itens V.3, V.6 e V.7 da Resolução CNS 196/96
4. Solicita-se a inclusão do endereço do CEP no ítem "Onde eu posso contactar para Questões sobre Direitos sobre Sigilo de Pesquisa?"

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se por aguardar o atendimento de questões acima para emissão do seu parecer final.

Situação: Protocolo com pendência.

De acordo com a Resolução CNS 196/96, as pendências devem ser resolvidas exclusivamente pelo pesquisador responsável no prazo de 90 dias, a partir da data de envio do parecer pelo CONEP. Após esse prazo o protocolo será arquivado. A resposta do pesquisador responsável deve ser analisada pelo CEP com a emissão de parecer consultativo e, se aprovada, deve ser encaminhada à CONEP. Solicita-se ainda que as respostas sejam enviadas de forma ordenada, conforme os itens de constatação deste parecer, e a indicação da localização das possíveis alterações no protocolo.

Brasília, 22 de janeiro de 2014.


Gisele Garcia Taveira
Coordenadora de CONEP/CEP/MS

ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

APÊNDICES

APÊNDICE A: TCLE

Infecção Entérica e Desnutrição			Local do Estudo: Brasil
Estudo CASO-CONTROLE			
TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PESQUISA INTERNACIONAL			
IRB-HSR <#>	Versão #3	28Mar2010	Página 1 de 3

Nome Criança _____ PID # _____

Participante: Mãe: _____ PID # _____

– CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAR DE UM ESTUDO DE PESQUISA –

De Que Trata Este Estudo?

Doutores da Universidade Federal do Ceará, no Brasil, Universidade de Virginia, Universidade de Washington e Universidade Johns Hopkins, nos EUA estão tentando aprender sobre as causas de desnutrição em crianças pequenas em nossos países. Desnutrição é uma doença onde há uma quantidade inadequada de absorção dos nutrientes da comida que ingerimos. Isto tem várias causas. Uma causa é a falta de acesso adequado a comida. Em adição, desnutrição é provocada a infecções intestinais que pode mudar a utilização dos nutrientes. É também possível que a genética torne algumas crianças mais suscetíveis a desnutrição que outras.

Genes são fitas de material conhecido como DNA. É herança de nossos pais e os homens podem carregar os genes de muitos micróbios amigos que vivem em nosso corpo. Este esforço para aprender mais sobre as causas da desnutrição em crianças é um estudo de pesquisa.

Este projeto foi aprovado pelos comitês de ética em pesquisa nos países onde se fará o estudo, inclusive o Brasil.

A razão para este estudo de pesquisa é que a desnutrição é um grande problema em nosso país e a participação de sua criança neste estudo talvez conduza a novos caminhos de prevenção ou tratamento de desnutrição. Um possível benefício de sua participação pode ser melhorar a saúde de todos que vivem em nosso país e em outros países.

Você está sendo convidado a participar deste estudo porque a participação de sua criança talvez nos ajude a identificar o que causa desnutrição em crianças durante os primeiros 2 anos de vida. Este é o tempo onde a desnutrição pode ser muito comum e pode conduzir a longo prazo inabilidade se não tratada apropriadamente.

Os pesquisadores deste estudo são: Dr. Aldo Lima (UFC-Brasil), Dr. Álvaro Madureira (IPREDE-Brasil) e Dr. Richard Guerrant (UNV-EUA).

Este estudo será realizado em Fortaleza, Brasil.

O Que Acontecerá Durante o Estudo?

Se você aceitar que sua criança participe deste estudo nós faremos o seguinte:

- Avaliaremos sua criança no período de seleção e então depois de 3, 6, 9 e 12 meses (5 vezes) para:
 1. Medir sua altura, peso e circunferência da cabeça;
 2. Coletar informações sobre práticas de alimentação de sua criança;
- Avaliaremos sua criança no período de seleção e então depois de 6 meses (2 vezes) para:
 1. Coletar uma pequena amostra de saliva (equivalente a uma colher de chá) para isolar os genes da criança (DNA) na seleção apenas;
 2. Coletar uma pequena amostra de sangue (equivalente a uma colher de chá) para testar o nível de nutrientes no sangue;
 3. Entrevistar você (mãe) para perguntar sobre o ambiente familiar e sobre sua habilidade e modo para raciocinar e resolver problemas;
- Avaliaremos sua criança no período de seleção e então depois de 3 meses (2 vezes) para:
 1. Fazer sua criança beber uma solução de açúcar e coletar a urina dela 5 horas mais tarde;
 2. Coletar amostra de fezes para identificar e isolar micróbios e estudar os genes dos micróbios das fezes (DNA).
- Se sua criança for examinada a um centro de saúde, hospital ou médico, talvez possamos obter alguns resultados dos testes solicitados pelo médico.
- Entrevistaremos você (mãe) no início do estudo para medir sua altura e peso e coletar uma pequena amostra de saliva para isolar seu gene (DNA) e/ou sangue (equivalente a uma colher de chá) para determinar seu grupo sanguíneo. (Sua decisão em participar nesta parte do estudo é opcional e não afetará a participação de sua criança).

IRB-HSR
APPROVAL DATE: 8/10/10
EXPIRATION DATE: 8/9/14

Dr. Milton Pimenta Almeida
Coordenador Acadêmico de Cursos
de Pós-graduação
CONEP/UFCE

Infeção Estérica e Desnutrição		Local do Estudo: Brasil
Estado CASO-CONTROLE		
TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PESQUISA INTERNAZIONALE		
BR-05R < R >	Versão 03	28Ma2010
		Página 7 de 7

Armazenamos a saliva, o sangue, urina, fezes e DNA de sua criança coletadas como parte deste estudo em câmaras seguras de armazenamento, tais como congelador, que ficam localizados em salas que podem apenas serem acessadas por algum membro de nossa equipe científica. Algumas dessas amostras coletadas poderão ser enviadas a um laboratório na Universidade da Virgínia (EUA) para testes especializados. Todas as amostras serão codificadas com número, assim não terá nenhuma identificação das informações (isto é, nome e endereço) e serão associadas com as amostras ou resultados de seus testes. Se você mudar de ideia sobre manter estas amostras você poderá entrar em contato com a equipe e as amostras serão destruídas. Caso você concorde em participar deste estudo suas amostras ficarão associadas a sob a responsabilidade do grupo de estudo durante os cinco anos de realização do estudo.

Esta Pesquisa Poderá Ajudar-me?

Os benefícios para você ao entrar neste estudo é que poderemos determinar a causa da desnutrição de sua criança e recomendar-lhe para serviços de saúde locais para tratamento apropriado. Sua criança poderá ser beneficiada com a monitoração e a promoção do peso que deverá acontecer aos 0, 3, 6, 9 e 12m de estudo. O doutor ou o investigador informará sobre qualquer situação durante o estudo que tenha importância para realizar cuidados médicos.

Esta Pesquisa Poderá Aumentar Risco?

Consideramos que toda pesquisa envolvendo seres humanos envolve risco, mesmo que seja mínimo. Algum dia eventual poderá ser invadido ou torturado, comprometendo o indivíduo ou a comunidade. Pode ser que você se sinta desconfortável ao responder o questionário e que você ou sua criança pode ter leve e temporária dor quando da coleta de sangue, além de poder surgir uma mancha ou resultado do estresseamento de sangue para fora do vaso sanguíneo.

Garantia em Caso de Danos

Não está previsto indenização ou ressarcimento ao sujeito participante deste estudo, porém o pesquisador responsável assume a responsabilidade de fornecer a assistência integral necessária referente às complicações e danos decorrentes de algum risco previsto.

Como Minha Privacidade Será Protegida?

Registros do estudo que o identificam (Ex.: Nome e Endereço) serão mantidos confidenciais e incluídos em um lugar seguro sob a responsabilidade do investigador principal local. Como registrado acima, as amostras de sua criança e os resultados dos testes serão codificados e armazenados separadamente para a análise pelos investigadores que estão trabalhando junto neste projeto nos diferentes locais do estudo. Assim asseguramos que nenhum investigador nem outros diferentes locais do estudo possa identificar sua criança como dentro destas amostras.

Outras pessoas que podem acessar os resultados dos seus testes e termo de consentimento são os serviços e agências nacionais e internacionais que cuidam desta pesquisa.

Como todos os testes serão feitos em todas as amostras coletadas as pessoas que manipularem estas amostras não saberão quem as doou porque elas serão codificadas.

Se você assinar este formulário, você dará permissão para divulgar a informação a todos os pesquisadores autorizados e ao comitê de segurança. Não existe data de validade para esta permissão. Esta informação, como toda informação gerada neste estudo, será codificada, impossibilitando alguém seguir você ou sua criança, ou seja, sua privacidade será protegida.

Em adição, também pedimos permissão para liberar informações sobre bactérias ao interesse de sua criança. Isto será liberado somente com sua permissão e sem nenhuma informação sua ou de sua criança associado a ele.

Eu Preciso Participar?

Você não precisa participar deste estudo se não quiser. Isto significa participação voluntária. Cabe a você decidir em entrar neste estudo de acordo com sua vontade. Se você não deseja participar deste estudo não assine este formulário.

Você pode interromper sua participação no estudo a qualquer hora. Se você decidir retirar sua criança do estudo entre em contato com os agentes de saúde ou com o pesquisador local para registrarmos sua saída. Também informe se você deseja que as amostras e de sua criança já coletadas sejam destruídas e os dados removidos do banco de dados.



Infeção Estérica e Desnutrição	Local do Estudo: Brasil
Estudo CASO-CONTROLE	
TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PESQUISA INTERDISCIPLINAR	
IBB-IBDR - 4 -	Versão #5 28Ma2018
	Página 3 de 3

Quer Eu Posso Contatar Para Questões Sobre Direitos Como Sujeito de Pesquisa?

Comitê de Ética em Pesquisa da UFPA (CONEP/UFPA), telefone: 3346.8338. Endereço: Rua Col. Nuno de Melo, 1127 Rodolfo Tinello CEP: 66.430-270
 Dr. Aldo Lima, Unidade de Pesquisa Clínica, UFC (telefone: 3346.8437);
 Dr. Álvaro Maduro, IPREDS (telefone: 3218.4000)

Assinatura

Por favor, pergunte sobre todas as questões que você precisar para ter certeza de que você entende o estudo antes de assinar este formulário.

 NOME DO PARTICIPANTE (ASSINATURA) NOME DO PARTICIPANTE (LETRA DE FORMA) DATA

 QUEM OBTVE O CONSENTIMENTO (ASSINATURA) QUEM OBTVE O CONSENTIMENTO (LETRA DE FORMA) DATA

Note para os Agentes de Saúde: No caso de pessoas iletradas, o termo de consentimento será lido para você com a presença de uma testemunha (não vinculada ao estudo) e uma impressão digital (do dedo) será obtida no lugar da assinatura. A testemunha também precisa assinar este formulário.

 NOME DA TESTEMUNHA (ASSINATURA) NOME DA TESTEMUNHA (LETRA DE FORMA) DATA

Dr. Álvaro Maduro
 Coordenador Geral do Comitê
 de Ética em Pesquisa
 (CONEP/UFPA)