

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

ANA KAROLINA SILVA DOS SANTOS

**Diagnóstico molecular e caracterização dos genes de virulência de infecção por
Escherichia coli enteropatogênica em crianças no Semiárido Brasileiro**

FORTALEZA- CE

2015

ANA KAROLINA SILVA DOS SANTOS

**Diagnóstico molecular e caracterização dos genes de virulência de infecção por
Escherichia coli enteropatogênica em crianças no Semiárido Brasileiro**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

D762d Dos Santos, Ana Karolina Silva.
Diagnóstico Molecular e caracterização dos genes de virulência de infecção por
Escherichia coli enteropatogênica em crianças no Semiárido Brasileiro / Ana Karolina Silva
Dos Santos. – 2015.
110 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2015.
Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

1. Escherichia coli enteropatogênica. 2. Genes de virulência. 3. Multiplex PCR. I. Título.

CDD 616.9

ANA KAROLINA SILVA DOS SANTOS

**Diagnóstico molecular e caracterização dos genes de virulência de infecção por
Escherichia coli enteropatogênica em crianças no Semiárido Brasileiro**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal

Aprovada em: 13 de Julho de 2015

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima (Orientador)

Universidade Federal do Ceará – UFC

Profª. Drª. Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira

Universidade Federal do Ceará – UFC

Profº. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

Universidade Estadual do Ceará – UECE

A DEUS, por me dar força de espírito.

Aos meus pais Mário e Josenira, pelo amor e incentivo.

Aos meus tios José Alexandre e Perpétua, pelo apoio e por me incentivarem a vir para Fortaleza.

A todos familiares e amigos que contribuíram para esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Os meus mais sinceros agradecimentos á Deus, pela proteção e amparo durante vários momentos ao longo dessa minha jornada, e principalmente, por ter colocado pessoas certas, nas horas certas em minha vida.

Ao Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, meu orientador, pelo exemplo de profissionalismo e comprometimento com o conhecimento científico, pelos ensinamentos, compreensão e apoio, e, principalmente pela oportunidade de realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá, pelos momentos em que se dedicou a me auxiliar durante a execução da pesquisa.

À Dra. Ila Fernanda Nunes por todos os ensinamentos e auxílio na área da microbiologia.

À Dra. Marjorie Moreira Guedes pelos conhecimentos e por toda sua alegria e convivência no laboratório.

Aos meus amigos de laboratório, Mara Prata e Pedro Henrique Quintela. Muito obrigada por sempre estarem dispostos, prestativos e atenciosos a me ajudar. Pela amizade, apoio, sabedoria, paciência e por todo o conhecimento transmitido. Vocês foram fundamentais para esse trabalho.

À toda a família do Laboratório de Doenças Infecciosas pela grande amizade, convivência e troca de experiência: Herlice do Nascimento Veras, Paloma Araújo Cavalcante, Advane, Tamara Rodrigues e Antonio Vinícios da Silva. Todos vocês são muito especiais para mim. Muito obrigada por tudo.

Aos demais pós-graduandos, alunos de iniciação científica e voluntária do Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI), da Unidade de Pesquisas Clínicas Instituto de Biomedicina (UPC/IBIMED), da UFC, Marília Gurgel, Rafaela Pankov, Samilly Ribeiro, Mariana Bona e Bárbara da Silva pela companhia, incentivo e apoio principalmente nas extrações de RNA e nas reações de PCR.

Ao funcionário, José Amadeus, pela dedicação ao funcionamento desta unidade e, conseqüentemente, de todos os trabalhos nela desenvolvidos.

Ao Charles Melo e Kátia Lima Nogueira, pelo esforço e paciência na administração deste e de todos os outros estudos em curso na UPC/IBIMED.

Aos funcionários do Sistema de Segurança e Gerenciamento de Dados (SSGD), da UPC/IBIMED, José Quirino Filho e Francisco de Sousa Júnior, pela confecção dos mapas e digitação, verificação e análise parcial dos dados coletados.

Às técnicas Verônica Oliveira, Conceição Nogueira, Terezinha de Jesus, Luciana França e Charliene Melo por seu auxílio na preparação de soluções, cuidado e organização do laboratório.

Aos colegas, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da UFC, pela atenção durante esses anos.

À secretaria da pós-graduação em Microbiologia Médica da UFC, Carolinda Vilma Soares de Oliveira, por todo carinho, simpatia, ajuda e atenção.

Á todos os alunos do Laboratório de Doenças Infecciosas e a todos os funcionários da UPC/IBIMED que contribuíram de alguma forma para esse trabalho.

As minhas companheiras de convivência diária, Samara Rodrigues, Herlice do Nascimento e Marielle Pires, pela amizade, paciência, apoio, carinho, incentivo e por todas as alegrias durante esse tempo de convivência. Amo vocês!

Á Universidade Federal do Ceará (UFC), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional.

A todos os pais e responsáveis das crianças envolvidas nesse estudo, por permitirem a coleta de amostras, contribuindo para o avanço das pesquisas, mesmo diante de tantas dificuldades.

A CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

A todos... Muito Obrigada!

“...o choro pode durar uma
noite, mas a alegria vem
pela manhã”

Salmos 30.5b

RESUMO

As cepas *Escherichia coli* diarreiogênicas (DEC) são importantes patógenos associados às infecções intestinais. Dentre estes, a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) é um dos agentes

etiológicos mais relevantes para o diagnóstico de diarreias em infantes. Contudo a epidemiologia das infecções por esses patógenos permanecem pouco elucidadas em grande parte do mundo. Este trabalho objetivou avaliar o impacto da infecção por EPEC em crianças com e sem diarreia de 2-36 meses de vida no Semiárido Brasileiro, em estudo do tipo observacional caso-controle, que também examinou a presença ou ausência de diarreia nas crianças participantes. A população estudada consistiu em 730 crianças, 365 casos e 365 controles, sendo os casos, crianças com histórico de diarreia nos 14 dias antes à seleção para o estudo. Foram avaliados parâmetros socioeconômicos através de questionário epidemiológico. O diagnóstico de EPEC foi realizado pela técnica de xMAP (Bioplex 200) com base nos genes *eaeA* (cromossomal) e *bfpA* (plasmidial). As amostras identificadas como EPEC foram analisadas por cinco Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) do tipo Multiplex para 19 fatores de virulência de EPEC amplamente investigados na literatura: *espB*, *espD*, *tir*, *espC*, *espZ*, *espL*, *Ler*, *Map*, *espG*, *espH*, *nleE*, *nleF*, *nleB*, *paa*, *nleC*, *nleD*, *espJ*, *cesT* e *espP*. Entre as 730 crianças, a EPEC foi diagnosticada em 118 crianças. A EPEC típica mostrou-se em 1,7% dos casos (6/365) e em 0,6% dos controles (2/365). Enquanto a EPEC atípica foi detectado em 13,7% dos casos (50/365) e 16,4% dos controles (60/365). E de todas as amostras de EPEC isoladas, os genes *ler*, *cesT*, *espB* e *espG* foram os mais prevalentes (67,7%; 58,4%; 54,2%; e 52,5%), respectivamente. Estes estão associados com a regulação global da ilha de patogenicidade da bactéria, assim como a secreção e a translocação de diversas proteínas efetoras para dentro da célula do hospedeiro, e a destruição de micro túbulos e ruptura das junções firmes entre as células intestinais. Em contrapartida, o gene de menor prevalência foi o *tir* (4,2% - 5/118), importante componente para a aderência bacteriana a célula do hospedeiro. A prevalência do gene *espD*, associado com a proteína de translocação dos poros da membrana de lipossacarídeo, foi significativamente associado com os casos ($p=0,0354$) quando comparados com os controles. Na análise de combinação hierárquica dos genes de virulência os dados sugerem que três grupos de genes que foram importantes e associados com os casos comparados com os controles. A presença do gene *Paa*, relacionado com a proteína associado a lesão de aderência do enterócito, mas na ausência de outros genes de virulência como o *espH*, *espJ* e *espG*, relacionados com polimerização de actina, inibição de fagocitose e bloqueador de translocação de efector T3SS, respectivamente, estão associados com os casos comparados com os controles. Um conjunto de genes de virulência, a presença de *espJ* e na ausência de *nleF*. E outro conjunto de genes de virulência, com presença de *espC*, e na ausência de *espP*. Os dados mostraram também que nas combinações hierárquicas dos genes de virulência, tais como a presença de *espJ* e na ausência de *nleF*, bem como a presença de *espG* e na ausência de *tir* foram associados com proteção nos

controles comparados com os casos. Os dados sugerem que a prevalência de EPEC é relativamente alta nesta população infantil no semiárido brasileiro.

ABSTRACT

The Escherichia coli diarrheagenic (DEC) are important pathogens associated with intestinal infections. Among these, Escherichia coli (EPEC) is one of the most important etiological agents

for the diagnosis of diarrhea in infants. However, the epidemiology of infections by these pathogens remain poorly elucidated in much of the world, so this study aimed to evaluate the impact of EPEC infection in children with and without diarrhea 2-36 months of life of the Brazilian semi-arid, study type observational case-control, which also examined the presence or absence of diarrhea in children participating. The study population consisted of 365 cases and 365 controls, and the cases, children with diarrhea history in the 14 days before you check for the study. Socioeconomic parameters were evaluated through epidemiological questionnaire. The diagnosis of EPEC was carried out by xMAP (Bioplex 200) based on the *eaeA* genes (chromosomal) and *bfpA* (plasmid). Samples identified as EPEC were analyzed for five Polymerase Chain Reactions (PCR) of the Multiplex type for 19 EPEC virulence factors widely investigated in literature: *espB*, *espD*, *tir*, *espC*, *espZ*, *espL*, *Ler*, *Map*, *espG*, *espH*, *nleE*, *nleF*, *nleB*, *paa*, *nleC*, *nleD*, *espJ*, *cesT* and *espP*. Among the 730 children, EPEC was diagnosed in 118 children. The typical EPEC proved in 1.7% of cases (6/365) and 0.6% of controls (2/635). While atypical EPEC was detected in 13.7% of cases (50/365) and 16.4% of controls (60/365). And all samples isolated EPEC genes read, *cesT*, and *espB* were the most prevalent (67.7%; 58.4%; 54.2% and 52.5%) respectively. These are associated with the global regulation of pathogenicity island bacteria, as well as the secretion and translocation various effector proteins into the host cell, and microtubule destruction and disruption tight junctions. In contrast, the lowest prevalence of the *tir* gene was (4,2% - 5/118), an important component of bacterial adhesion to host cell. The prevalence of the *espD* gene, associated with liposaccharide membrane pore translocation protein, was significantly associated with cases ($p = 0.0354$) as compared to controls. In the hierarchical combination analysis of the virulence genes the data suggest that three groups of genes were important and associated with the cases compared to the controls. The presence of the *Paa* gene, related to the protein associated with enterocyte adhesion injury, but in the absence of other virulence genes such as *espH*, *espJ* and *espG*, related to actin polymerization, inhibition of phagocytosis and effector translocation blocker T3SS, Respectively, are associated with cases compared to controls. A set of virulence genes, the presence of *espJ* and in the absence of *nleF*. And another set of virulence genes, with presence of *espC*, and in the absence of *espP*. The data also showed that in the hierarchical combinations of the virulence genes, such as the presence of *espP* and in the absence of *nleF*, as well as the presence of *espG* and in the absence of *tir* were associated with protection in the controls compared to the cases. The data suggest that the prevalence of EPEC is relatively high in this child population in the Brazilian semi-arid region.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Ciclo vicioso Diarreia x Desnutrição: Relações causais e consequências para a sociedade	23
-----------------	--	-----------

FIGURA 2	Micrografia eletrônica de varredura de <i>E. coli</i> em cultura, mostrando sua morfologia em bacilo	25
FIGURA 3	Contribuição dos elementos genéticos móveis para evolução de <i>E. coli</i> patogênica	26
FIGURA 4	Diferentes tipos de padrão de aderência das cepas de EPEC	29
FIGURA 5	Representação esquemática dos três estágios de patogênese de EPEC	32
FIGURA 6	Representação esquemática do Sistema de Secreção do Tipo III	33
FIGURA 7	Estágio da infecção por EPEC e a interação entre intimina/<i>Tir</i>	34
FIGURA 8	Visualização das bandas obtidas após amplificação por PCR dos genes de fatores de virulência	51
FIGURA 9	Modelo de árvore para genes de virulência em amostras de casos e controles para EPEC. A presença ou ausência de cada gene entre os grupos estudados é dada dentro de cada nó.	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Genes de diagnóstico relacionados com as <i>Escherichia coli</i> diarreiogênicas, iniciadores utilizados e tamanhos dos	50
-----------------	--	-----------

produtos

TABELA 2	Genes de virulência investigados do estudo com suas respectivas funções elucidadas	52
TABELA 3	Genes alvo, iniciadores utilizados e tamanhos dos produtos obtidos	53
TABELA 4	Detalhes da população estudada e informações socioeconômicas das 730 crianças do estudo	59
TABELA 5	Distribuição da população incluída no estudo de acordo com o local de origem e o número de crianças por residência	61
TABELA 6	Medidas de resumo dos dados antropométricos coletados da população de estudo	62
TABELA 7	Distribuição da população de estudo quanto à ocorrência de diarreia nos últimos 14 dias	62
TABELA 8	Prevalência de agentes etiológicos relacionados á diarreia em crianças no Semiárido Brasileiro	63
TABELA 9	Prevalência de EPEC em crianças das cidades de Crato-CE, Picos-PI, Ouricuri-PE e Cajazeiras-PB	64
TABELA 10	Caracterização dos parâmetros clínicos relacionados com o grupo caso	65
TABELA 11	Distribuição de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica por cidades do estudo em relação ao grupo caso e controle	67
TABELA 12	Distribuição de EPEC típica e atípica relacionadas as cidades do presente estudo	68
TABELA 13	Percentual de positividade dos genes codificadores de fatores de virulência isolados entre amostras positivas para EPEC dos grupos caso e controle	69
TABELA 14	Percentual de positividade dos genes de virulência para EPEC típica e EPEC atípica	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/E	Lesão intestinal denominada <i>attaching and effacing</i>
AA	Padrão de aderência agregativa
AD	Padrão de aderência difusa
aEPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica atípica
AL	Aderência localizada
ALL	Aderência localizada like
BFP	<i>Bundle-forming pilus</i>
CE	Ceará
COMEPE/UFC	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente
DEC	<i>E. coli</i> diarréiogênicas
DNA	Ácido deoxirribonucléico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
eaeA	Gene cromossômico da <i>E. coli</i> enteropatogênica
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EAF	EPEC <i>adherence factor</i>
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
espB	Gene de Translocação dos poros
espC	Gene codificador da enterotoxina espC

espD	Proteína efetora secretada pelo SST3
espG	Proteína efetora (destruição de microtúbulos e ruptura de tight junctions)
espH	Proteína efetora (polimerização de actina)
espJ	Inibe fagocitose
espP	Gene que codifica a serina protease extracelular; autotransportadora
espZ	Bloqueador de translocação de efetores de SST3
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> extra-intestinal
F	Primer senso
HAZ	Altura-por-idade (<i>height-for-age</i>)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMC	Índice de massa corporal
LDI	Laboratório de Doenças Infecciosas
LEE	<i>Locus of enterocyte effacement</i>
Ler	Gene regulador de proteína
LT	Termo lábil
map	Proteína efetora da <i>E. coli</i> enteropatogênica <i>Mitochondrion-associated protein</i>
nleB	Gene que codifica a proteína não-LEE efetora B
nleC	Gene que codifica a proteína não-LEE efetora C
nleD	Gene que codifica a proteína não-LEE efetora D

nleE	Proteína efetora E não codificada por LEE
nleF	Proteína efetora F não codificada por LEE
OMS	Organização Mundial de Saúde
paa	Proteína associada á lesão A/E
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
R	Primer antísense
SSGD	Sistema de Segurança e Gerenciamento de Dados
SST3	Sistema de secreção do tipo 3
STEAC	<i>E. coli</i> agregativa produtora de Shiga-toxina
stx	Gene que codifica a proteína Shiga-toxina
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
tEPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica típica
TGI	Trato gastrointestinal
tir	Translocated intimin receptor
TRO	Terapia de re-hidratação oral
UFC	Universidade Federal do Ceará
UPC/IBIMED	Unidade de Pesquisas Clínicas/Instituto de Biomedicina
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
WAZ	Peso-por-idade (<i>weight-for-age</i>)
WHO	<i>World Health Organization</i>
WHZ	Peso-por-altura (<i>weight-for-height</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

Cm	Centímetros
G	Gramas
°C	Graus Celsius
H	Horas
Kg	Quilogramas
µg	Microgramas
µL	Microlitros
Mg	Miligramas
mL	Mililitros
Ng	Nanogramas
Pb	Pares de base
%	Por cento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO -----	19
1.1	DOENÇAS DIARREICAS -----	20
1.2	<i>ESCHERICHIA COLI</i> -----	23
1.3	<i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROPATOGÊNICA -----	26
1.3.1	Definição e Classificação -----	26
1.3.2	Diagnóstico -----	27
1.3.3	Epidemiologia -----	28
1.3.4	Patogênese -----	30
1.4	FATORES DE VIRULÊNCIA -----	33
2	JUSTIFICATIVA -----	36
3	OBJETIVOS -----	38
3.1	Objetivo Geral -----	39
3.2	Objetivos Específicos -----	39
4	MATERIAL E MÉTODOS -----	40
4.1	DESCRIÇÃO DO ESTUDO -----	41
4.1.1	Considerações Éticas -----	41
4.1.2	Tipo e Duração do Estudo -----	41
4.1.3	Local do Estudo -----	42
4.1.4	Critérios de Inclusão e Exclusão da população do Estudo -----	42
4.2	COLETA E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS -----	43
4.3	MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS -----	44

4.4	PROCESSO DAS AMOSTRAS FECAIS-----	44
4.5	DEFINIÇÃO DOS GRUPOS: CASOSXCONTROLES-----	44
4.6	EXTRAÇÃO DE DNA FECAL-----	45
4.7	QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO-----	46
4.8	DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR TECNOLOGIA XMAP-----	46
4.9	PESQUISA DE GENES RELACIONADOS A VIRULÊNCIA-----	48
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS-----	54
5	RESULTADOS -----	55
5.1	Caracterização da população estudada-----	56
5.2	Prevalência de EPEC-----	61
5.3	Dados Clínicos-----	63
5.4	Distribuição geográfica dos isolados de EPEC-----	64
5.5	Pesquisa dos genes de virulência de EPEC-----	66
6	DISCUSSÃO-----	73
7	CONCLUSÃO-----	83
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	85
	ANEXOS-----	102
ANEXO A	Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (COMEPE/UFC)-----	103
ANEXO B	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)-----	104
ANEXO C	Questionário epidemiológico-----	106

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS DIARREICAS

As infecções entéricas são de grande importância para a saúde pública mundial, caracterizando-se pela ruptura da barreira intestinal a partir da ação de bactérias, vírus ou parasitas, e avalia-se que um terço das crianças de países em desenvolvimento é acometido por infecções entéricas com ou sem eventos diarreicos (HODGES et al., 2010; GUERRANT et al., 2013). Além da alta prevalência, as doenças diarreicas continuam a ser uma das principais causas de morte em crianças menores de 5 anos de idade, principalmente em países em desenvolvimento, sendo responsável por 800 mil mortes por ano no mundo (LAMBERTI et al., 2012; LIU et al., 2010; LIU et al., 2012; KOTLOFF et al., 2013).

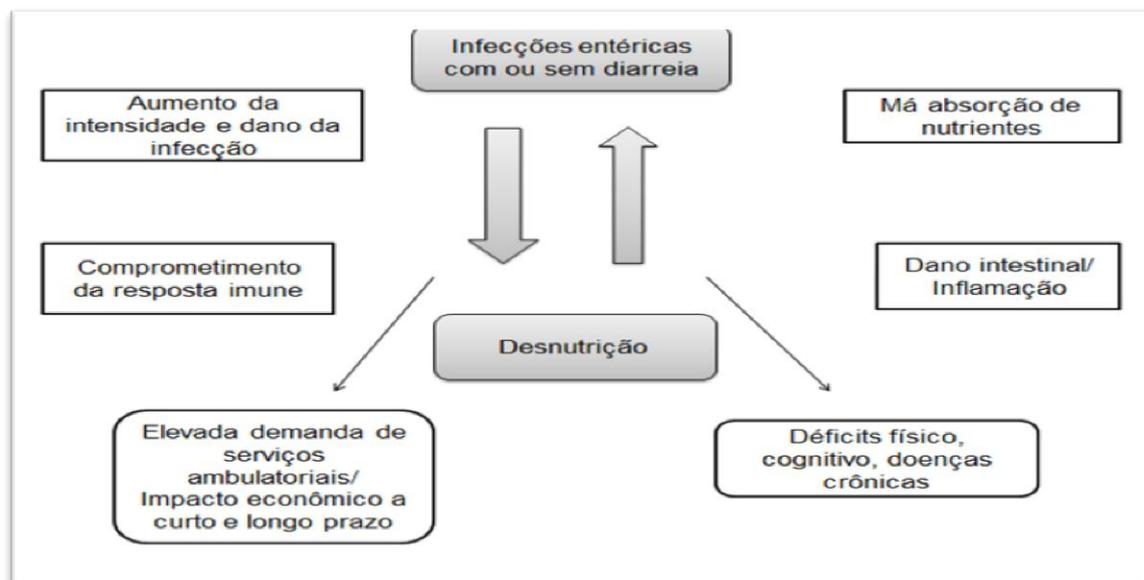
Nos últimos anos, o problema das doenças diarreicas tornou-se pauta relevante para as autoridades governamentais, principalmente em países em desenvolvimento. Desse modo, os esforços da Organização Mundial de Saúde e Governos em programar medidas de controle para o combate dessas doenças, como infecções entéricas com ou sem diarreia em crianças, bem como implementação da vacina para rotavírus, investimento em saneamento básico e a terapia do soro para reidratação oral (TRO), onde resultou na diminuição considerável das taxas de mortalidade, de 12,6 milhões de mortes/ano no início dos anos 90, para 6,6 milhões de mortes/ano, em 2012 (UNICEF, 2013). Contudo, ainda é alto o número de mortes por doenças diarreicas e, principalmente, a alta morbidade desta condição clínica permanece como alvo de preocupação mundial (BARTELT et al., 2013).

Em estudo coorte realizado no Brasil com crianças de uma comunidade carente de Fortaleza-Ceará, verificou-se que a desnutrição está associada a um maior risco de quadros de diarreia persistente (DP) (diarreia com duração maior ou igual 14 dias) e diarreia prolongada (com duração de 7 a 13 dias) causando um impacto negativo na população em questão, sendo os mesmos associados a condições higiênico-sanitárias precárias, desmame precoce e colonização intestinal (LIMA et al., 2000; MOORE et al., 2010).

Além da morbidade e mortalidade atribuível aos eventos diarreicos, a lesão da mucosa entérica que ocorre na diarreia leva à diminuição da absorção de nutrientes, insuficiência de crescimento e atraso cognitivo (KEUSCH et al., 2013; MOORE et al.,

2010). Outro importante fator de risco para a ocorrência de diarreias infecciosas é a desnutrição, devido ao comprometimento dos mecanismos de defesa imunológica. Em contrapartida, infecções entéricas persistentes podem prejudicar a capacidade absorptiva do indivíduo, levando a um quadro de desnutrição. Assim sendo, é desencadeado o que alguns autores relatam como ciclo vicioso diarreia-desnutrição (MOORE et al., 2010; GUERRANT, 2001).

Figura 1: Ciclo vicioso Diarreia x Desnutrição: Relações causais e consequências para a sociedade.



(Adaptado de GUERRANT et. al., 2013).

O impacto em longo prazo das doenças diarreicas e infecções entéricas na população infantil têm sido cada vez mais pesquisados. A ocorrência de diarreias persistentes e algumas infecções entéricas assintomáticas nos primeiros anos de vida pode prejudicar o crescimento da criança, bem como o seu desenvolvimento físico e cognitivo (BERKAMAN, 2002; NIEHAUS, 2002; FISCHER, 2012). Estudos atuais sugerem ainda que crianças com crescimento prejudicado e repetidas infecções entéricas são mais propícias a desenvolver obesidade e comorbidades cardiovasculares (DEBOER et al., 2012; GUERRANT et al., 2013). Além do que, as doenças diarreicas geram uma elevada demanda sobre os serviços ambulatoriais e, secundariamente, sobrecarregam a rede

hospitalar (VASCONCELOS et al., 2008). Neste sentido, o impacto econômico destas condições, a curto e em longo prazo para a sociedade, é supostamente negligenciado (BARTELT et al., 2013).

Neste sentido, as infecções entéricas sem eventos diarreicos não podem ser negligenciados. Alguns autores utiliza o termo “enteropatia ambiental” para estabelecer um agrupamento de alterações inespecíficas do intestino delgado, funcionais e morfológicas, sem manifestações clínicas visível, que afetam crianças oriundas de famílias com baixo nível socioeconômico e que vivem em situação de risco de vida, com elevada taxa de contaminação ambiental, ausência de saneamento básico, ingestão alimentar precária e desmame precoce (GUERRANT et al., 2013; MORAIS et al., 2003).

As infecções entéricas quando associadas à desnutrição podem levar a um retardo no crescimento na infância, que pode predispor a um maior risco de obesidade, diabetes do tipo 2, síndrome metabólica, e doenças cardiovasculares ao longo da vida, que são consideradas como importantes doenças que não são transmissíveis (SCHORLING et al, 1990; STOGER et al, 2008; GUERRANT et al, 2013).

Desse modo, emerge a necessidade de mudança no tipo de problema a ser investigado. Ao invés de focar atenção na diarreia, estudos relacionam que a colonização intestinal por patógenos pode causar danos silenciosos, de forma assintomática, até pouco tempo não descobertos (BARTELT et al., 2013; ENSERINK et al., 2014).

Estudos sugerem que crianças com crescimento afetado e repetidas infecções entéricas são mais propícias a desencadear doenças como, obesidade e comorbidades cardiovasculares (DEBOER et al., 2012; GUERRANT et al, 2013).

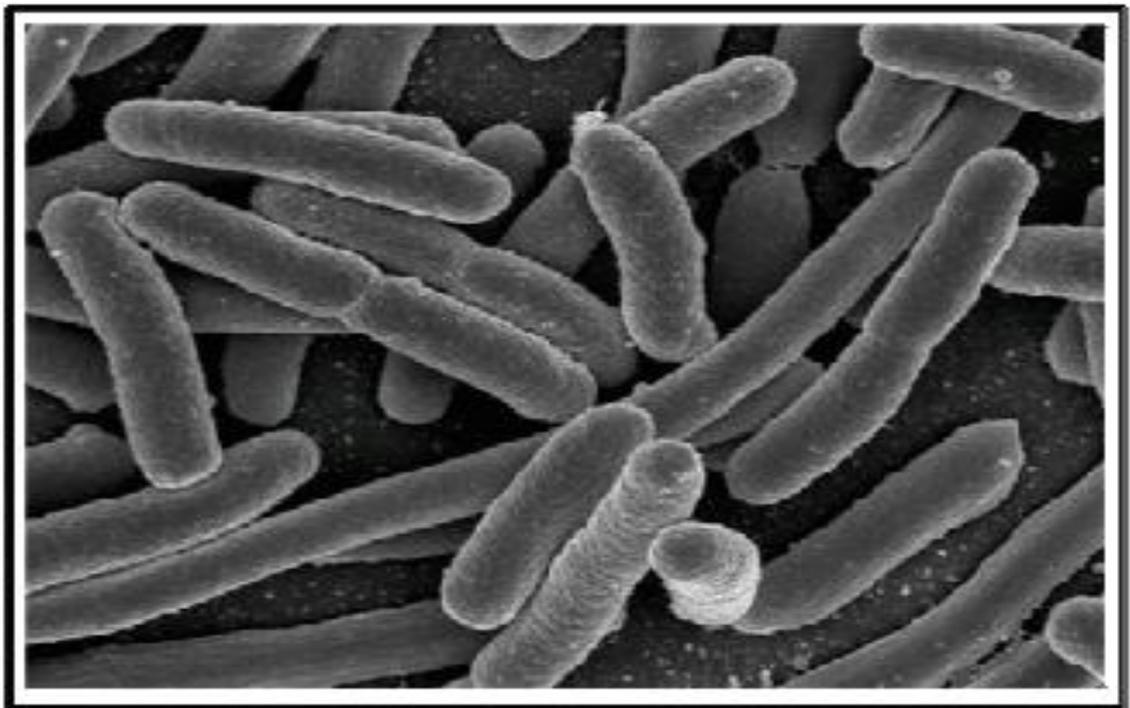
Muitos agentes patogênicos bacterianos, virais e protozoários estão associados às doenças diarreicas em crianças, como *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae*, *Clostridium difficile*, *Entamoeba histolytica*, *Cyclospora* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., adenovírus, rotavírus, noravírus entre outros (DHAMA et al., 2008; GUERRANT et al., 2001; LIMA et al., 2000; MOORE et al., 2010; SOLI et al., 2014). Dentre estes, a bactéria *Escherichia coli* é um dos principais patógenos associados as doenças diarreicas (PENNINGTON, 2010).

Em um estudo realizado na África e Ásia, quatro patógenos foram significativamente associados com diarreia moderada a grave: rotavírus, *Cryptosporidium*, *Shigella* e *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) (KOTLOF et al., 2013).

1.2 ESCHERICHIA COLI

A bactéria *Escherichia coli* é um bacilo Gram negativo, anaeróbio facultativo, que apresenta cepas móveis ou imóveis (CROXEN et al., 2010). É um membro da família *Enterobacteriaceae*, gênero *Escherichia* (**Figura 2**), tendo sido descrita pela primeira vez por Theodore Escherich em 1885, que a denominou de *Bacterium coli commune*, indicando a ocorrência universal desta bactéria no intestino de indivíduos saudáveis (NATARO; KAPER, 1998; RODRIGUEZ-ANGELEZ, 2002; VIDAL et al., 2007). As cepas comensais de *E. coli* faz parte da microbiota de animais e humanos, concentram-se principalmente na região mucosa do cólon dos mamíferos, sendo a principal bactéria que coloniza o trato gastrointestinal de humanos poucas horas após o nascimento (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Figura 2: Micrografia eletrônica de varredura de *E. coli* em cultura, mostrando sua morfologia em bacilo.

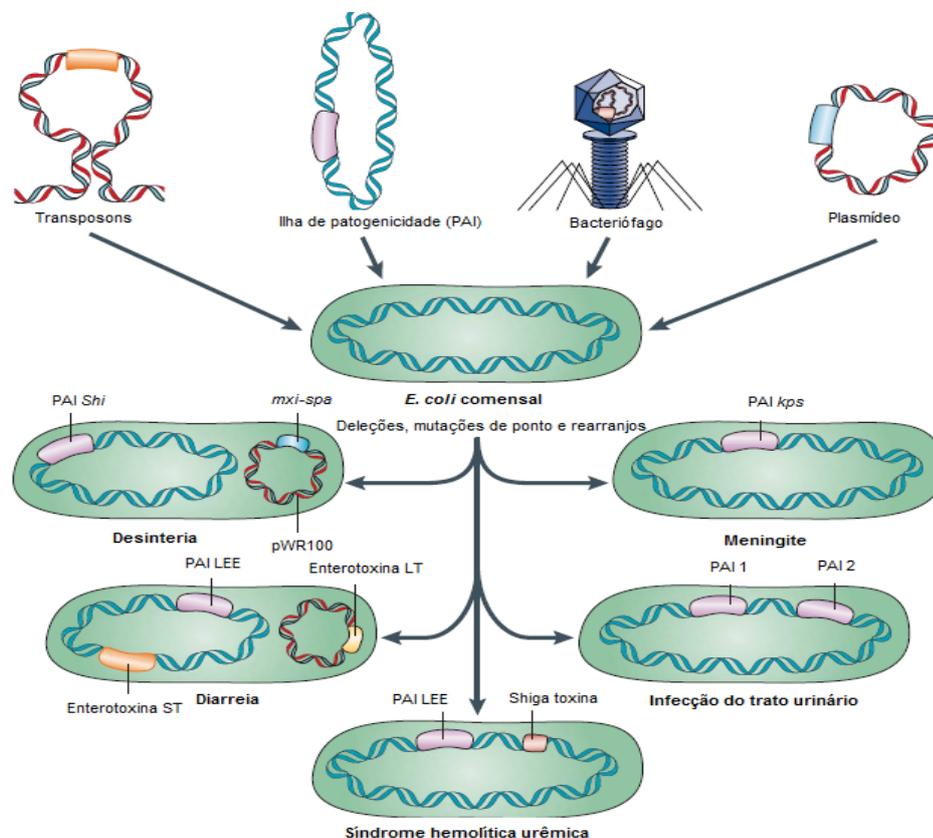


Fonte: www.nuepe.ufpr.br (2014)

Ainda que seja considerado um habitante natural da flora intestinal, algumas cepas de *E. coli* tem conquistado fatores de virulência específicos que lhes conferem a capacidade de se adaptar a novos nichos e se tornar um patógeno altamente adaptado capaz de causar um amplo espectro de doenças, desde gastroenterite, infecções extra intestinais do trato urinário, corrente sanguínea e sistema nervoso central (KAPER et al., 2004; CROXEN; FINLAY, 2010; TORRES, 2010).

A perda e ganho de elementos genéticos móveis tem um papel essencial na formação do genoma de bactérias patogênicas, pois os fatores de virulência de *E. coli* são codificados por vários elementos genéticos móveis, incluindo transposons, plasmídeos e bacteriófagos, além do que as cepas comensais também podem sofrer deleções, mutações de ponto ou outros rearranjos de DNA que podem contribuir para virulência (**FIGURA 3**) (KAPER et al., 2004; CROXEN; FINLAY, 2010; TORRES, 2010).

Figura 3 – Contribuição dos elementos genéticos móveis para evolução de *E. coli* patogênica.



Fonte: (Adaptado de KAPER et al., 2004, v.2, p.134)

Os fatores de virulência podem ser codificados por vários elementos genéticos móveis, adicionando transposons, plasmídeos, bacteriófago e ilhas de patogenicidade. *Escherichia coli* comensal pode sofrer deleções, mutações de ponto, ou outros rearranjos no DNA que podem contribuir para virulência da bactéria. Estas adições, deleções e outras mudanças genéticas pode dar origem a formas de *E. coli* patogênicas capaz de causar diarreia.

Com base nos sintomas e fatores de virulência específicos, *Escherichia coli* diarreio gênicas são classificadas em seis categorias: *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) e *Escherichia coli* difusamente aderente (DAEC) (CROXEN; FINLAY, 2013). Esta classificação tem por base os mecanismos de patogenicidade, síndromes clínicas, características epidemiológicas e interação com linhagens celulares (NATARO; KAPER, 1998).

Dentre as categorias de *E. coli* diarreio gênicas, EPEC foi o primeiro patotipo a ser descrito e continua sendo um importante agente etiológico de diarreia infantil em todo mundo, com elevada prevalência em ambientes hospitalares e comunidades carentes (WHO, 2002). Considerada uma das principais causas de diarreia em crianças menores de dois anos em países em desenvolvimento (VIDAL et al., 2007; CROXEN; FINLAY, 2013).

Nos próximos tópicos serão abordados temas relacionados à EPEC, incluindo o histórico da descrição da bactéria e de sua associação com o desenvolvimento de diarreia, epidemiologia, o papel dos fatores de virulência descritos, fisiopatologia, diagnóstico e caracterização das cepas.

1.3 ESCHERICHIA COLI ENTEROPATOGÊNICA (EPEC)

Escherichia coli enteropatogênica (EPEC), foi descrita, pela primeira vez, em 1955, quando uma série de cepas de *E. coli* foram epidemiologicamente associados a surtos, entre 1940 e 1950, em crianças (NETER et al., 1955).

Dentre os patógenos entéricos mais prevalentes, a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) se apresenta como uma das mais importantes. A EPEC é

frequentemente relacionada à diarreia em diferentes populações, sendo mais prevalente em crianças de países em desenvolvimento e rara em países desenvolvidos (OCHOA et al., 2012). Estudos mostram que a duração da diarreia em EPEC é mais prolongada (KOSEK et al., 2001; LIMA, 1997). No Brasil, EPEC está relacionada à cerca de 10% dos casos de diarreia em crianças (ARAÚJO et al., 2007; BUERIS et al., 2007; DE MOURA et al., 2012).

1.3.1 DEFINIÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E DIAGNÓSTICO

EPEC foi inicialmente classificada com base na sua identificação por meio de testes sorológicos dos antígenos O e H e que se associou com os casos de diarreia infantil, recebendo este nome a fim de se diferenciar este tipo virulento de *E. coli* das cepas comensais presentes na microbiota humana (TRABULSI et al., 2002; VIDAL et al., 2007; WONG et al., 2011; ARENAS-HERNANDEZ et al., 2012). Com um maior conhecimento sobre esse patógeno, EPEC pertence a um grupo de bactérias conhecidas por causar uma lesão típica, denominada lesão “attaching/effacing” ou lesão A/E, patógenos com base na sua capacidade de formar lesões distintas sobre as superfícies de células epiteliais intestinais (CROXEN et al., 2010; WONG et al., 2011). Neste contexto, o diagnóstico de EPEC tem se baseado em técnicas moleculares que investiguem a presença de gene *eaeA* (codificador da adesina intimina), sendo classificadas como EPEC típica ou atípica pela presença ou ausência do gene *bfpA* (codificador da pili formadora de feixe), respectivamente (DONNENBERG et al., 2013). Dados recentes sugerem que EPEC atípica são mais prevalentes do que EPEC típica em ambos os países desenvolvidos e em desenvolvimento (OCHOA et al., 2012).

As cepas de EPEC são capazes de produzir esta lesão A/E devido a determinantes específicos de virulência codificados por um plasmídeo denominado “EPEC *Adherence Factor*” (EAF) e por uma ilha de patogenicidade cromossomal chamada de “*Locus of Enterocyte Effacement*” (LEE) (ARENAS-HERNANDEZ et al., 2012; CROXEN; FINLAY, 2010; DEAN et al., 2005; NATARO; KAPER, 1998).

As cepas de EPEC são consideradas típicas quando possuem a região LEE, e possuem o plasmídeo EAF, que codifica o BFP, responsável pelo fenótipo de aderência localizada (AL), enquanto as cepas de EPEC atípicas caracterizam-se apenas pela

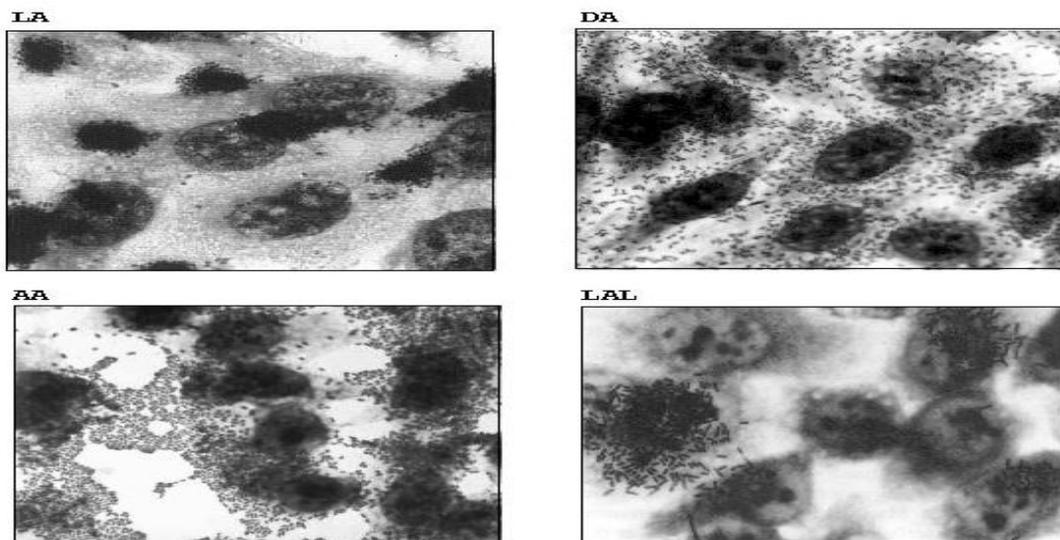
presença da região LEE, não possuindo o plasmídeo EAF (AFSET et al., 2003; RODRIGUEZ-ANGELES, 2002).

Outro teste fenotípico para o diagnóstico de EPEC é o padrão de aderência bacteriana às células HEp-2 ou HeLa, células humanas de linhagem de carcinoma laríngeo e de colo uterino, respectivamente (NATARO et al., 1998). Quatro tipos de padrão de aderência foram descritos e relacionados com EPEC típica e EPEC atípica.

As cepas de EPEC típicas são classificadas como *E. coli* diarreiogênicas e apresentam uma importante característica que é o padrão de aderência localizado – LA (*localized adherence*), sendo este padrão associado com a expressão do gene *bfpA* (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

Outra característica que distingue a EPEC atípica é o padrão de adesão em cultura de células epiteliais, podendo apresentar a adesão conhecida como aderência localizada-like - LAL (*localized adherence-like*) (RODRIGUES et al., 1996), aderência difusa - DA (*diffused adherence*) e aderência agregativa – AA (*aggregative adherence*). O padrão DA também é observado em cepas de EHEC e o padrão AA é característico de cepas de EAEC (ABE et al., 2009; HERNANDES et al., 2009; TRABULSI et al., 2002) (**Figura 4**).

Figura 4 – Diferentes tipos de padrão de aderência das cepas de EPEC.



Fonte: Trabulsi; Keller; Gomes (2002).

1.3.2 EPIDEMIOLOGIA

EPEC está entre os patógenos mais importantes de infecção em crianças menores de 2 anos de idade, nos países em desenvolvimento (OCHOA et al., 2008). A prevalência de EPEC varia de acordo com, as diferenças na população de estudo, faixa etária, critérios de diagnóstico, e métodos utilizados para o diagnóstico. Com base em métodos moleculares, atualmente EPEC é responsável, em média, por 5-10% dos episódios de diarreia infantil nos países em desenvolvimento (OCHOA et al., 2012). Quando o diagnóstico foi feito com base no padrão de aderência HEp-2 ou sorotipagem, as taxas de prevalência estimada de EPEC foram maiores, em média, 10-20%, com uma grande variabilidade entre os estudos (OCHOA et al., 2008).

Além disso, a região geográfica e classe socioeconômica também podem contribuir para a epidemiologia da doença diarreica induzida por EPEC (MARANHÃO et al., 2008).

Estudos realizados no Brasil revelaram uma frequência de cerca de 10% de EPEC nas fezes de crianças com diarreia, principalmente quando relacionado, com o nível socioeconômico (ARAÚJO et al., 2007; BUERIS et al., 2007; DE MOURA et al., 2012).

EPEC típica (tEPEC) têm sido considerada por muitos anos como a principal causa de diarreia infantil nos países em desenvolvimento e foram consideradas raras em países industrializados, onde EPEC atípica (aEPEC) parecia ser uma causa mais importante de diarreia (AFSET et al., 2003; TRABULSI et al., 2002). No entanto, dados recentes sugerem que aEPEC são mais prevalentes do que tEPEC em ambos os países desenvolvidos e em desenvolvimento. No geral aEPEC foram responsáveis por 78% de todos os casos de EPEC em crianças menores de 5 anos de idade com diarreia (com base em um estudo) (OCHOA et al., 2008). Estes resultados reforçam a necessidade de uma investigação mais aprofundada das propriedades de virulência de amostras de aEPEC (OCHOA et al., 2012).

A tEPEC foi relacionada como um importante patógeno causador de diarreia neonatal em diferentes países em desenvolvimento, mas sua prevalência diminuiu com o aumento do poder socioeconômico desses países (ROBINS et al, 1980; GOMES et al, 1991; BEGAUD et al, 1993; TRABULSI et al, 2002). No entanto, os resultados publicados em um estudo multicêntrico de doenças entéricas (GEMS), a investigação mais detalhada da etiologia da diarreia moderada a severa (MSD) na infância levantou um novo

detalhamento sobre a virulência das cepas de tEPEC. Enquanto cepas de tEPEC não foram responsáveis por uma grande carga de doenças em quatro países da África, e em três países da Ásia, o patógeno foi associado com um elevado risco de mortalidade em jovens e crianças com diarreia moderada a severa (KOTLOFF et al, 2013).

Dados recentes sugerem que EPEC atípica são mais prevalentes do que EPEC típica em ambos os países desenvolvidos e em desenvolvimento (OCHOA et al., 2012). EPEC típica tem como seu principal reservatório os seres humanos, sendo raramente encontradas em outros animais, enquanto isso, EPEC atípica estão presentes em animais saudáveis e em seres humanos (TRABULSI et al, 2002; HERNANDES et al, 2009).

A distribuição dos agentes patogênicos no ambiente hospitalar representa os casos mais graves. Neste contexto, EPEC foi a segunda causa mais comum de diarreia depois de rotavírus (OCHOA et al., 2012). No entanto, há variações regionais e temporais importantes. Com base em um estudo, EPEC foi responsável por 3,2% de diarreia em crianças menores de 5 anos de idade hospitalizadas (NAIR et al., 2010).

Entretanto, ainda há certa controvérsia sobre a patogenicidade desse micro-organismo, pois alguns trabalhos não encontraram diferença significativa na prevalência desse patógeno em crianças com ou sem diarreia (OCHOA; CONTRERAS, 2011; RAJENDRAN et al., 2010).

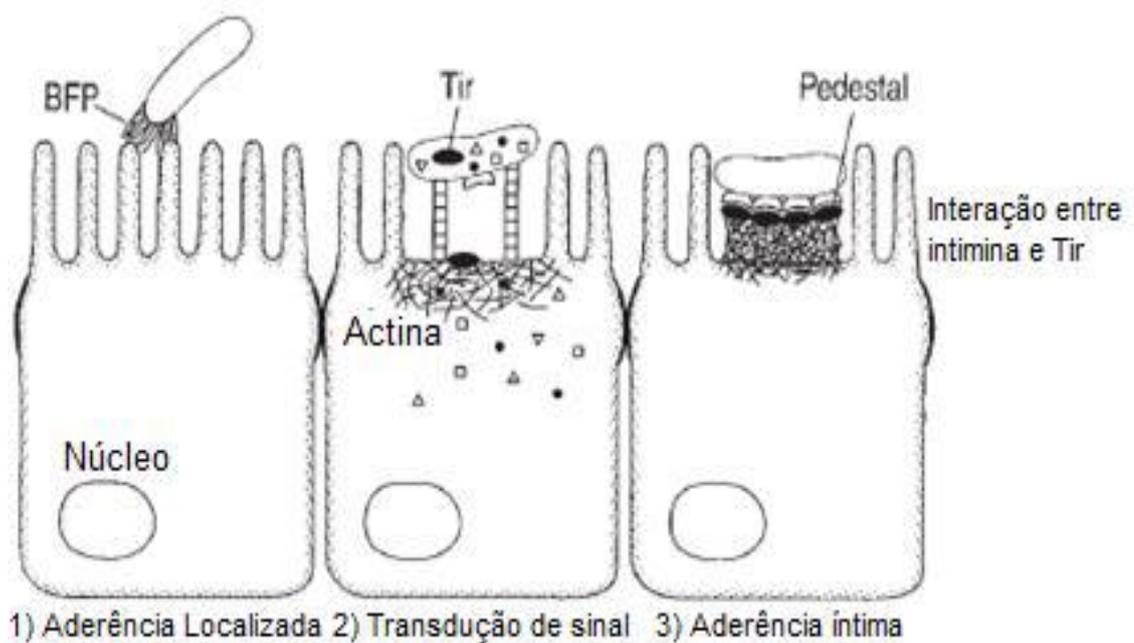
Cada ano EPEC é responsável por milhares de mortes em todo o mundo, principalmente em lactentes e crianças jovens. Comparando-se os aspectos clínicos de diarreia causada por EPEC contra outros agentes patogênicos, as crianças com EPEC são mais propensas a deixar de responder a terapia de reidratação oral (TRO), têm intolerância ao leite de vaca, necessitam de hospitalização e desenvolvem diarreia persistente (FAGUNDES-NETO; SCALETSKY, 2000).

1.3.3 PATOGÊNESE

EPEC induz uma lesão histopatológica característica conhecida por lesão A/E, o qual é caracterizado por uma ligação íntima de bactérias à superfície epitelial e a destruição do enterócito. A lesão A/E se manifesta na destruição das microvilosidades intestinais, adesão íntima e acentuada reorganização das proteínas do citoesqueleto dos enterócitos, culminando no aparecimento de estruturas na forma de pedestais sobre as

quais a EPEC se encontra intimamente aderida (NATARO; KAPER, 1998). Existem três estágios na patogênese de EPEC (**Figura 5**): Aderência inicial; Translocação de proteínas bacterianas e Fixação bacteriana íntima com a formação de pedestal (CHEN; FRANKEL, 2005; GARMENDIA et al., 2005; NATARO; KAPER, 1998; VALLANCE; FINLAY, 2001).

Figura 5 - Representação esquemática dos três estágios de patogênese de EPEC.



Fonte: (Adaptado de LU et al., 2001)

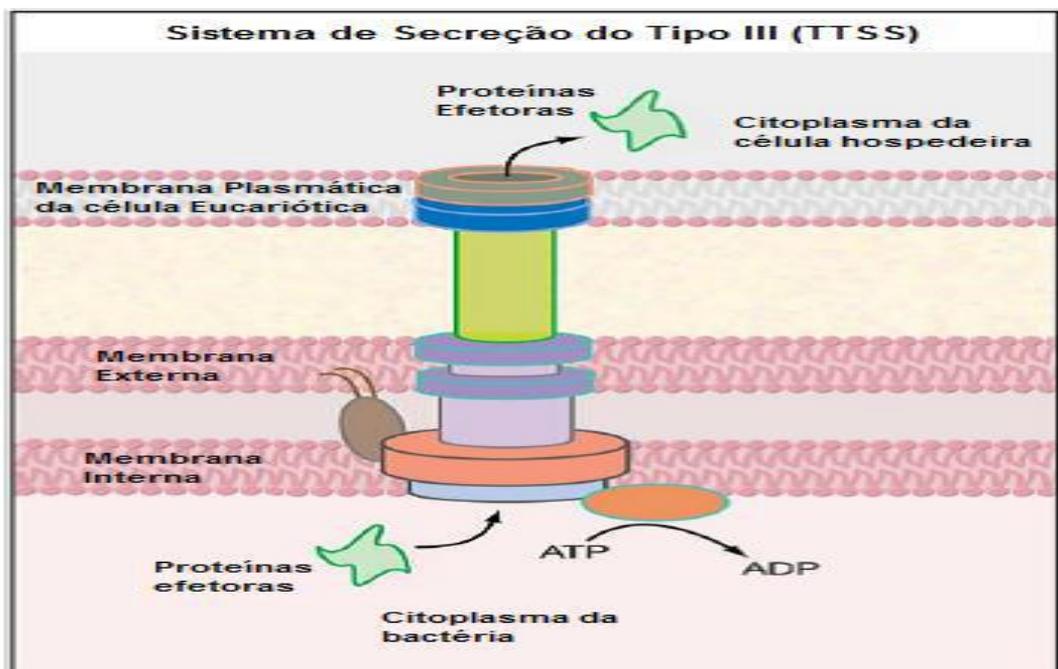
1) Aderência Localizada (mediada pelo BFP); 2) Transdução de sinal (montagem do TTSS e injeção de proteínas efetoras); 3) Aderência íntima (mediada pela interação entre a intimina e seu receptor tir), que promovem alterações no citoesqueleto e o estabelecimento da lesão A/E.

No primeiro estágio da patogênese, o contato inicial entre EPEC e a célula hospedeira é mediado por fímbrias do tipo IV, expressas na superfície bacteriana e denominadas *bundle forming pili* (BFP). Essas fímbrias promovem a formação de micro colônias com aderência localizada em culturas de células epiteliais (GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1991). Os genes que codificam BFP estão localizados no plasmídeo EAF (EPEC *adherence factor*) (BALDINI et al., 1983), que contém 14 genes (SOHEL et al.,

1996; STONE et al., 1996). O gene *bfpA* codifica a principal subunidade pili de BFP (DONNENBERG et al., 1992). Nesta etapa, EPEC forma microcolônias compactas na superfície das células devido ao BFP, que permite a ligação bactéria-bactéria (NATARO; KAPER, 1998; CROXEN; FINLAY, 2013).

Após a aderência inicial de EPEC ao enterócito, ocorre a montagem do T3SS, que forma um poro na membrana da célula hospedeira para que ocorra a injeção de várias proteínas secretadas (EspS) e a uma proteína bacteriana translocada denominada Tir, no citoplasma da célula hospedeira. O T3SS consiste em uma estrutura basal cilíndrica que abrange as duas membranas da célula bacteriana, e o peptidoglicano, ligado a uma agulha oca, seguido por filamentos (**Figura 6**) (NATARO; KAPER, 1998; VALLANCE; FINLAY, 2000; PIZARRO-CERDÁ; COSSART, 2006; WAGNER et al., 2010).

Figura 6 – Representação esquemática do Sistema de Secreção do Tipo III.

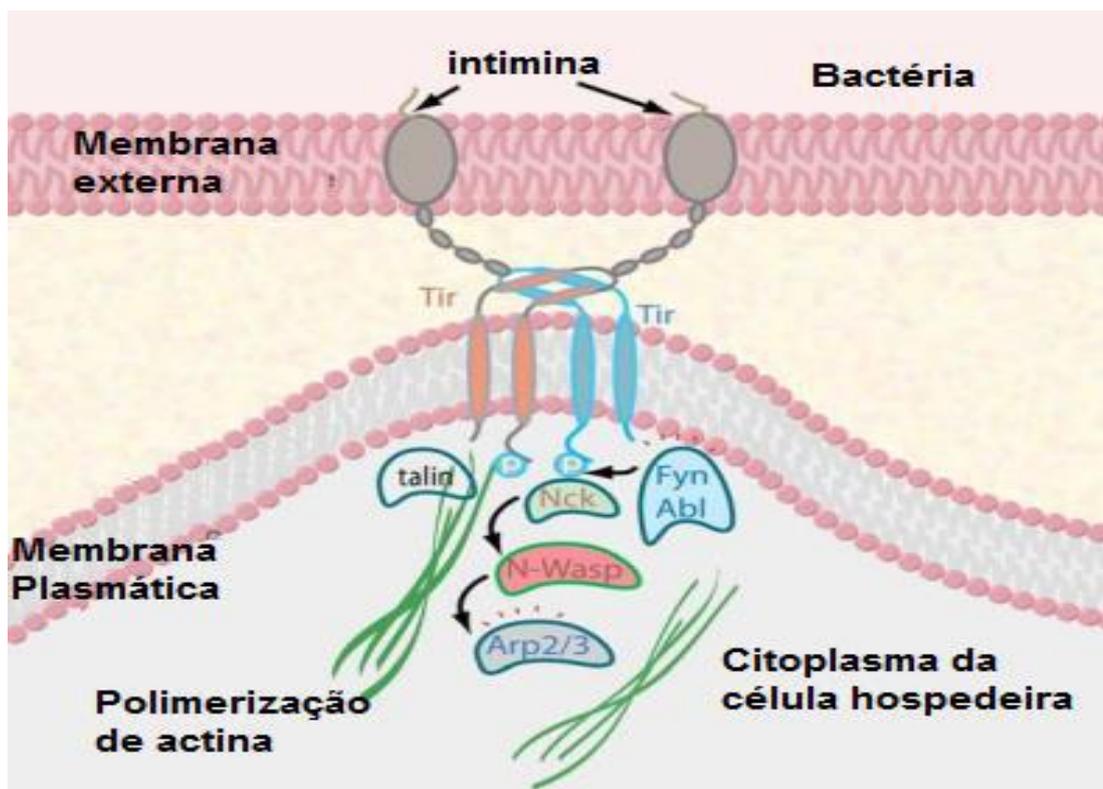


Fonte: Adaptado de PIZARRO-CERDÁ & COSSART, 2006.

O terceiro e último estágio da infecção de EPEC é caracterizado pela Lesão A/E, que tem como característica a aderência íntima da bactéria na superfície do enterócito, devido à destruição das microvilosidades intestinais e formação de uma estrutura semelhante a pedestal (**FIGURA 7**) (NATARO; KAPER, 1998; PIZARRO-CERDÁ;

COSSART, 2006; CROXEN; FINLAY, 2013; CLEMENTS et al., 2012). O fator que participa da adesão íntima de EPEC com as células epiteliais é a intimina, produto do gene *eaeA*, uma proteína de membrana externa de peso molecular igual a 94 kDa (JERSE; KAPER, 1991). Esta proteína liga-se ao receptor *Tir* (*translocated intimin receptor*), também inserido por sistema de secreção do tipo III (T3SS). O domínio citoplasmático de *Tir* interage com a proteína adaptadora Nck que sinaliza as moléculas N-WASP (Proteína neural da síndrome de Wiskott-Aldrich) e o complexo Arp 2/3 (Proteínas relacionadas à actina 2/3). Assim, o citoesqueleto de actina é reorganizado e resulta na formação da estrutura de pedestal e da lesão A/E (GRUENHEID et al., 2001).

Figura 7 - Estágio da infecção por EPEC e a interação entre intimina/*Tir*.



Fonte: (Adaptado de PIZARRO-CERDÁ; COSSART, 2006).

Todo este mecanismo complexo de patogenicidade apresentado por EPEC acarreta o desenvolvimento da doença diarreica pela dramática perda da atividade de

absorção pela microvilosidade, fato ocasionado devido à lesão A/E causada pela bactéria, levando o estabelecimento da diarreia devido à má absorção dos nutrientes (AFSET et al., 2003). No entanto, apesar do conhecimento sobre a diversidade de efeitos no qual a EPEC atua no hospedeiro, o mecanismo completo pelo qual esse patógeno induz a diarreia ainda não foi totalmente elucidado (LAPOINT; CONNOR; BURET, 2009).

1.4 FATORES DE VIRULÊNCIA

A virulência da EPEC depende principalmente do sistema de secreção do tipo 3 (relacionado aos genes *esc* e *sep*), capaz de liberar proteínas efetoras dentro das células intestinais, alterando funções celulares que culminam na morte celular. Os principais genes estudados são codificados na ilha de patogenicidade LEE, sendo a intimina (gene *eaeA*), proteínas efetoras (genes *espF*, *espG*, *espH*, *map* e *espZ*) e proteínas translocadoras (genes *espA*, *espB* e *espD*) os mais importantes descritos (OCHOA et al., 2012). Neste contexto, há uma complexa rede de intensa regulação transcricional deste aparato gênico (FRANZIN et al., 2015). Estes efetores são altamente conservados na lesão A/E promovendo a aderência de bactérias e de actina e rearranjos para alterar a função de barreira epitelial e potencial de membrana mitocondrial, entre outros eventos celulares (GARCIA-ÂNGULO et al., 2012). Neste contexto, há uma complexa rede de intensa regulação transcricional deste aparato gênico (FRANZIN et al., 2015).

Uma das grandes preocupações em relação à virulência de EPEC é devido ao forte parentesco evolutivo com *Escherichia coli* enterohemorrágica – EHEC, bactéria zoonótica capaz de causar diarreia mais severa, devido à presença da toxina Shiga. A vigilância ativa com investigação genômica destas bactérias (EPEC e EHEC) são essenciais para entender a ecologia e patogênese associada (HARTLAND et al., 2013).

O T3SS, a intimina, e o *Tir* são determinantes essenciais na adesão íntima do patógeno. Um processo que requer a inserção *Tir* para a membrana plasmática, dependente de T3SS, para atuar como um receptor para a ligação bacteriana através da interação da intimina (KENNY, 2002). No entanto, a interação Tir-intimina também desencadeia cascatas de sinalização que conduzem a respostas, incluindo a fosforilação de fosfolipases do hospedeiro, e recrutamento de proteínas do citoesqueleto, beneficiando a aderência bacteriana. Intimina também pode subverter processos celulares

independentemente de *Tir* (KENNY, 2002; DEAN et al, 2006; MA et al, 2006; CAMPELLONE, 2010).

Map (proteína mitocondrial associada), não tem como alvo apenas mitocôndrias da célula hospedeira, mas também contribui para a ruptura da função da barreira das células epiteliais, um processo associado à diarreia (MA et al, 2006).

Os genes efetores não-LEE-codificados (Nle) estão agrupados em seis ilhas de patogenicidade no genoma bacteriano. Os efetores Nle conhecidos são: *NleA-H*, *EspG2/Orf3*, *Cif*, *Espj* e *EspL*. *NleA* (também chamado de *EspI*) é relatado como inibidor de proteínas de secreção; *EspJ* inibe a fagocitose; *NleE* e *NleH* ativa proteínas da imunidade inata (DENG et al, 2004; GARMENDIA et al, 2005; DEAN et al, 2009).

A capacidade das bactérias para administrar proteínas efetoras para células hospedeiras é dependente da presença de um sistema de translocação que compreende filamentos que se estendem a partir da superfície bacteriana às membranas das células do hospedeiro. Em EPEC, *escF*, *espA*, *espB* e *espD* são hipoteticamente para formar este aparelho de translocação das proteínas (LUO; DONNENBERG, 2006). O gene *cesT* é necessário para a secreção eficiente de vários efetores do tipo 3 codificados dentro e fora do LEE (THOMAS et al., 2005).

EspB é uma proteína de 312 aminoácidos com um domínio transmembranar putativo e três domínios em espiral. É um fator de virulência essencial de EPEC em seres humanos e em modelos animais (DENG et al., 2004). Juntamente com *espA* e *espD*, *espB* forma o aparelho de translocação. Sem estas proteínas e sem a proteína citoplasmática *espL*, proteínas efetoras são secretadas mas não translocadas (LUO; DONNENBERG, 2006). *EspA* forma uma estrutura em forma de agulha que se projeta a partir da superfícies bacteriana a membrana plasmática da célula hospedeira. Após a ligação bacteriana, *EspB* e *EspD* interagem na formação de poros na membrana do hospedeiro (LUO et al, 2006).

Entre as muitas proteínas efetoras translocadas, *Tir* desempenha um papel crítico na ligação íntima através da ligação a intimina proteína da membrana externa (HARTLAND et al., 2013). Enquanto a interação intimina-*Tir* tem sido intensamente estudada, nem todas as proteínas efetoras contribuem para a lesão A/E e alterações do citoesqueleto. Revelou-se recentemente que várias proteínas efetoras desempenham um

papel na atenuação da resposta inflamatória (NEWTON et al., 2010 ; ZHANG et al., 2011).

Um grande estudo caso-controle recente que envolveu sete diferentes populações da Ásia e África encontrou EPEC típica em associação com diarreia (KOTLOF et al., 2013). Autores sugerem que a epidemiologia de EPEC tenha se modificado, com redução de associação de EPEC com diarreia em alguns países da América do Sul. Concomitantemente, percebeu-se um aumento dos casos de EPEC atípica nestas localidades (DONNENBERG et al., 2013). Estes resultados reforçam a necessidade de uma investigação mais aprofundada das propriedades de virulência de amostras de EPEC atípica (OCHOA et al., 2008).

O recente sequenciamento de isolados de EPEC tem possibilitado um maior entendimento da relação evolutiva destas cepas, caracterizando grupos genômicos específicos (HAZEN et al., 2013; HAZEN et al., 2014; RAJESWARI et al., 2015). Além disso, a grande maioria dos estudos analisa isolados de EPEC em casos de diarreia moderada a severa, principalmente associados a casos que necessitaram atendimento médico/hospitalar (DONNENBERG et al., 2015), apontando a necessidade de estudos de associação de determinantes genéticos de cepas da comunidade, com diarreia leve, desnutrição e enteropatia prevalentes.

2 JUSTIFICATIVA

Considerando a importância da EPEC na etiologia das infecções entéricas e a necessidade de elucidar o impacto deste patógeno em crianças com quadro clínico não relacionado à diarreia moderada a severa, são necessários estudos de associação de determinantes genéticos com dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos a fim nestas populações, principalmente na região no Semiárido Brasileiro.

A coincidência de efeitos relacionados à desnutrição infantil, inflamação intestinal e infecções entéricas com ou sem eventos diarreicos por vários micro-organismos pode ser avaliada de forma mais direcionada aos patógenos EPEC típica e EPEC atípica.

Tendo em vista o papel da *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) nas doenças diarreicas na população infantil, torna-se de fundamental importância o estudo desse patógeno. Este trabalho teve como base definir a prevalência de EPEC no Semiárido Brasileiro, assim como avaliar o impacto da infecção por EPEC em crianças com e sem diarreia e investigar a importância de alguns fatores de virulência na indução de diarreia por *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), ajudando a entender o curso da infecção.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Determinar a prevalência de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e caracterizar o perfil fenotípico de virulência entre casos (crianças com diarreia) e controles (crianças sem diarreia) residentes no Semiárido Brasileiro.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar a prevalência de EPEC entre crianças, com e sem diarreia, residentes no Semiárido Brasileiro;
- ✓ Desenvolver reações de PCR-Múltiplas para o diagnóstico de genes de virulência de EPEC;
- ✓ Avaliar a relação entre a presença e ausência dos genes de virulência de EPEC *espB*, *espD*, *tir*, *espC*, *espZ*, *espH*, *espG*, *ler*, *map*, *nleB*, *nleC*, *nleD*, *cesT*, *paa*, *espJ*, *nleE*, *nleF*, *espL* e *espP*, isolados e em combinação, entre crianças com e sem diarreia, residentes no Semiárido Brasileiro;
- ✓ Determinar distribuição dos subtipos de EPEC na população estudada correlacionada com a presença de diarreia em crianças do Semiárido Brasileiro;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

4.1.1 Considerações Éticas

Esse estudo fez parte de um projeto intitulado “**Intervenção com micronutrientes e impactos ao longo prazo no Brasil**”- Subprojeto 2A, aprovado com parecer favorável pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (COMPEPE/UFC) (ofício n°.338/2009, protocolo n°.238/05) em 19 de novembro de 2009, após atendimento das recomendações exigidas (ANEXOS A).

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO B) foi revisado e aprovado pelo COMPEPE/(ofício n°. 338/2009, protocolo n°. 238/05) em 06 de abril de 2009.

Foram incluídas no estudo crianças de dois-36 meses de idade que tiveram o consentimento dos pais ou responsáveis. Protocolos de campo e laboratório para pesquisa foram desenvolvidos e equipes foram treinadas para execução das atividades. Um questionário (ANEXO C) com informações demográficas, epidemiológica, clínico, nutricional e laboratorial foi aplicado e amostras de fezes foram coletadas de cada criança para posterior análise molecular.

Em relação à confidencialidade e a privacidade dos dados das crianças foram resguardadas, segundo normas éticas Brasileiras. As crianças receberam números codificados, em nenhum momento do estudo essas crianças tiveram seus nomes divulgados. Os dados foram guardados em local seguro no Sistema de Segurança e Gerenciamento de Dados (SSGD), na Unidade de Pesquisas Clínicas/Instituto de Biomedicina (UPC/IBIMED), na UFC.

4.1.2 Tipo e Duração do Estudo

Esse estudo foi do tipo observacional, analítico, caso-controle e incluiu 1200 crianças atendidas em unidades de saúde de cada município, sendo 600 crianças com diarreia (caso) e 600 crianças sem diarreia (controle). A duração do estudo, incluindo as etapas de seleção, inclusão, triagem, aplicação de questionário epidemiológico, coleta de

medidas antropométricas e amostras foi durante o período de 01 de Setembro de 2009 a 30 de Março de 2011.

4.1.3 Local do Estudo

Este estudo compreendeu a participação das cidades de Crato (CE), Picos (PI), Ouricuri (PE), Patos (PB), Souza (CE) e Cajazeiras (PB), que são representantes do Semiárido Brasileiro. O desenvolvimento de sondas moleculares e a aplicação da técnica com Luminex permitiu detectar com alta sensibilidade e especificidade um completo painel de patógenos bacterianos (*Escherichia coli* patogênicas, *Shigella* spp., *Aeromonas* sp., *Salmonella* sp., *Vibrio* sp. e *Campylobacter* sp.), protozoários (*Giardia* sp., *Entamoeba histolytica* e *Cryptosporidium* sp.) e vírus (rotavírus, sapovírus, norovírus e astrovírus).

O Semiárido Brasileiro abrange uma área de 969.589,4 km² e compreende 1.133 municípios de nove estados do Brasil: Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (IBGE, 2009).

Nessa região, vivem 22 milhões de pessoas, que representam 11,8% da população Brasileira, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011). É o Semiárido mais populoso do planeta (SILVA, 2008).

O Semiárido tem a maior parte do seu território coberto pela Caatinga, único bioma exclusivamente brasileiro, rico em espécies endêmicas, ou seja, que não existem em nenhum outro lugar do mundo. Outra característica do Semiárido brasileiro é o déficit hídrico. Mas, isso não significa falta de água (SILVA, 2008).

O Semiárido é marcado por grandes desigualdades sociais. Segundo o Ministério da Integração Nacional mais da metade (58%) da população pobre do país vive na região. Estudos do Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) demonstram que 67,4% das crianças e adolescentes no Semiárido são afetados pela pobreza (UNICEF, 2011).

4.1.4 Critérios de Inclusão e Exclusão da População do Estudo

Critérios de inclusão para o grupo caso:

- Crianças com idade variando entre 02 e 36 meses;
- Ter apresentado diarreia nos últimos 14 dias;

- Crianças residentes em um dos locais de estudo;
- Não estiveram internadas nas unidades de saúde por mais de 12 horas;
- Obtenção de consentimento livre esclarecido assinado pelo pai ou responsável da criança.

Critérios de inclusão do grupo controle:

- Não apresentaram diarreia nas duas semanas imediatamente anteriores ao estudo;
- Forneceram o consentimento por escrito (por pelo menos um dos pais).

Critérios de exclusão dos casos e controles.

- Os pais não forneceram um termo de consentimento assinado;
- Relato de uso de antibióticos nos últimos 30 dias;
- Foram amamentadas exclusivamente ao seio;
- Apresentaram doenças de base moderada a grave (por exemplo, pneumonia, infecção sistêmica, etc.).

4.2 COLETA E TRANSPORTES DAS AMOSTRAS

As crianças e seus pais que estiveram nas unidades de saúde ou comunidades foram abordados por um membro do grupo de pesquisa para recrutamento para o estudo e, caso tenham preenchido os critérios de inclusão, realizaram um processo de consentimento informado por escrito. O responsável coletou uma amostra de fezes em um coletor padrão. As amostras foram mantidas a 4°C e transportadas ao Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI) para os devidos procedimentos. As amostras para o estudo etiológico no semiárido foram coletadas, armazenadas a -20 °C e em seguida enviadas para o LDI na UPC & IBIMED /UFC.

4.3 MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

A equipe do projeto realizou medidas de estatura, peso e circunferência da cabeça das crianças incluídas no estudo. A aferição da estatura foi realizada com as crianças descalças na posição vertical, utilizando-se um antropômetro. As crianças menores de dois anos foram medidas deitadas, na posição do comprimento. Para aferição da massa corporal, as crianças foram pesadas trajando roupas leves e descalças, utilizando-se uma balança digital portátil. A circunferência da cabeça foi obtida através do emprego de uma fita métrica confeccionada em material flexível e resistente, específica para a medição de circunferências e para uso pediátrico.

As medidas antropométricas foram convertidas em escores-z de HAZ (*height-for-age*), WAZ (*weight-for-age*) e WHZ (*weight-for-height*), utilizando *software* antropométrico. O cálculo do índice de massa corporal (IMC) foi realizado dividindo-se o peso (Kg) pela altura (m) ao quadrado.

4.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS FECAIS

Ao chegar ao laboratório, às amostras eram acondicionadas na temperatura entre 2/8°C até seu processamento. Os espécimes fecais foram alíquotadas em tubos estéreis identificados por números, com capacidade para 1,8ml. Após esse passo, as alíquotas eram armazenadas em freezer -20°C para posterior extração do DNA fecal.

4.5 DEFINIÇÃO DOS GRUPOS: CASOS/CONTROLES

Os casos, definidos como crianças na faixa etária entre dois e 36 meses com diarreia de duração de 14 dias. Essa definição foi feita a partir do banco de dados pela resposta “sim” à pergunta: “Sua criança apresentou diarreia nos últimos 14 dias?”. E o grupo controle, foi constituído de crianças sem diarreia.

Trezentos e sessenta e cinco crianças apresentaram a resposta “sim” à essa pergunta. Portanto, essas 365 crianças tiveram seguimento no estudo como casos.

Outras trezentos e sessenta e cinco crianças apresentavam “não” como resposta à mesma pergunta e tiveram seguimento no estudo como controles.

4.6 EXTRAÇÃO DE DNA FECAL

O DNA fecal foi extraído utilizando o *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA), seguindo as instruções do fabricante.

Aproximadamente 200 mg de fezes foram incubadas com 1,4 mL de tampão ASL. A mistura foi agitada fortemente por 1 minuto em vórtex até que as amostras estivessem totalmente homogeneizadas. A mistura foi incubada por 5 minutos a 95 °C. O lisado foi homogeneizado por 15 segundos e centrifugado por 1 minuto para precipitação das partículas fecais.

Em seguida, 1,2 mL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo de 2 mL contendo *InhibitEX*, um componente do *kit* em forma de comprimido, que adsorve inibidores de PCR e substâncias lesivas ao DNA presentes nas fezes.

O lisado e o comprimido são agitados vigorosamente até dissolução completa do comprimido. A mistura foi incubada por 1 minuto a temperatura ambiente com o objetivo de gerar máxima adsorção dos inibidores pela matriz e foi submetida a uma nova centrifugação durante 3 minutos. Todo o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e submetido a uma nova centrifugação por 3 minutos.

Para a digestão das proteínas, 200 µL do sobrenadante foram transferidos para um tubo de 1,5 mL contendo 15 µL de proteinase K. Adicionou-se 200 µL de tampão AL (constituído de hidrocloreto de guanidina). A mistura foi, então, aquecida a 70°C durante 10 minutos, temperatura e tempo adequados para a ação dos desnaturantes. Para completar o passo de desnaturação protéica, adicionou-se 200 µL de etanol a 96-100%.

Após breve centrifugação, a mistura foi transferida para um novo tubo contendo um filtro composto de uma membrana de sílica-gel. O DNA foi adsorvido à membrana durante uma rápida centrifugação (30 segundos). O filtro e o DNA foram transferidos para um novo tubo coletor, sendo o filtrado descartado. O DNA adsorvido foi, então, lavado em dois passos de centrifugação.

No primeiro deles, 500 µL do tampão AW1 foram adicionados à membrana e submetidos à centrifugação por 1 minuto. A membrana ligada ao DNA foi transferida para um novo tubo coletor e o filtrado foi descartado.

Na segunda lavagem, 500 µL do tampão AW2 foram adicionados à membrana e submetidos à centrifugação por 3 minutos. Para que nenhum excesso de tampão permanecesse na amostra antes da eluição final, o filtrado foi descartado e o filtro foi

colocado de volta ao mesmo tubo coletor e submetido a uma nova centrifugação de 1 minuto. A membrana contendo o DNA concentrado e purificado foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL. Adicionou-se, então, 200 µL do tampão de eluição AL e incubou-se por 1 minuto à temperatura ambiente. A centrifugação durante 1 minuto completou o processo. O DNA obtido foi armazenado a -80°C em duas alíquotas contendo 100 µL cada uma para posterior análise. Todas as centrifugações foram realizadas a 10.000xg à temperatura ambiente.

4.7 QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO

A presença de DNA foi confirmada no produto da extração através do espectrofotômetro NanoDrop 2000c, da ThermoScientific. O teste indica a qualidade e a quantidade do material ao final do processo. O NanoDrop 2000c emprega um sistema de retenção de amostras, que utiliza micro volumes (1-2 µl) entre duas superfícies de medição usando as propriedades da tensão superficial de líquidos, sem a utilização de capilares, reduzindo o tempo de medição. Neste caso, não é necessário diluir a amostra (Thermo Fisher Scientific, 2009).

O DNA extraído foi avaliado nos comprimentos de onda de 260 e 280nm. A razão 260/280nm fornece uma estimativa da qualidade e pureza da amostra extraída, demonstrando se ela apresenta ou não contaminação de ácido ribonucleico (*ribonucleic acid* – RNA), proteína ou reagentes, como o ácido etilenodiamino-tetra-acético (*ethylenediaminetetraacetic acid* – EDTA).

4.8 DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR TECNOLOGIA XMAP

Foi utilizada a técnica de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) do tipo Multiplex para a detecção dos genes de diagnóstico, com os reagentes do *Qiagen multiplex PCR kit* (Valencia, CA). A técnica de Multiplex-PCR é uma das variantes do PCR que usa múltiplos pares de iniciadores de DNA para a detecção de vários genes em uma única reação, ocorrendo assim, a amplificação simultânea de sequências de DNA de tamanhos diferentes. Cada reação incluía 12,5 µL da enzima Multiplex PCR Mastermix, 1,0 µL do mix de pares de iniciadores específicos para os genes de cada agente mencionado

(**Tabela 1**), 5,5 µL de água mili-Q autoclavada, 2,0 µL de solução Q e 4,0 µL de DNA da amostra. Primer mix é constituído 0,4 µM primers de EAEC, 0,4 µM primers de EPEC, 0,4 µM iniciadores de EHEC e 0,4 µM primers de ETEC. No protocolo do multiplex-PCR foi incluído um passo inicial de desnaturação (95 °C) por 15 minutos, seguido por 40 ciclos com as seguintes etapas: desnaturação (95 °C) por 30 segundos, anelamento (55°C) por 30 segundos e extensão (72°C) por 30 segundos, e por fim uma extensão (72 °C) por 10 minutos e manutenção a 4° C. Este protocolo foi desenvolvido pelo grupo dos pesquisadores americanos Eric Houpt e Mami Taniuchi, da Universidade da Virgínia, Estados Unidos. Então, utilizou-se a tecnologia xMAP para analisar os produtos do multiplex, através do uso do equipamento BioPlex (Bio-Rad, Estados Unidos).

Esta tecnologia emprega a técnica de PCR associada à hibridização de seus produtos com o uso de microesferas de poliestireno que apresentam a possibilidade de detecção simultânea de até 100 produtos de DNA. Para tanto, cada microesfera teria uma dupla de fluorescências de intensidades únicas que seria acoplada por carboxilação a uma sonda nucleotídica específica. Esta sonda nucleotídica seria hibridizada especificamente a um produto de PCR amplificado em reação prévia. Além da sonda, um dos iniciadores da reação de PCR seria biotinilado para futura marcação de intensidade por estreptavidina (TANIUCHI et al., 2012; LIU et al., 2011). Após a hibridização das microesferas com os produtos de PCR, o material obtido foi levado ao leitor do BioPlex 200 que detectou o DNA dos agentes infecciosos. Para a realização dos testes foram adicionados a cada reação dois controles negativos e um controle positivo para garantir a eficiência dos testes.

Tabela 1: Genes de diagnóstico relacionados com as *Escherichia coli* diarréiogênicas, iniciadores utilizados e tamanhos dos produtos.

<i>E. COLI</i>	GENE DE DIAGNÓSTICO	SEQUÊNCIA DO INICIADOR	PRODUTO
EAEC	<i>aatA</i> (proteína integrante do complexo secretor da dispersina)	S: CTGGCGAAAGACTGTATCAT A: CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	650PB
EAEC	<i>aaiC</i> (proteína que carece do domínio N-terminal)	S: ATTGTCCTCAGGCATTTAC A: ACGACACCCCTGATAAACAA	215PB
EPEC	<i>eaeA</i> (codifica a proteína intimina)	S: CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC A: CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG	881PB
EPEC	<i>bfpA</i> (proteína formadora de pilus)	S: GGAAGTCAAATTCATGGGGGTAT A: GGAATCAGACGCAGACTGGTAGT	300PB
EIEC	<i>ipaH</i> (antígeno plasmidial de invasão)	S: TGGAAACTCAGTGCCTGT A: CCAGTCCGTAAATTCATTCT	423PB
ETEC	<i>eltB</i> (toxina termo lábil)	S: CACACGGAGCTCCTCAGTC A: CCCCAGCCTAGCTTAGTTT	508PB
ETEC	<i>estA</i> (toxina termoestável)	S: GCTAAACCAGTAGGTCTTCAAAA A: CCCGGTACAGCAGGATTATTACAACA	147PB
EHEC	<i>Stx1</i> (<i>Shiga</i> -toxina 1)	S: CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG A: CACCAGACAATGTAACCGCTG	348PB
EHEC	<i>Stx2</i> (<i>Shiga</i> -toxina 2)	S: ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG A: GCGTCATCGTATACACAGGAGC	584PB

Legenda: S- senso; A- antisenso

4.9 PESQUISA DE GENES RELACIONADOS À VIRULÊNCIA

As amostras identificadas como EPEC foram analisadas por cinco Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) do tipo Multiplex (**Figura 8**) (*QIAGEN Multiplex PCR Kit, Qiagen, Valencia, CA*), seguindo as instruções do fabricante quanto à presença de 19 fatores de virulência amplamente investigados na literatura: *espB*, *espD*, *tir*, *espC*, *espZ*, *espL*, *Ler*, *Map*, *espG*, *espH*, *nleE*, *nleF*, *nleB*, *paa*, *nleC*, *nleD*, *espJ*, *cesT* e *espP* (**Tabela 2**). O *kit* é composto por uma DNA polimerase pré-otimizada, deoxinucleotídeos e cloreto de magnésio diluído em tampão específico. Seu emprego possibilita a amplificação de dois ou mais produtos simultaneamente em um único tubo de reação. As reações de PCR incluíram um passo inicial de desnaturação (95°C), seguido por 40 ciclos de desnaturação (95°C), anelamento (60°C) e extensão (72°C), além de uma extensão final (72°C). Os iniciadores utilizados nas reações estão descritos na **Tabela 3**. Os produtos de PCR foram visualizados e fotografados (*ChemiDoc XRS, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA*) após eletroforese em gel de agarose a 2% e marcação com o corante Blue Green. A cepa protótipo de EPEC 2348/69, que possui todos os genes descritos acima, foi utilizada como controle positivo; e a água foi empregada como controle negativo em todas as reações.

Figura 8: Visualização das bandas obtidas após amplificação por PCR dos genes de fatores de virulência.

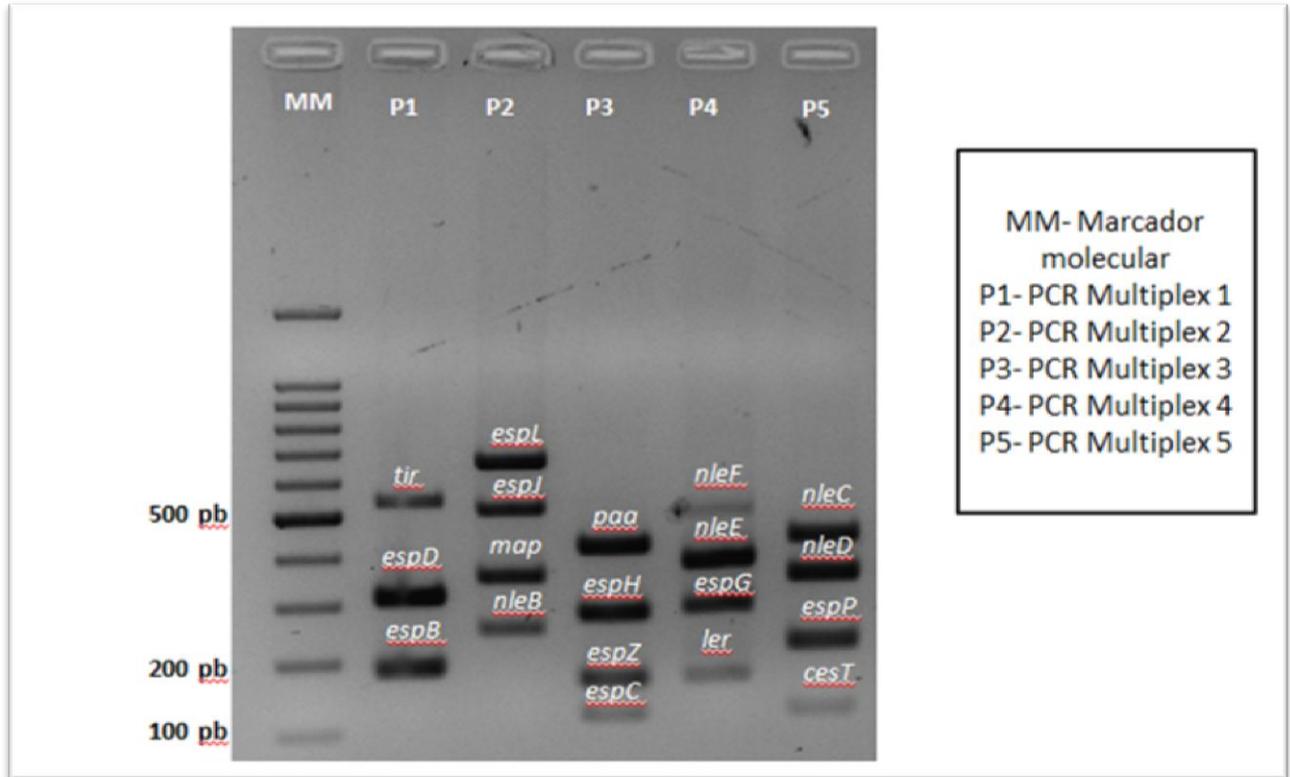


Tabela 2: Genes de virulência investigados do estudo com suas respectivas funções elucidadas.

Gene	Descrição	Fonte
<i>espB</i>	Proteína efetora secretada pelo T3SS	Donnenberg, 2006
<i>espD</i>	Proteína efetora secretada pelo T3SS	Donnenberg, 2006
<i>tir</i>	Receptor translocado de intimina	Hartland et al., 2013
<i>espC</i>	Enterotoxina <i>espC</i>	Abreu, 2012
<i>espZ</i>	Bloqueador de translocação de efetores de T3SS	Ochoa et al., 2008
<i>espL</i>	Proteína efetora não codificada por LEE	Donnenberg, 2006
<i>ler</i>	Regulador global de LEE	Dean et al., 2005
<i>Map</i>	Proteína efetora (alteração da morfologia da mitocôndria)	Ochoa et al., 2008
<i>espG</i>	Proteína efetora (destruição de microtúbulos e ruptura de tight junctions)	Ochoa et al., 2008
<i>espH</i>	Proteína efetora (polimerização de actina)	Ochoa., 2008
<i>nleB</i>	Proteína efetora B não codificada por LEE	Garcia-Ângulo et al., 2012

<i>nleE</i>	Proteína efetora E não codificada por LEE	Garcia-Ângulo et al., 2012
<i>nleF</i>	Proteína efetora F não codificada por LEE	Garcia-Ângulo et al., 2012
<i>nleC</i>	Proteína efetora C não codificada por LEE	Garcia-Ângulo et al., 2012
<i>Paa</i>	Proteína associada à lesão A/E	Zhang et., 2011
<i>nleD</i>	Efetora não codificada	Garcia-Ângulo et al., 2012
<i>espJ</i>	Proteína efetora não codificada por LEE (inibição de fagocitose)	Garcia-Ângulo et al., 2012
<i>cesT</i>	Chaperona modificadora de diversos efetores de T3SS	Thomas et al., 2005
<i>espP</i>	Serino-protease autotransportadora	Abreu, 2012

TABELA 3– Genes alvo, iniciadores utilizados e tamanhos dos produtos obtidos.

Gene	Iniciadores	Produto (PB)	Fonte
<i>espB</i> (Z21555.1)	F: ATGGCAGCAAAGAGCCTAA R: ATGGTCACCACATTGCAAGA	179 (PB)	Desenvolvido neste trabalho
<i>espD</i> (AF022236.1)	F: TGCCGGGTAAAAATAGCTG R: TGCAAGCTCTGGCTATCCTT	304 (PB)	Desenvolvido neste trabalho
<i>Tir</i> (AF013122.1)	F: CTGCAGCGACCTCATCATAA R: GATGCGAAGGGAAATGCTAT	535 (PB)	Desenvolvido neste trabalho
<i>nleB</i> (FM180568.1)	F: ATATCGCCCTGTAGCGGATG R: GAAAGGGTATCAAGCGGCAT	252 (PB)	Desenvolvido neste trabalho
<i>Map</i> (FM180568.1)	F: AGTCCAACGGCAATGGTAGG R: AAAGCGCGATACAACAGCCT	357 (PB)	Desenvolvido neste trabalho
<i>espJ</i> (FM180568.1)	F: TAACCACCACTCCCACACCA R: CCAGAAACAGTCAGGCTGGA	514 (PB)	Desenvolvido neste trabalho
<i>espL</i> (FM180568.1)	F: TCAGGCCCTTCAAATGGAC R: ACCTAAGCGAGTTCAGCGGA	661 (PB)	Desenvolvido neste trabalho

<i>espC</i> (U69128.1)	F: TGATTCCGGGGCTTATTTTG R: CTCATTCCTGGTATGCCGGT	118 (PB)	Desenvolvido neste trabalho
<i>espZ</i> (AF022236.1)	F: CACTGGCAGCCACAATCAAT R: GCAATGTGTGTTGACGACCC	169 (PB)	Desenvolvido neste trabalho
<i>espH</i> (FM180568.1)	F: GCCATGCGTCATGGAATAAG R: TATGGAGGCGTTACGAAGGC	274 (PB)	Desenvolvido neste trabalho
<i>Paa</i> (AJ277443.1)	F: TTGTTAACGAGAAAGCCAGACG R: TTATCGCACGTGAAATGGGA	413 (PB)	Desenvolvido neste trabalho
<i>Ler</i> (AF200363.1)	F: TGCGAGAGCAGGAAGTTCAA R: TGAAGAAGGGCAGACCTGGT	168 (PB)	Desenvolvido neste trabalho
<i>espG</i> (AF453442.1)	F: GGGCCTACACCATTCAGCTC R: AGAAGCAGCAACGGCCATAT	280 (PB)	Desenvolvido neste trabalho
<i>nleE</i> (FM180568.1)	F: CAGGGCGTGTCCCCTATAAA R: TGTGAGCTTCCGGACATTTG	371 (PB)	Desenvolvido neste trabalho
<i>nleF</i> (FM180568.1)	F: CCAACAAGTGGTTCTTCAGCA R: AAATGCCTCGTGGAAGGATG	485 (PB)	Desenvolvido neste trabalho
<i>cesT</i> (AB246811.1)	F: TGTGGAAAATTCCCGACAGA R: TCAGGAGCACAATCGCTGTT	119 (PB)	Desenvolvido neste trabalho

espP (FM180568.1)	F: AGCCACAGATGGAGCTGGTT R: GAACGGAGAAACGGTTCTGC	222 (PB)	Desenvolvido neste trabalho
nleD (FM180568.1)	F: TTCGTTTCCAGGGGACTGAT R: AAATGGGGAGCGTTTCAAAG	348 (PB)	Desenvolvido neste trabalho
nleC (FM180568.1)	F: CATTTCGTGATGCCGTAAGC R: ATGCAGAGCCAGAACGTGAA	434 (PB)	Desenvolvido neste trabalho

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Todos os dados gerados foram codificados em planilha Excel, *MICROSOFT®* (New York, NY, USA) e adicionados por dois digitadores independentes. O teste de Fisher foi empregado para comparar a proporção de ocorrência de uma variável entre os grupos. O intervalo de confiança foi de 95% e o teste foi considerado estatisticamente significativo quando $P < 0.05$.

As figuras foram obtidas utilizando-se o programa *GraphPad Prism* versão 4.00 para *Windows* (*GraphPad Software, San Diego, CA*). Utilizou-se o programa *EpilInfo* versão 6.0 (*Center for Diseases Control, Atlanta, GA*) para o cálculo dos escores-z a partir das medidas antropométricas.

Outra análise empregada neste estudo foi através do software *CART®* (*Classification and Regression Trees*), que possibilita uma moderna classificação de dados baseado em árvores de decisão. Neste estudo, dentro da Epidemiologia Molecular de Doenças Infecciosas, o *CART* pôde indicar associações de diversos dados genômicos em micro-organismos (presença de genes de virulência) com fenótipos clínicos e outros fatores epidemiológicos. Tendo em vista a existência de dados epidemiológicos neste

trabalho, o CART foi determinante no desenvolvimento de resultados mais eficientes para este estudo.

5 RESULTADOS

De forma a prover uma melhor exposição dos achados do estudo, a Seção de Resultados será dividida em cinco subtópicos: 1) Caracterização da população de estudo, onde será caracterizada toda a população de crianças utilizadas no estudo, quanto ao número de crianças em cada família, cidades participantes, fatores socioeconômicos, condições sanitárias, sintomatologia associada ao quadro diarreico; 2) Prevalência de EPEC, apresentando as frequências de agentes etiológicos relacionados à diarreia em crianças do Semiárido Brasileiro; 3) Dados clínicos, onde todas as crianças envolvidas serão caracterizadas quanto aos seguintes parâmetros clínicos: dor abdominal, muco nas fezes, febre, desidratação e vômito. 4) Distribuição geográfica dos isolados de EPEC, onde as amostras EPEC serão analisadas em relação às cidades do estudo onde foram diagnosticadas; 5) Pesquisa dos genes de virulência de EPEC, que mostrará a distribuição de positividade dos genes de virulência pesquisados no estudo, isoladamente e em combinação, entre as amostras positivas para EPEC dos grupos caso e controle.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Durante o período deste estudo, 730 crianças na faixa etária entre dois e 36 meses foram analisadas, sendo provenientes das cidades de Crato-CE, Picos-PI, Ouricuri-PE, Cajazeiras-PB, Patos-PB e Souza-CE. Considerando as 730 fichas epidemiológicas preenchidas, 38,6% das crianças estudadas estavam na faixa etária entre 12 e 24 meses de idade. Em relação ao sexo das crianças estudadas, 51,4% foram do sexo masculino (**Tabela 4**).

Em geral as variáveis analisadas pela ficha epidemiológica (sexo, idade, alimentação, grau de escolaridade da mãe, renda familiar, tipo de moradia, tipo de esgotamento da casa e presença de sanitário dentro da casa) não foram observadas diferenças significativas entre casos e controles.

Quanto à escolaridade materna, um responsável não forneceu tal informação (0,1%). Temos que apenas 2,6% (19/730) das mães possuíam superior completo.

Na caracterização da população estudada, foram observados fatores socioeconômicos. Dentre as 365 crianças do grupo caso, somente 8,9% (5/365) eram provenientes de famílias com renda superior a dois salários mínimos.

TABELA 4- Detalhes da população estudada e informações socioeconômicas das 353 crianças com infecção por EPEC.

Parâmetros	Casos		Controles		Total
	EPEC Sim	EPEC Não	EPEC Sim	EPEC Não	
Sexo					
Masculino	32 (57,2%)	156 (50,5%)	32 (51,6%)	158 (52,2%)	375 (51,4%)
Feminino	24 (42,8%)	153 (49,5%)	30 (48,4%)	145 (47,8%)	354 (48,6%)
Idade (meses)					
2 – 6	13 (23,2%)	70 (22,7%)	1 (1,6%)	34 (11,3%)	118 (16,1%)
6 – 12	23 (41%)	109 (35,3%)	26 (41,9%)	96 (31,7%)	254 (34,7%)
12 – 24	16 (28,6%)	106 (34,3%)	24 (38,7%)	136 (44,8%)	282 (38,6%)
24 – 36	4 (7,2%)	24 (7,7%)	11 (17,8%)	37 (12,2%)	77 (10,6%)
Alimentação					
Amamentação exclusiva	1 (1,8%)	19 (6,2%)	2 (3,3%)	9 (2,9%)	31(4,3%)
Amamentação não exclusiva	33 (58,9%)	157 (50,8%)	29 (46,7%)	123 (40,6%)	342 (46,8%)
Não mama mais	14 (25%)	115 (37,2%)	25 (40,4%)	139 (45,9%)	293 (40,2%)
Nunca mamou	8 (14,3%)	18 (5,8%)	6 (9,6%)	32 (10,6%)	64 (8,7%)
Renda (salário mínimo)					
< ½	4 (7,1%)	39 (12,6%)	15 (24,2%)	49 (16,1%)	99 (13,5%)
½ á 1	21 (37,5%)	90 (29,2%)	21 (33,9%)	81 (26,8%)	206 (28,2%)
1 á 2	26 (46,5%)	150 (48,5%)	23 (37%)	132 (43,5%)	324 (44,3%)

2 á 3	5 (8,9%)	30 (9,7%)	3 (4,9%)	41 (13,6%)	60 (8,2%)
Grau de escolaridade da mãe					
Não estudou	1 (1,8%)	12 (3,8%)	0 (0,0%)	7 (2,4%)	20 (2,7%)
Primário incompleto	8 (14,2%)	74 (23,9%)	11 (17,7%)	73 (24,1%)	166 (22,8%)
Primário completo	5 (8,9%)	34 (11%)	11 (17,7%)	41 (13,6%)	91 (12,4%)
Secundário incompleto	21 (37,5%)	102 (33,1%)	22 (35,4%)	82 (27%)	227 (31,1%)
Secundário completo	17 (30,3%)	69 (22,4%)	15 (24,1%)	77 (25,4%)	178 (24,3%)
Superior incompleto	3 (5,3%)	8 (2,5%)	2 (3,2%)	12 (3,9%)	25 (3,4%)
Superior completo	1 (1,8%)	7 (2,2%)	0 (0,0%)	11 (3,6%)	19 (2,6%)
Tipo de esgotamento sanitário da casa					
Fossa	26 (46,4%)	143 (46,2%)	30 (48,3%)	133 (43,9%)	332 (45,5%)
Esgoto público	26 (46,4%)	153 (49,5%)	31 (50%)	156 (51,4%)	366 (50,2%)
Sem sistema de esgoto	4 (7,2%)	13 (4,3%)	1 (1,7%)	14 (4,7%)	32 (4,3%)
Sanitário dentro de casa					
Sim	46 (82,2%)	256 (82,8%)	56 (90,4%)	265 (87,5%)	623 (85,4%)
Não	10 (17,8%)	53 (17,2%)	6 (9,6%)	38 (12,5%)	107 (14,6%)

Em relação ao número de crianças por residência, cada criança foi proveniente de uma residência, totalizando 730 residências. Dentre elas, 70,5% (514/730) tinham apenas uma criança por residência. A distribuição de criança por residência, de acordo por cidade, é mostrada na **Tabela 5**.

TABELA 5 – Distribuição da população incluída no estudo de acordo com o local de origem e o número de crianças por residência.

Crianças por residência	Crato		Picos		Ouricuri		Cajazeiras		Total	
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
1	137	18,7	146	20	136	18,6	95	13,0	514	70,5
2	56	7,7	48	6,6	54	7,4	30	4,1	188	25,7
3	6	0,9	6	0,9	10	1,3	2	0,3	24	3,2
4	1	0,1	0	0,0	0	0,0	3	0,4	4	0,6
Total	200	27,4	200	27,5	200	27,3	130	17,8	730	100,0

Os índices antropométricos, que incluíram altura, peso e circunferência da cabeça, foram obtidos em, pelo menos, 728 crianças e, juntamente com a idade, foram utilizados para o cálculo dos escores-z e do IMC. As medidas de resumo dos índices antropométricos da população estudada estão descritas na **Tabela 6**.

TABELA 6– Medidas de resumo dos dados antropométricos coletados da população de estudo.

Medidas antropométricas	Nº.	Média	Desvio padrão
Altura (cm)	728	77	9,4
Peso (Kg)	730	11,0	6,3
Circunferência da cabeça (cm)	729	47	1,5
IMC (Kg/m ²) ^a	728	17,2	2,8
HAZ ^b	728	-0,6	1,2
WAZ ^b	730	-0,2	1,3
WHZ ^b	728	0,8	1,2

^a IMC = divisão do peso (Kg) pela altura (m) ao quadrado; ^b Os escores-z altura-por-idade (HAZ), peso-por-idade (WAZ) e peso-por-altura (WHZ) foram convertidos a partir da altura, peso e idade das crianças e os valores obtidos foram comparados com o valor médio da população.

Quando questionados sobre a ocorrência de diarreia nos últimos 14 dias, 49,7% dos pais ou responsáveis responderam “sim” (**TABELA 7**). Como esse foi o critério adotado para a definição dos grupos a serem analisados, as crianças incluídas nesse estudo foram divididas em casos (365) e controles (365).

TABELA 7 – Distribuição da população de estudo quanto à ocorrência de diarreia nos últimos 14 dias.

Apresentou diarreia nos últimos 14 dias	Nº	%
Sim	365	50,0
Não	365	50,0
Total	730	100,0

5.2 PREVALÊNCIA DE EPEC

O diagnóstico molecular de DEC, foi baseado nos resultados do Multiplex-PCR analisados pela tecnologia xMAP, onde considerou-se positivo pela presença de pelo menos um dos genes alvos. Dessa maneira, foi possível perceber uma prevalência dos patógenos EAEC (31,31%), EPEC (16,15%), ETEC (7,72%) e EHEC (1,52%). A **TABELA 8** apresenta os valores de prevalência para todos os patógenos analisados para esta população de estudo.

Incluindo as quatro cidades simultaneamente observou-se que não houve associação estatística entre as crianças caso e a presença dos patógenos EPEC e ETEC. Contudo, encontramos associação significativa entre as crianças do grupo caso com a presença dos patógenos: EAEC ($p=0,0163$) e EHEC ($p=0,0054$). Segundo os resultados obtidos, a taxa de infecção por EPEC foi a segunda de maior prevalência. Entre as 118 amostras com resultado positivo para EPEC, 6,8% (8/118) foram positivas para EPEC típica e 93,2% (110/118) para EPEC atípica.

Para EPEC foram obtidos resultados para 365 casos e 365 controles analisados. No grupo caso 15,3% (56/365) foram positivos. Entre os controles, o percentual de positivos para EPEC foi de 16,9% (62/365).

TABELA 8 – Prevalência de agentes etiológicos relacionados à diarreia em crianças do Semiárido Brasileiro.

Agente Etiológico	Casos		Controles		Total	P
	Nº.	%	Nº.	%	Nº. %	
EPEC	56/365	(15,4%)	62/365	(16,9%)	118/730 (16,15%)	0,6153
EAEC	127/357	(35,5%)	100/368	(27,1%)	227/725 (31,31%)	0,0163*

EPEC	29/357 (8,1%)	27/368 (7,3%)	56/725 (7,72%)	0,7811
EHEC	10/357 (2,8%)	1/368 (0,2%)	11/725 (1,52%)	0,0054**

Considerando toda a população amostral (caso/controle) das cidades de Crato, Picos, Ouricuri e Cajazeiras, foi possível observar uma maior prevalência de EPEC, na cidade de Crato (CE), 63/200 (31,5%). E percebeu uma menor prevalência desse patógeno em Cajazeiras (PB) 9/130 (6,9%) (**Tabela 9**).

TABELA 9 – Prevalência de EPEC em crianças das cidades de Crato-CE, Picos-PI, Ouricuri-PE e Cajazeiras-PB.

Cidades do Estudo	Casos		Controles		Total	
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
Crato	28/100	(28%)	35/100	(35%)	63/200	(31,5%)
Picos	8/97	(8,2%)	11/103	(10,6%)	19/200	(9,5%)
Ouricuri	15/100	(15%)	12/100	(12%)	27/200	(13,5%)
Cajazeiras	5/68	(7,3%)	4/62	(6,4%)	9/130	(6,9%)
Total	56/365	(15,3%)	62/365	(16,9%)	118/730	(16,2%)

5.3 DADOS CLÍNICOS

De acordo com as respostas dos pais ao questionário, temos que no grupo caso: 98,9% (361/365) das crianças apresentavam diarreia aguda, definida como diarreia com duração inferior a 14 dias. Quanto ao número de evacuações, foi constatado que em média, as crianças apresentaram 3 evacuações/dia.

Dentre a população do grupo caso, os formulários foram completamente preenchidos, revelando a seguinte distribuição dos parâmetros clínicos: 23,6% (86/365) relataram a ocorrência de dor abdominal; em 25,7% (94/365) e apenas 15,1% (55/365) apresentaram vômito (**Tabela 10**). Quando questionados sobre a ocorrência de diarreia nas últimas 24 horas, 98,9% (361/365) dos pais ou responsáveis responderam que “sim”. Não houve associação significativa entre a presença de EPEC e qualquer sintoma clínico investigado.

Tabela 10- Caracterização dos parâmetros clínicos relacionados com o grupo caso.

Parâmetros	Casos
Dor abdominal	
Sim	86 (23,6%)
Não	279 (76,4%)
Total	365 (100,0%)
Vômito	
Sim	94 (25,7%)
Não	271 (74,3%)
Total	365 (100,0%)

Muco nas fezes

Sim	55 (15,1%)
Não	310 (84,9%)
Total	365 (100,0%)

Febre

Sim	97 (26,5%)
Não	268 (73,5%)
Total	365 (100,0%)

Desidratação

Moderada	114 (31,3%)
Grave	2 (0,5%)
Grau não identificado	2 (0,5%)
Não está desidratada	247 (67,7%)
Total	365 (100,0%)

Diarreia nas últimas 24 horas

Sim	361 (98,9%)
Não	4 (1,1%)
Total	365 (100,0%)

5.4 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS ISOLADOS DE EPEC

Dentre as 56 crianças infectadas por EPEC 50% (28/56) eram da cidade de Crato. Essa predominância da cidade de Crato, também foi observada entre o grupo de 35/62

(56,4%) crianças controle. Como demonstrado na **Tabela 11**, os grupos caso e controle não diferiram quanto às cidades do estudo.

Tabela 11- Distribuição de *Escherichia coli* enteropatogênica por cidades do estudo em relação ao grupo caso e controle.

Cidades do Estudo	Casos		Controles		Total	
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
Crato	28/56	(50%)	35/62	(56,4%)	63/118	(53,4%)
Picos	8/56	(14,2%)	11/62	(17,8%)	19/118	(16,1%)
Ouricuri	15/56	(26,7%)	12/62	(19,4%)	27/118	(22,9%)
Cajazeiras	5/56	(8,9%)	4/62	(6,5%)	9/118	(7,6%)
Total	56	(100%)	62	(100%)	118	(100%)

Em relação à EPEC típica e EPEC atípica por cidade do estudo, observou-se uma maior proporção de crianças com EPEC típica no Crato (87,5%-7/8). Observamos que as cidades de Picos e Cajazeiras, não apresentou presença de EPEC típica. A EPEC atípica apresentou um maior percentual no Crato 50,9% (56/110), seguida de Ouricuri, Picos e Cajazeiras (23,6%, 17,3% e 8,2%), respectivamente (**Tabela 12**).

Tabela 12- Distribuição de EPEC típica e atípica relacionadas às cidades do presente estudo.

Distribuição por cidade	EPEC Típica	EPEC Atípica	Total
	Nº (%)	Nº (%)	
Crato	7 (87,5%)	56 (50,9%)	63 (53,3%)
Picos	0 (0,0%)	19 (17,3%)	19 (16,2%)
Ouricuri	1 (12,5%)	26 (23,6%)	27 (22,9%)
Cajazeiras	0 (0,0%)	9 (8,2%)	9 (7,6%)
Total	8 (100%)	110 (100%)	118 (100%)

5.5 PESQUISA DOS GENES DE VIRULÊNCIA DE EPEC

A prevalência dos genes de virulência de EPEC estudados nos grupos casos e controles apresentaram-se de forma heterogênea. A **Tabela 13** mostra a distribuição de positividade dos genes *espB*, *espD*, *tir*, *espC*, *espZ*, *espL*, *Ler*, *Map*, *espG*, *espH*, *nleE*, *nleF*, *nleB*, *paa*, *nleC*, *nleD*, *espJ*, *cesT* e *espP*, isoladamente, entre as amostras positivas para EPEC dos grupos caso e controle. Dentre as amostras do grupo caso os genes de maior prevalência foram: *ler*, *cesT*, *espB* e *espG* (64,2%; 62,5%; 53,5% e 46,4%), respectivamente.

Dentre as amostras controle os genes de maior prevalência foram: *ler*, *espG*, *espB*, *espH* e *espZ* (70,9%; 58,1%; 54,8%; 51,6% e 50,0%), respectivamente. Não houve associação estatística entre quaisquer genes de virulência e a subpopulação de controle.

A **Tabela 13** mostra a distribuição de positividade dos genes de virulência estudados isoladamente entre as amostras das subpopulações caso e controle. Quando

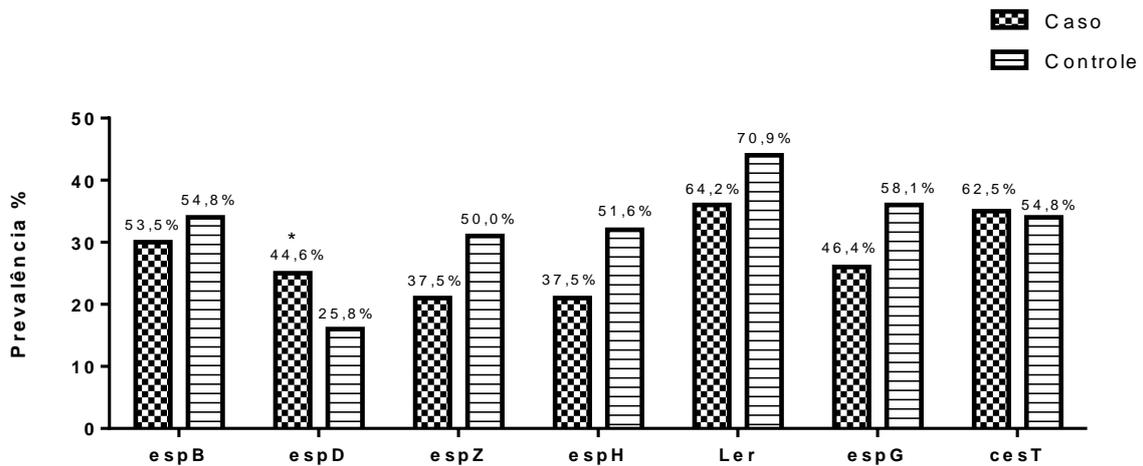
observado isoladamente, o gene *espD* obteve associação significativa entre a presença do gene e a subpopulação caso ($p=0,0354$, com $OR=2,319$) (**Figura 1**).

Tabela 13 – Percentual de positividade dos genes codificadores de fatores de virulência isolados entre amostras positivas para EPEC dos grupos caso e controle.

Tabela Genes Virulência	Casos	Controles	Total	P
	Nº (%)	Nº (%)		
<i>EspB</i>	30 (53,5%)	34 (54,8%)	64 (54,2%)	1,0000
<i>EspD</i>	25 (44,6%)	16 (25,8%)	41 (34,7%)	0.0354*
<i>Tir</i>	3 (5,3%)	2 (3,2%)	5 (4,2%)	0,6671
<i>NleB</i>	16 (28,5%)	13 (20,9%)	29 (24,5%)	0,3948
<i>Map</i>	22 (39,2%)	25 (40,3%)	47 (39,8%)	1,0000
<i>EspJ</i>	12 (21,4%)	16 (25,8%)	28 (23,7%)	0,6667
<i>EspL</i>	20 (35,7%)	16 (25,8%)	36 (30,5%)	0,3171
<i>EspC</i>	15 (26,7%)	17 (27,4%)	32 (27,1%)	1,0000
<i>EspZ</i>	21 (37,5%)	31 (50%)	52 (44,1%)	0,1967
<i>EspH</i>	21 (37,5%)	32 (51,6%)	53 (44,9%)	0,1412
<i>Paa</i>	21 (37,5%)	24 (38,7%)	45 (38,1%)	1,0000
<i>Ler</i>	36 (64,2%)	44 (70,9%)	80 (67,7%)	0,5543
<i>EspG</i>	26 (46,4%)	36 (58,1%)	62 (52,5%)	0,2682
<i>NleE</i>	14 (25%)	16 (25,8%)	30 (25,4%)	1,0000
<i>NleF</i>	22 (39,2%)	24 (38,7%)	46 (38,9%)	1,0000
<i>CesT</i>	35 (62,5%)	34 (54,8%)	69 (58,4%)	0,4564
<i>EspP</i>	13 (23,2%)	23 (37,1%)	36 (30,5%)	0,1136

<i>NleD</i>	4 (7,1%)	4 (6,4%)	8 (6,7%)	1,0000
<i>NleC</i>	10 (17,9%)	18 (29,1%)	28 (23,7%)	0,1951

Figura 1: Distribuição dos genes de virulência de maior prevalência entre isolados de EPEC.



A **Tabela 14** mostra a distribuição de positividade dos genes de virulência estudados isoladamente entre as amostras EPEC típica e atípica. Os genes de maior prevalência em EPEC típica foram: *espB*, *espH*, *ler* e *cest* (50,0% para todos os genes). Quando observados isoladamente os genes de maior prevalência em EPEC atípica foram: *ler*, *cest*, *espB* e *espG* (69,1%, 59,1%, 54,5% e 53,6%), respectivamente. Não houve associação estatística entre quaisquer genes de virulência com EPEC típica e atípica.

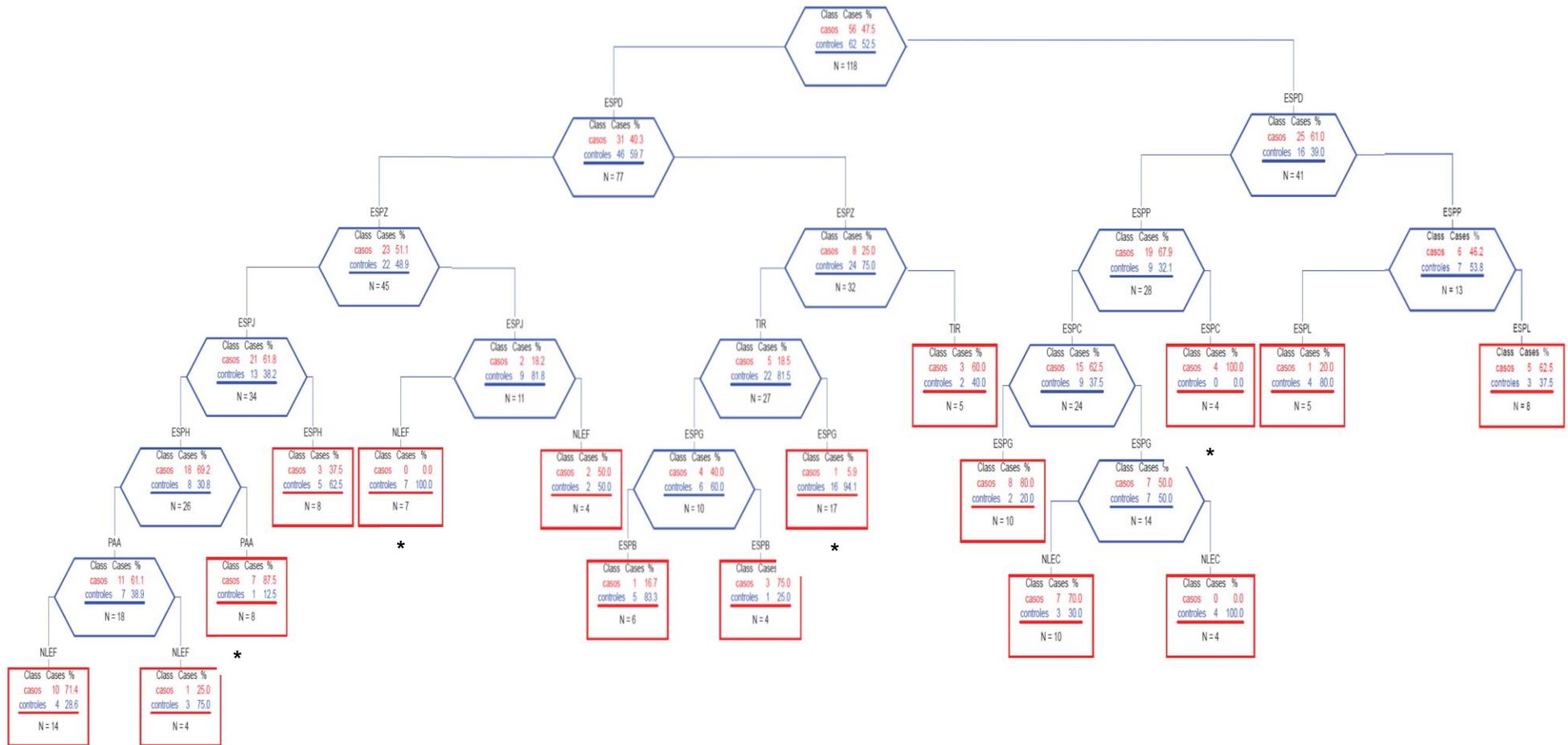
Tabela 14 – Percentual de positividade dos genes codificadores de fatores de virulência isolados entre amostras positivas para EPEC típica e EPEC atípica.

Tabela Genes Virulência	EPEC típica	EPEC atípica	Total	P
	Nº (%)	Nº (%)		
<i>EspB</i>	4 (50,0%)	60 (54,5%)	64 (54,2%)	1,0000
<i>EspD</i>	3 (37,5%)	38 (34,5%)	41 (34,7%)	1,0000
<i>Tir</i>	1 (12,5%)	4 (3,6%)	5 (4,2%)	0,3675
<i>NleB</i>	2 (25,0%)	27 (24,5%)	29 (24,5%)	1,0000
<i>Map</i>	3 (37,5%)	44 (40,0%)	47 (39,8%)	1,0000
<i>EspJ</i>	2 (25,0%)	26 (23,6%)	28 (23,7%)	1,0000
<i>EspL</i>	1 (12,5%)	35 (31,8%)	36 (30,5%)	0,3254
<i>EspC</i>	3 (37,5%)	29 (26,3%)	32 (27,1%)	0,6812
<i>EspZ</i>	3 (37,5%)	49 (44,5%)	52 (44,1%)	1,0000
<i>EspH</i>	4 (50,0%)	49 (44,5%)	53 (44,9%)	1,0000
<i>Paa</i>	2 (25,0%)	43 (39,1%)	45 (38,1%)	0,7086
<i>Ler</i>	4 (50,0%)	76 (69,1%)	80 (67,7%)	0,2690
<i>EspG</i>	3 (37,5%)	59 (53,6%)	62 (52,55%)	0,4747
<i>NleE</i>	1 (12,5%)	29 (26,3%)	30 (25,4%)	0,6777
<i>NleF</i>	1 (12,5%)	45 (40,9%)	46 (38,9%)	0,1340
<i>CesT</i>	4 (50%)	65 (59,1%)	69 (58,4%)	0,7169
<i>EspP</i>	1 (12,5%)	35 (31,8%)	36 (30,5%)	0,4321
<i>NleD</i>	1 (12,5%)	7 (6,3%)	8 (6,7%)	0,4399
<i>NleC</i>	1 (12,5%)	27 (24,5%)	28 (23,7%)	0,6783

Para investigar se uma combinação específica de genes de virulência pôde ser correlacionada com a doença, usamos a análise CART, que constrói um modelo em forma gradual e o resultado é uma combinação de fatores mais fortemente associados com casos ou controles.

Foram analisados todos os ensaios genotípicos de 56 casos e 62 controles. O ajuste para o conjunto de dados é mostrado na **Figura 9**. A análise sugeriu clusters importantes, que foram associados a cada grupo estudado. As amostras que acomodam o gene *paa*, mas falta os genes *espH*, *espJ* e *espP* foram associados com as crianças do grupo caso (crianças com diarreia) ($p=0.0262$, $OR=8,714$ e $95\% CI=1.036-73.28$). A presença do gene *espC* com a ausência do gene *espP* foi associado com as crianças com diarreia ($p=0.0479$, $OR=10,71$ e $95\% CI=0.5634-203.8$). Além disso, a ausência de *nleF* na presença de *espJ* foi associado com o grupo controle ($p=0.0137$, $OR=0,06549$ e $95\% CI=0.003649-1.175$). Outra associação com o grupo controle foi a amostra ter o gene *espG* com ausência de *tir* ($p=0.0001$, $OR=0,5227$ e $95\% CI=0.006673-0.4095$).

Figura 9: Modelo de árvore para genes de virulência em amostras de casos e controles para EPEC. A presença ou ausência de cada gene entre os grupos estudados é dada dentro de cada nó.



Os nós terminais são indicados pelas caixas vermelhas. A árvore é de natureza hierárquica. *P≤0.05.

6 DISCUSSÃO

As doenças diarreicas ainda representam um importante problema de saúde pública mundial, e estas se manifestam com diferenças regionais relevantes no que concerne a prevalência dos patógenos associados com sua etiologia, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento (GUERRANT et al., 2001; GUERRANT et al., 2013). Mesmo com a introdução da TRO, que constituiu um grande avanço no combate à mortalidade infantil, as infecções entéricas, com ou sem eventos diarreicos, continuam sendo alvo de uma atenção especial devido ao aparecimento de enteropatógenos emergentes (BARTELT et al., 2013).

De acordo com um estudo realizado por Guerrant e colaboradores, 2008, as consequências das infecções entéricas, com ou sem eventos diarreicos, e o surgimento da desnutrição nos primeiros anos de vida gera um déficit no crescimento e desenvolvimento das crianças. O impacto desse ciclo vicioso da diarreia-desnutrição, em longo prazo, inclui comprometimento imunológico, má absorção de nutrientes, um aumento da intensidade e dano da infecção, causando danos físicos e cognitivos no indivíduo.

Alguns estudos realizados no Brasil apresentaram a alta incidência de doenças diarreicas causadas por patógenos entéricos (ARAUJO et al., 2007; SOUZA et al., 2009; TRABULSI et al., 2002). Apenas no ano de 2010, um valor de R\$ 9,8 milhões foi custeado com internamentos de crianças com diarreia no país (MENDES et al., 2013). A taxa de ocorrência de eventos diarreicos pode variar de 3-12 episódios/criança/ano, dependendo da região estudada. Essa taxa acaba sendo maior em crianças menores de dois anos de idade, e alguns fatores podem estar associados com a frequência dessas doenças, tais como: morar nas Regiões Norte/Nordeste, o desmame precoce, a prevalência de crianças do sexo masculino, a desnutrição infantil, o baixo poder de aquisição das famílias e o baixo grau de escolaridade da mãe (FIOCRUZ, 2008; MELO et al., 2008).

Nunes e colaboradores, 2012, relataram o perfil dessas doenças, mais especificamente no Semiárido Brasileiro considerado uma região bastante pobre e endêmica (NUNES et al., 2012). Em torno de 80% das cidades dessa região são constituída por rochas cristalinas, onde também há a predominância de águas com teor elevado de sais captados em poços de baixa vazão (CIRILO, 2008). E segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2012), 85,4% dos domicílios do Semiárido Brasileiro contam com rede geral de água. Logo, a proporção encontrada neste

presente estudo de caso-controle, realizado no período de Março de 2009 a Setembro de 2011, com 730 crianças de dois a 36 meses de idade, residentes do Semiárido Brasileiro, que foram atendidas em postos de saúde devido à manifestações de diarreia, é bastante semelhante aos dados do IBGE, pois 94,1% (687/730) das crianças participantes residiam em casas com água encanada.

Neste estudo foram detalhadas as condições gerais apresentadas pelas crianças analisadas, além de determinar a epidemiologia das *E. coli* diarreiogênicas (DEC). Estas bactérias são de importante relevância para a saúde pública, porém elas não são rotineiramente procuradas como patógenos entéricos em laboratórios clínicos. Assim, a epidemiologia das infecções por DEC permanecem pouco elucidadas em muitas partes do mundo, especialmente em áreas endêmicas (LOZER et al., 2013). Algumas pesquisas puderam constatar uma proporção de maior prevalência de DEC entre caso e controle (ALMEIDA et al., 1998; MORENO et al., 2008; SOUZA et al., 2002). Já a redução dessa proporção neste atual estudo pode ser explicada pela mudança do perfil epidemiológico de enteropatógenos envolvidos com as doenças diarreicas.

Primeiramente, para a detecção desses patógenos, as técnicas de biologia molecular são importantes ferramentas de diagnóstico (ALBERT et al., 2009; ARAUJO et al., 2007). No atual estudo foi realizado o diagnóstico desses patógenos por meio de painéis de PCR em Luminex, que foram executados de acordo com protocolos previamente estabelecidos (LIU et al., 2011; TANIUCHI et al., 2012). Os resultados adquiridos foram relatados em unidades de intensidade de fluorescência média (IFM) para comparar os valores em tempo real de ciclos de PCR em relação aos valores de PCR em Luminex. A intensidade de fluorescência relativa foi calculada com o percentil contra a intensidade de fluorescência mais elevada observada para cada alvo, ou seja, o ponto de corte para a positividade IFM foi definido como zero e a máxima IFM em 100% (LIU et al., 2012).

Com tais técnicas, torna-se praticável a elucidação da epidemiologia de cada categoria de DEC em diarreia infantil, que pode, então, variar de acordo com a área geográfica (DUPONT, 2005; NATARO; KAPER et al., 1998; OKEKE, 2009; REYES et al., 2010), uma vez que hoje os patógenos intestinais possuem uma mobilidade sem precedentes. Portanto, a vigilância ativa da infecção intestinal é essencial para a determinação do padrão de cepas em circulação, a fim de conceber estratégias de

prevenção e tratamento adequados para doenças associadas (NUNES et al., 2012; PAYMENT; RILEY, 2002).

Para este estudo foi considerada uma população amostral de 365 casos e 365 controles, dos quais foi possível constatar as seguintes DEC: EAEC (31,31%), EPEC (16,7%), ETEC (7,72%), EHEC (5,10%). A prevalência de ETEC apresentou-se baixa, concordando com pesquisas realizadas em diferentes partes do Brasil (ARAUJO et al., 2007; MORENO et al., 2010). Enquanto que, EHEC e EIEC se mostraram raramente prevalentes, sugerindo um papel mais discreto nas diarreias infantis (ARAUJO et al., 2007; FRANZOLIN et al., 2007; MORENO et al., 2010; SPANO et al., 2008). Ao passo que, EAEC foi apresentada como o patótipo de *E.coli* mais predominante na população estudada, o que condiz com resultados relatados anteriormente (LOZER, 2013).

O foco desta pesquisa foi voltado para o patótipo EPEC, que é uma das principais causas de diarreia infantil nos países em desenvolvimento (HERNANDES et al., 2009; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; MOURA et al., 2009), inclusive no Brasil (ARAUJO et al., 2007; SOUZA et al., 2009; TRABULSI et al., 2002). Esta foi reportada com uma prevalência de 16,2% (118/730), o que evidencia que esta pesquisa condiz com os dados nacionais relatados anteriormente, que apresentaram uma proporção de 15,4%, na região Nordeste do Brasil, para esta bactéria (NUNES et al., 2012). Outro estudo conduzido por Souza et al, 2002, encontrou a frequência de 16,2% de EPEC, sendo 9,1% como único agente nos casos e 4,7% nos controles.

As frequências de infecção por esta bactéria costumam diminuir após 24 meses de idade, e isso pode estar relacionado com a imunidade específica desenvolvida após contato repetido com os organismos (GÓMEZ-DUARTE et al., 2010). Assim como no trabalho de Gomez-Duarte, foi possível observar neste recente estudo que apenas 10,6% (77/730) das crianças acima de 24 meses de idade foram reportadas com EPEC. E a associação com diarreia foi particularmente forte em bebês com menos de 12 meses de idade infectados com cepas de EPEC. Nestes foi observado que 41% (23/56) das crianças de seis a 12 meses do grupo caso estavam infectadas pela bactéria.

Foi constatada também a relação de EPEC típica e EPEC atípica, os quais os dados se mostraram condizentes com dados da literatura. Com um número de 118 isolados de EPECs, as EPECs típicas se apresentaram na relação de 8 (0,6%) e as EPECs atípicas se mostraram com a relação de 110 (93,3%). Estudos epidemiológicos já

havam constatado uma frequência maior de isolados de EPEC atípica quando comparadas a EPEC típica (OCHOA et al., 2012).

Em relação à colonização dos patógenos, esta pode ser resultado de uma complexa interação de fatores, como as condições ambientais, a idade da criança, o aleitamento materno, fatores de proteção da mãe e estado nutricional e imunológico do indivíduo, incluindo a susceptibilidade deste à infecção (CONTRERAS et al., 2010). E no presente estudo foi demonstrado que a EPEC atípica, 93,3% (110/118), era comum tanto em crianças com sintomatologia diarreica, como em crianças do grupo controle (sem diarreia), demonstrando uma colonização do patógeno, nessas últimas, sem a indução da doença. Esses relatos também foram discutidos em estudos realizados anteriormente, tanto em países desenvolvidos, quanto em desenvolvimento (AFSET et al., 2003; BLANCO et al., 2006; KNUTTON et al., 2001; OCHOA et al., 2008).

Em referência à renda familiar mensal, temos que apenas 8,2% (60/730) das famílias obtinham um rendimento mensal superior a dois salários mínimos, ao passo que 13,5% (99/730) dos responsáveis informaram ter um rendimento mensal abaixo de um salário mínimo. Anteriormente, Heller e colaboradores, 2004 demonstraram que uma maior renda familiar consiste como um fator de proteção para as infecções entéricas, e em concordância com o autor, o atual estudo observou o decrescente número de eventos diarreicos à medida que a renda familiar aumentava.

Por conseguinte, um trabalho realizado na África demonstrou um aumento no risco de crianças adquirirem doenças diarreicas cujas mães não obtiveram educação continuada (OKOLO et al., 2012). O grau de escolaridade da mãe, assim como a renda familiar, é importante para a precaução das doenças diarreicas nos filhos. E no atual estudo, a maioria das mães, 12,4% (91/730), estudaram por um período apenas de seis anos, o que equivale ao ensino fundamental completo.

Com relação ao fator de amamentação exclusiva, a Organização Mundial da Saúde (OMS) aconselha que esta ocorra até os seis meses de idade da criança, e que só após este período sejam realizados a introdução de outros alimentos. Em estudo realizado em 2012 foi possível verificar que as crianças com acesso a amamentação exclusiva até os seis meses de vida, vivenciaram uma menor taxa de morbidade por infecções entéricas, com ou sem eventos diarreicos (KRAMER; KAKUMA, 2012). E no presente estudo, demonstramos que, de todas as crianças analisadas, apenas 4,3% (31/730) foram

amamentadas exclusivamente, assim, gerando uma taxa maior de diarreias infecciosas. Além da melhor proteção contra infecções entéricas, o aleitamento materno exclusivo é frequentemente associado a um melhor desenvolvimento neurológico até o início da idade adulta (AGOSTINI; BASELLI; MAZZONI, 2012), uma vez que a alta frequência de infecções entéricas na criança pode provocar déficits cognitivos (GUERRANT, 2013).

Quanto às características clínicas das doenças apresentadas, de acordo com as respostas dos pais ou responsáveis, foram resumidos em desidratação moderada (31,3%-114/365), febre (26,5%-97/365), dor abdominal (23,6%-86/365) e muco nas fezes (15,1%-55/365). A maioria das crianças apresentou diarreia aguda, definida como diarreia com duração inferior a 14 dias. Em média, foi constatado que as crianças tinham 3,3 evacuações/dia (MANDEVILLE et al., 2009; MOORE et al., 2010). E de acordo com Moore e colaboradores, 2010, a diarreia do tipo persistente consiste em um importante indutor da morbidade de infecções entéricas, pois esta amplia o risco de entrada da criança no ciclo vicioso diarreia-desnutrição, mencionado anteriormente e já descrito como um limitante da capacidade absorptiva intestinal, contribuindo para o déficit físico e cognitivo (WALKER et al., 2007). E tendo em vista o perfil da população estudada, observa-se que medidas de intervenção para conter os episódios de diarreia infantil precisa de uma abordagem maior, com o intuito de aumentar o entendimento dos pais ou responsáveis sobre a doença, pois estes só procuraram a intervenção médica após a ocorrência de diarreia persistente.

Esse tipo de diarreia pode atribuir um impacto negativo nas medidas antropométricas da criança (LIMA et al., 2000). Essas medidas, que representam uma mistura dos escores-z, são fundamentais para a interpretação desses escores, já que o valor absoluto isolado de uma medida não apresenta qualquer resultado significativo (WHO, 1995). Assim, para medir os índices antropométricos da população estudada, foi utilizado os cálculos dos escores-z e do IMC. Nos grupos casos e controles positivos para EPEC não foi observado impacto da infecção sintomática ou assintomática causada pela EPEC no estado nutricional das crianças estudadas. A ausência de associação entre a doença e as medidas antropométricas obtidas nesse estudo pode ser resultado do elevado percentual de casos de diarreia aguda analisadas.

No que concerne a incidência de diarreia por cepas de EPEC típicas em países em desenvolvimento, alguns estudos verificaram que nos últimos anos houve uma ligeira

diminuição na taxa. Porém, não está claro se este dado é um resultado da melhoria das condições higiênico-sanitárias, ou é consequência de uma identificação mais específica dos patógenos causadores de diarreia (OCHOA, CONTRERAS, 2011). De fato, o princípio para a identificação de EPEC era baseado principalmente na sorotipagem, e agora está claro que esta abordagem pode apresentar um falso-positivo, e que estas bactérias são melhores identificadas com base em suas características genotípicas (SANTONA et al., 2013).

O estudo de Vieira e colaboradores em 2010 mostrou que a presença dos genes de virulência codificados pela ilha de patogenicidade LEE são essenciais para a capacidade de EPEC causar a lesão A/E, que é uma característica dominante em EPEC típica (MOHAMMA et al., 2013). Os resultados deste e de outros estudos coletivamente poderia apontar as diferenças evolutivas destes isolados em relação ao rearranjo do genoma, devido à transferência horizontal de genes (MOHAMMA et al., 2013; OCHOA et al., 2012; VIEIRA et al., 2010).

Outro fator determinante de virulência de EPEC típica é o regulador codificado pelo plasmídeo EAF, que está envolvido na auto agregação e elevada expressão do BFP, proteínas e o gene *tir* durante a infecção (IIDA et al., 2010; OKEKE et al., 2001). Assim, as EPECs típicas se mostram mais homogênea em suas características de virulência quando comparada às cepas de EPEC atípicas (TRABULSI et al., 2002). O gene *bfpA* é um importante determinante de virulência para o diagnóstico de EPEC típica (DULGUER et al., 2003; VIEIRA et al., 2001). Em contrapartida, a EPEC atípica parece ser mais comum nos países industrializados, mesmo que estudos enfatizem a sua difusão também em países em desenvolvimento (OCHOA et al., 2008). Porém, mesmo com o conhecimento das diferenças de ambas as cepas, são escassos os dados disponíveis sobre a distribuição geográfica da EPEC típica, provavelmente porque nem sempre esta cepa é distinguida das formas atípicas nos estudos epidemiológicos, especialmente em países com recursos limitados (SANTONA et al., 2013).

Por outro lado, Hernandez e colaboradores, 2009, observaram que houve um aumento na identificação de EPEC atípica tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento, apresentando uma prevalência de 10,5% na Alemanha e 9,3% no Iran, dentre outros. (ARAUJO et al., 2007; BLANCO et al., 2006; HERNANDES et al., 2009). No Brasil, esta cepa tem sido cada vez mais relatada e apontada como uma

causa de diarreia em diferentes centros urbanos, como em São Paulo, com a prevalência de 5,4%, Salvador com 10% e Espírito Santos com 5,5% (ÁRAUJO et al., 2007; FRANZOLIN et al., 2007; MORENO et al., 2010; SPANO et al., 2008). Embora possam existir diferenças na população estudada, a prevalência de EPEC atípica, neste e em outros estudos, ressalta o surgimento dessas cepas no Brasil (LOZER et al., 2013).

A análise das características de virulência de isolados de EPEC atípica confirma que esta bactéria está fortemente associada com diarreia crônica (AFSET et al., 2006), assim, desempenhando um forte papel na etiologia da diarreia infantil. Sugere-se, então, que mais estudos são necessários para determinar se a inclusão de marcadores genômicos pode melhorar o diagnóstico para EPEC (DONNENBERG et al., 2013). Portanto alguns estudos marcando a presença de genes de virulência em cepas de EPEC foram realizados (AFSET et al., 2006; MOHAMMA et al., 2013).

Por isso, esta atual pesquisa analisou o papel de alguns dos genes de virulência de EPEC, como o *espB*, *espD*, *tir*, *espC*, *espZ*, *espL*, *ler*, *Map*, *espG*, *espH*, *nleE*, *nleF*, *paa*, *nleC*, *nleD*, *espJ*, *cesT* e *espP*, de maneira isolada e em combinação, entre as amostras positivas para EPEC dos grupos caso e controle.

O gene *tir* foi detectado em percentuais semelhantes de amostras de EPEC extraídas de ambos os grupos (4,2%). O reduzido número de indivíduos assintomáticos incluídos em tal estudo não permitiu a determinação da importância de *tir* no desenvolvimento da diarreia causada pela infecção por EPEC.

Entre 118 isolados de EPEC que foram analisados, estiveram presentes os genes *espB* em 64 (54,2%) amostras, *espD* em 41 (34,7%) e *tir* em 5 (4,2%). Estes resultados se mostraram em conformidade com os do estudo de Kim e colaboradores, 2009. Neste último foi relatado que de 10 isolados de EPEC, houve a detecção de 70% dos genes *espB* e *espD*. Já nos achados de Contreras e colaboradores, 2012, os genes *espB*, *espD* e *tir* estavam presentes tanto em isolados de EPEC quanto em isolados de EHEC, sugerindo que a detecção desses genes pode se apresentar de maneira diversificada (MAINERA et al., 2004).

O gene *espB*, é um componente do T3SS que se liga a membros da miosina, foi observado em proporções similares entre amostras fecais de crianças com e sem diarreia (53,5% e 54,8%, respectivamente). Em virtude de sua caracterização (IIZUMI et al.,

2007), pouco existe descrito na literatura sobre a prevalência desse gene entre as cepas de EPEC.

Dentre estes genes, *espD* apresentou associação significativa entre o grupo caso. E as cepas de EPEC que carregavam os genes *ler*, *espG* e *espB* foram isoladas com frequência semelhante em ambos os grupos do estudo. Enquanto que as cepas portadoras dos genes *espH* e *espZ* foram mais predominantes no grupo controle.

Um elevado percentual de cepas de EPEC associadas ou não com diarreia apresentaram reação positiva para o gene *ler* (64,2% dos casos e 70,9% dos controles). Okeke et al, 2009 relataram a detecção de *ler* em 27,8% e 26,1% das cepas de EPEC isoladas de crianças doentes e saudáveis.

A variação na presença dos diferentes genes codificadores de fatores de virulência entre cepas de EPEC isoladas de casos e controles confirmam a heterogeneidade do grupo. A presença dos fatores pesquisados nem sempre está relacionada com a doença. Segundo Santos et al., 2015, o número desses genes encontrados nas cepas poderia ser um marcador de virulência das cepas. Neste trabalho, inúmeras cepas de EPEC isoladas que apresentaram mais de um dos genes de virulência pesquisados foram extraídas de amostras de crianças aparentemente saudáveis.

A combinação dos genes *paa* e *espC* analisados mostrou associação com a doença causada por EPEC. Entretanto, a presença do gene *espJ* em combinação com outros genes foi observada entre crianças do grupo controle. Qualquer dos fatores de virulência pesquisados mostrou-se conservados entre todas as cepas de EPEC, não são exclusivos do grupo. De acordo com Okeke et al, 2009, isso dificulta a definição dos genes de EPEC.

Estudos filogenéticos apontam as EPECs atípicas como evolutivamente mais próxima de EHEC, bactéria zoonótica capaz de causar diarreia mais severa, devido à presença da toxina *Shiga*. A fiscalização ativa com a investigação genômica destas bactérias (EPEC e EHEC) é fundamental importância para entender a ecologia e patogênese associada (BANDO et al., 2009; HARTLAND et al., 2013; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

7 CONCLUSÃO

Foi detectado, por tecnologia xMAP (LUMINEX), EPEC típica em 6,8% e 93,2% de EPEC atípica das amostras analisadas. Os dados sugerem que o ensaio por LUMINEX para diagnóstico de *Escherichia coli* diarreio gênicas é útil como teste de rastreamento em amostras de DNA de fezes.

EPEC atípica apresentou-se mais prevalente que EPEC típica, demonstrando que no período deste estudo as cepas de EPEC atípica já estavam emergindo como um importante enteropatógeno associado aos casos de diarreia.

Em relação aos parâmetros nutricionais, sociodemográficos e higiênico-sanitários avaliados pela ficha epidemiológica, não causou alteração significativa entre esses parâmetros e a detecção de EPEC. Não houve associação entre os dados clínicos e a presença de EPEC.

Os genes de virulência pesquisados neste estudo foram identificados isoladamente em proporções semelhantes entre cepas de EPEC isoladas das fezes de crianças com ou sem diarreia.

A presença do gene *espD* está associada com a doença causada por EPEC, o que mostra a importância desse gene na virulência do patógeno no desenvolvimento da doença diarreia.

As combinações dos genes de virulência mostraram que a presença dos genes *paa* e *espC* foram associados com o grupo caso. E a ausência do gene *nleF* na presença de *espJ* teve uma associação significativa com a ausência da doença.

O presente estudo vem, portanto, colaborar com a demanda de mais estudos sobre a EPEC no Brasil.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBA, K.; SINFIELD, R.; HART, C. A.; GARNER, P. Pathogens associated with persistent diarrhoea in children in low and middle income countries: systematic review. **BMC Infect Dis.**, v. 9, n. 88, p. 1-15, 2009.

AFSET, J. E.; BERGH, K.; BEVANGER, L. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 1015-1019, 2003.

AFSET, J. E.; BRUANT, G.; BROUSSEAU, R.; HAREL, J.; ANDERSSSEN, E.; BEVANGER, L.; BERGH, K. Identification of Virulence Genes Linked with Diarrhea Due to Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA Microarray Analysis and PCR. **Journal of Clinical Microbiology.**, v. 44, n. 10, p. 3703-3711, 2006.

AGOSTINI, C.; BASELLI, L.; MAZZONI, M. B. Early nutrition patterns and diseases of adulthood: a plausible link? **Eur. J. Intern. Med.**, v. 24, p. 231-232, 2012.

ARAUJO, J. M. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *E. coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 3396-3399, 2007.

ARENAS-HERNÁNDEZ, M. M. P.; MARTÍNEZ-LAGUNA, Y.; TORRES, A. G. Clinical implications of Enteroadherent *Escherichia coli*; **Curr. Gastroenterol. Rep.**, v. 14, p. 386-394, 2012.

BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M.; CANDY, D. C.; MOON, H. W. Plasmid-mediated adhesion in Enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 2, p. 534-538, 1983.

BANDO, S. Y.; ANDRADE, F. B.; GUTH, B. E.C.; ELIAS, W. P.; MOREIRA-FILHO, C. A.; CASTRO, A. P. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* genomic background allows the acquisition of non-EPECvirulence factors. **Microbiol Lett.**, p. 22-30, 2009.

BARTELT, L. A.; LIMA, A. A. M.; KOSEK, M.; YORI, P. P.; LEE, G.; GUERRANT, R. L. “Barriers” to Child Development and Human Potential: The Case for Including the “Neglected Enteric Protozoa” (NEP) and Other Enteropathy-Associated Pathogens in the NTDs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 4, p. 1935-2727, 2013.

BEGAUD, E.; JOURAND, P.; MORILLON, M.; MONDET, D.; GERMANI, Y. Detection of diarrheogenic *Escherichia coli* in children less than ten years old with and without diarrhea in New Caledonia using seven acetylaminofluorene-labeled DNA probes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, p. 26–34, 1993.

BUERIS, V.; SIRCILI, M. P.; TADDEI, C. R.; SANTOS, M. F.; FRANZOLIN, M. R.; MARTINEZ, M. B.; FERRER, S. R.; BARRETO, M. L.; TRABULSI, L. R. Detection of diarrheogenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 839-844, 2007.

CAMPELLONE, K. G.; LEONG, J. M. Tails of two tir: actin pedestal formation by Enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 82-90, 2010.

CAULFIELD, L. E.; DE ONIS, M.; BROWN, K. H.; BECKER, S. Undernutrition as an underlying cause of child deaths associated with diarrhea, pneumonia, malaria, and measles. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 80, n. 1, p. 193-198, 2004.

CLEMENTS, A.; YOUNG, J. C.; CONSTANTINOU, N.; FRANKEL, G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 71-87, 2012.

CROXEN, A. M.; LAW, J. R.; SCHOLZ, R.; KEENEY, M. K.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 822-880, 2013.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B.; Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Review Micro.**, v.8, p. 26-38, 2010.

DE MOURA, C.; FREGOLENTE, M. C.; MARTINI, I. J.; DOMINGOS, D. F.; DA SILVA, E. J.; FERRAZ, M. M.; GATTI, M. S.; DA SILVA LEITE, D. Prevalence of enteropathogen in normal feces from healthy children at an infant day care in Brazil. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 6, n. 2, p. 176-180, 2012.

DEAN, P.; KENNY, B. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 12, p. 101–109, 2009.

DEAN, P.; MARESCA, M.; KENNY, B. EPEC's weapons of mass subversion. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 8, p. 28–34, 2005.

DEAN, P.; MARESCA, M.; SCHÜLLER, S.; PHILLIPS, A. D.; KENNY, B. Potent diarrheagenic mechanism mediated by the cooperative action of three Enteropathogenic *Escherichia coli*-injected effector proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.103, n. 6, p.1876-1881, 2006.

DEBOER, M. D.; LIMA, A. A.; ORÍA, R. B.; SCHARF, R. J.; MOORE, S. R.; LUNA, M. A.; GUERRANT, R. L. Early childhood growth failure and the developmental origins of adult disease: do enteric infections and malnutrition increase risk for the metabolic syndrome? **Nutr. Rev.**, v. 70, n. 11, p. 642-53. 2012.

DENG, W.; PUENTE, J. L.; GRUENHEID, S.; LI, Y.; VALLANCE, B. A.; VÁZQUEZ, A.; BARBA, J.; IBARRA, J. A.; O'DONNELL, P.; METALNIKOV, P.; ASHMAN, K.; LEE, S.; GOODE, D.; PAWSON, T.; FINLAY, B. B. Dissecting virulence: Systematic and functional analyses of a pathogenicity island. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 3597–3602, 2004.

DHAMA, K.; CHAUHAN, R. S.; MAHENDRAN, M.; MALIK, S. V. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. **Vet. Res. Commun.**, v. 33, n. 1, p. 1-23, 2008.

DONNENBERG, M. S.; FINLAY, B. B. Combating enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infections: the way forward. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 7, p. 317-319, 2013.

DONNENBERG, M. S.; HAZEN, T. H.; FARAG, T. H.; PANCHALINGAM, S.; ANTONIO, M.; HOSSAIN, A.; MANDOMANDO, I.; OCHIENG, J. B.; RAMAMURTHY, T.; TAMBOURA, B.; ZAIDI, A.; LEVINE, M. M.; KOTLOFF, K.; RASKO, D. A.; NATARO, J. P. Bacterial Factors Associated with Lethal Outcome of Enteropathogenic *Escherichia coli* Infection: Genomic Case Control Studies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2015.

DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect Immun.**, v. 60, n. 10, p. 3953-3961, 1992.

DUPONT, H. L. What's new in enteric infectious diseases at home and abroad. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 18, n. 5, p. 407-412, 2005.

ENSERINK, R.; SCHOLTS, R.; DUIZER, E.; VENNEMA, H.; KORTBEEK, T.; SMIT, H. High detection rates of enteropathogens in asymptomatic children attending day care. **Plosone**, v. 9, p. 894-896, 2014.

FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. *Escherichia coli* infections and malnutrition. **Lancet**, v. 356, n. 1, p. 27, 2000.

FIELD, M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. **Journal Clinical Investigation**, v. 111, p. 931-946, 2003.

FIOCRUZ - FUNDAÇÃO INSTITUTO OSWALDO CRUZ. Comissão Nacional sobre Determinantes Sociais da Saúde. **As causas sociais sobre as iniquidades em saúde no Brasil**. Rio de Janeiro, 2008. Disponível em:<<http://www.cndss.fiocruz.br/pdf/home/relatorio.pdf>>. Acesso em: 27.Jun.2015.

FISCHER-WALKER, C. L.; LAMBERTI, L.; ADAIR, L.; GUERRANT, R. L.; LESCANO, A. G.; MARTORELL, R.; PINKERTON, R. C.; BLACK, R. E. Does childhood diarrhea influence cognition beyond the diarrhea-stunting pathway? **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.

FRANZIN, F. M.; SIRCILI, M. P. Locus of Enterocyte Effacement: A Pathogenicity Island Involved in the Virulence of Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Subjected to a Complex Network of Gene Regulation. **BioMed Research International**, v.15, 2015.

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN, V. F. Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: Translocation, Translocation, Translocation. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2573–2585, 2005.

GOMES, T. A. T.; RASSI, V.; MACDONALD, K. L.; RAMOS, S. R. T. S.; TRABULSI, L. R.; VIEIRA, M. A. M.; GUTH, B. E. C.; CANDEIAS, J. A. N.; IVEY, C.; TOLEDO, M. R. F.; BLAKE, P. A. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in Sao Paulo, Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 164, p. 331–337, 1991.

GIRÓN, J. A.; HO, A. S.; SCHOOLNIK, G. K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science.**, v. 254, p. 710–713, 1991.

GÓMEZ-DUARTE, G. O. Enfermedad diarreaica aguda por *Escherichia coli* enteropatógenas em Colombia. **Infectologia al dia**, v. 5, n. 31, p. 577-586, 2014.

GRANADO-VILLAR, D.; SAUTU, B. C. D.; GRANADOS, A.; Acute Gastroenteritis. **Pediatrics in Review**, v. 33, p.487-496, 2012.

GUERRANT, R. L.; DEBOER, M. D.; MOORE, S. R.; SCHARF, R. J.; LIMA, A. A. M. 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.

GUERRANT, R. L.; GILDER, T. V.; STEINER, T. S.; THIELMAN, N. M.; SLUTSKER, L.; TAUXE, R. V.; HENNESSY, T.; GRIFFIN, P. M.; DUPONT, H.; SACK, R. B.; TARR, P.; NEILL, M.; NACHAMKIN, I.; RELLER, L. B.; OSTERHOLM, M. T.; BENNISH, M. L.; PICKERING, L. K. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, p. 331-350, 2001.

GUERRANT, R. L.; ORIÁ, R. B.; MOORE, S. R.; ORIÁ, M. O.; LIMA, A. A. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. **Nutr. Rev.**, v. 66, n. 9, p. 487-505, 2008.

HARTLAND, E. L.; LEONG, J. M. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli*: ecology, pathogenesis, and evolution. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p. 1-5, 2013.

HERNANDES, R. T.; ELIAS, W. P.; VIEIRA, M. A.; GOMES, T. A. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 297, p. 137-149, 2009.

HODGES, K.; GILL, R. Infectious diarrhea: cellular and molecular mechanism. **Gut Microbes**, v. 1, n. 1, p. 4-21, 2010.

HUANG, D. B.; MOHANTY, A.; DUPONT, H. L.; OKHUYSEN, P. C.; CHIANG, T. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1303-1311, 2006.

HUANG, D. B.; OKHUYSEN, P. C.; JIANG, Z. D.; DUPONT, H. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 99, n. 2, p. 383-389, 2004.

IGUCHI, A.; THOMSON, N. R.; OGURA, Y.; SAUNDERS, D.; OOKA, T.; HENDERSON, I. R.; HARRIS, D.; ASADULGHANI, M.; KUROKAWA, K.; DEAN, P.; KENNY, B.; QUAIL, M. A.; THURSTON, S.; DOUGAN, G.; HAYASHI, T.; PARKHILL, J.; FRANKEL, G. Complete genome sequence and comparative genome analysis of

Enteropathogenic *Escherichia coli* O127: H6 strain E2348/69. **J. Bacteriol.**, v. 191, p. 347–354, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Atlas de Saneamento 2011; Acesso e qualidade das redes de saneamento segundo as unidades da Federação. Brasil, 2011. Disponível em:<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/atlas_saneamento/default_zip.shtm>. Acesso em: 27maio. 2015.

IIZUMI, Y.; SAGARA, H.; KABE, Y.; AZUMA, M.; KUME, K.; OGAWA. The enteropathogenic *E. coli* effector espB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function. **Cell Host Microbe.**, v. 2, p. 383-392, 2007.

JERSE, A.; KAPER, J. B. The *ea* gene of Enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. **Infect. Immu.**, v. 59, p. 4302–4309, 1991.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T.; Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KENNY, B. Mechanism of action of EPEC type III effector molecules. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 291, p. 469–477, 2002.

KEUSCH, G. T.; FONTAINE, O.; BHARGAVA, A.; BOSCHI-PINTO, C.; BHUTTA, Z. A.; GOTUZZO, E.; RIVERA, J.; CHOW, J.; SHAHID-SALLES, S. A.; LAXMINARAYAN, R. Diarrheal Diseases. In: JAMISON, D. T.; BREMAN, J. G.; MEASHAM, A. R.; ALLEYNE, G.; CLAESON, M.; EVANS, D. B.; JHA, P.; MILLS, A.; MUSGROV, P. (Ed.) Disease control priorities in developing countries. **New York: Oxford University Press**, v. 2, p. 371-387, 2006.

KOSEK, M.; BERN, C.; GUERRANT, R. L. The global burden of diarrhoeal disease as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bull World Health Organ.**, v. 81, n. 3, p. 197-204, 2001.

KOTLOFF, K. L.; NATARO, J. P.; BLACKWELDER, W. C.; NASRIN, D.; FARAG, T. H.; PANCHALINGAM, S.; WU, Y.; SOW, S. O.; SUR, D.; BREIMAN, R. F.; FARUQUE, A. S.; ZAIDI, A. K.; SAHA, D.; ALONSO, P. L.; TAMBOURA, B.; SANOGO, D.; ONWUCHEKWA, U.; MANNA, B.; RAMAMURTHY, T.; KANUNGO, S.; OCHIENG, J. B.; OMORE, R.; OUNDO, J. O.; HOSSAIN, A.; DAS, S. K.; AHMED, S.; QURESHI, S.; QUADRI, F.; ADEGBOLA, R. A.; ANTONIO, M.; HOSSAIN, M. J.; AKINSOLA, A.; MANDOMANDO, I.; NHAMPOSSA, T.; ACÁCIO, S.; BISWAS, K.; O'REILLY, C. E.; MINTZ, E. D.; BERKELEY, L. Y.; MUHSEN, K.; SOMMERFELT, H.; ROBINS-BROWNE, R. M.; LEVINE, M. M. Burden and a etiology of diarrhoealdisease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicentre Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet**, v. 382, p. 209–222, 2013.

KRAMER, M. S.; KAKUMA, R. Optimal duration of exclusive breastfeeding. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v. 8, p. , 2012.

LAMBERTI, L. M.; WALKER, C. L. F.; BLACK, R. E. Systematic review of diarrhea duration and severity in children and adults in low- and middle-income countries. **BMC Public Health**, v.12, n. 276, p. 1-11, 2012.

LIMA, A. A. M.; MOORE, S. R.; BARBOZA J. R.; SOARES, A. M.; SCHLEUPNER, M. A.; NEWMAN, R. D.; SEARS, C. L.; NATARO, J. P.; FEDORKO, D. P.; WUHIB, T.; SCHORLING, J. B.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 181, n. 5, p. 1643-1651, 2000.

LIMA, A. A.; SILVA, T. M.; GIFONI, A. M.; BARRRET, L. J.; MCAULIFFE, I. T.; BAO, Y.; FOX, J. W.; FEDORKO, D. P.; GUERRANT, R. L. Mucosal injury and disruption of intestinal barrier function in HIV- infected individuals with and without diarrhea and

cryptosporidiosis in northeast Brazil. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 92, n. 10, p. 1861-1866, 1997.

LIU, J.; GRATZ, J.; MARO, A.; KUMBURU, H.; KIBIKI, G.; TANIUCHI, M.; HOWLADER, A. M.; SOBUZ, S. U.; HAQUE, R.; TALUKDER, K. A.; QURESHI, S.; ZAIDI, A.; HAVERSTICK, D. M.; HOUP, E. R. Simultaneous detection of six diarrhea-causing bacterial pathogens with an in-house PCR-luminex assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50, p. 98–103, 2012.

LIU, J.; KIBIKI, G.; MARO, V.; MARO, A.; KUMBURU, H.; SWAI, N.; TANIUCHI, M.; GRATZ, J.; TONEY, D.; KANG, G.; HOUP, E. Multiplex reverse transcription PCR Luminex assay for detection and quantitation of viral agents of gastroenteritis. **J. Clin. Virol.**, v. 50, p. 308-313, 2011.

LIU, L.; JOHNSON, H. L.; COUSENS, S.; PERIN, J.; SCOTT, S.; LAWN, J. E. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. **Lancet.**, v. 379, p. 2151–2161, 2012.

LOZER, M. D.; SOUZA, B. T.; MONFARDINI, V. M.; VICENTINI, F.; KITAGAWA, S.; SCALETSKY, A. C. I.; SPANO, L. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 418, p. 1471-2334, 2013.

MA, C.; WICKHAM, M. E.; GUTTMAN, J. A.; DENG, W.; WALKER, J.; MADSEN, K. L. *Citrobacter rodentium* infection causes both mitochondrial dysfunction and intestinal epithelial barrier disruption in vivo: role of mitochondrial associated protein (Map). **Cell Microbiol.**, v. 8, p. 1669–1686, 2006.

MAGALHÃES, C. A.; ROSSATO, S. S.; BARBOSA, A. S.; SANTOS, T. O.; ELIAS, W. P.; SIRCILI, M. P.; PIAZZA, R. M. F. The ability of haemolysins expressed by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* to bind to extracellular matrix components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 2, p.146-152, 2011.

MANDEVILLE, K. L.; KRABSHUIS, J.; LADEP, N. G.; MULDER, C. J. J.; QUIGLEY, E. M. M.; KHAN, S. A. Gastroenterology in developing countries: Issues and advances. **World J. Gastroenterol.** v. 15, n. 23, p. 2839-2854, 2009.

MARANHÃO, H. S.; MEDEIROS, M. C.; FAGUNDES-NETO, U.; The epidemiological and clinical characteristics and nutritional development of infants with acute diarrhoea, in North-eastern Brazil. **Annals of Tropical Medicine**, v. 102, n. 4, p-357-365, 2008.

MELO, M. C.; TADDEI, J. A.; DINIZ-SANTOS, D. R.; VIEIRA, C.; CARNEIRO, N. B.; MELO, R. F.; SILVA, L. R. Incidence of diarrhea in children living in urban slums in Salvador, Brazil. **Curr. Gastroenterol. Rep.**, v. 13, n. 5, p. 402-407, 2008.

MENDES, P. S. A.; RIBEIRO, H. C.; MENDES, C. M. C. Tendência temporal da mortalidade geral por doença diarreica em crianças brasileiras menores de cinco anos no período de 2000 a 2010. **J. Pediatr.**, v. 89, p. 315-325, 2013.

MOHAMMADZADEH, M.; OLOOMI, M.; BOUZARI, S. Genetic evaluation of Locus of enterocyte effacement pathogenicity island (LEE) in Enteropathogenic *Escherichia coli* isolates (EPEC). **Iran. J. Microbiol.**, v. 5, n. 4, p. 345-349, 2013.

MOORE, S. R.; LIMA, N. L.; SOARES, A. M.; ORIÁ, R. B.; PINKERTON, R. C.; BARRET, L. J. Prolonged episodes of acute diarrhea reduce growth and increase risk of persistent diarrhea in children. **Gastroenterol.**, v. 139, n. 4, p. 1156-1164, 2010.

MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. Enteropatia Ambiental. **Estudos Avançados**, v.17, n. 48, p. 137-149. 2003.

MORENO, A. C.; FILHO, A. F.; GOMES, T. A.; RAMOS, S. T.; MONTEMOR, L. P.; TAVARES, V. C.; FILHO, L. S. L.; IRINO, K.; MARTINEZ, M. B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v. 66, n. 1, p. 50-57, 2010.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology reviews**, v. 11, p. 142-201, 1998.

NATARO, J. P.; MAI, V.; JOHNSON, J.; BLACKWELDER, W. C.; HEIMER, R.; TIRRELL, S.; EDBERG, S. C.; BRADEN, C. R.; GLENN MORRIS J. R. J.; HIRSHON, J. M. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, n. 4, p. 402-407, 2006.

NETER, E.; WESTPHAL, O.; LUDERITZ, O.; GINO, R. M.; GORZYNSKI, E. A. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. **Pediatrics**, v. 16, p. 801–808, 1955.

NUNES, M. C. R. M.; MAGALHÃES, P. P.; MACÊDO, S. A.; FRANCO, T. R.; PENNA, J. F.; MENDES, N. E. Attaching and effacing *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* in children with acute diarrhea and controls in Teresina/PI, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, p. 43-47, 2012.

OCHOA, T. J.; BARLETTA, F.; CONTRERAS, C.; MERCADO, E. New insights into the epidemiology of Enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 102, p. 852-856, 2008.

OCHOA, T. J.; CONTRERAS, C. A. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 24, n. 5, p. 478-483, 2011.

OKEKE, I. N. Diarrheagenic *Escherichia coli* in sub-Saharan Africa: status, uncertainties and necessities. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 3, n. 11, p. 817-842, 2009.

OKOLO, S. N. Prevalence of diarrhea and risk factors in Jos University Teaching Hospital, Nigeria. **Ann. Afr. Med.** v. 11, n. 4, p. 217-221, 2012.

PETRI, J. R.; MILLER, M.; BINDER, H. J.; LEVINE, M. M.; DILLINGHAM, R.; GUERRANT, R. L. Enteric infectious, diarrhea, and their impact on function and development. **J. Clin. Invest.**, v. 118, n. 4, p. 1277-1290, 2008.

PIZARRO-CERDÁ, J.; COSSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. **Cell**, v. 124, p. 715-727, 2006.

RAJENDRAN, P.; AJJAMPUR, S. S.; CHIDAMBARAM, D.; CHANDRABOSE, G.; THANGARAJ, B.; SARKAR, R.; SAMUEL, P.; RAJAN, D. P.; KANG, G. Pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* in children attending a tertiary care hospital in South India. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 68, n. 2, p. 117-122, 2010.

ROBINS-BROWNE, R.; STIL, L. C. S.; MILIOTIS, M. D.; RICHARDSON, N. J.; KOORNHOF, H. J.; FREIMAN, I.; SCHOUB, B. D.; LECATSAS, G.; HARTMAN, E. Summer diarrhea in African infants and children. **Archives of Diseases of Childhood**, v. 55, p. 923–928, 1980.

RODRIGUEZ-ANGELEZ, G; Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. **Salud Pública de México**, v. 44, n. 5, p. 464-475, 2002.

SANTONA, S.; DIAZ, N.; FIORI, L. P.; FRANCISCO, M.; SIDAT, M.; CAPPUCCINELLI, P.; RAPPELLI, P. Genotypic and phenotypic features of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in industrialized and developing countries. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 7, n. 3, p. 214-219, 2013

SANTOS, D. N.; ASSIS, A. M. O.; BASTOS, A. C.; SANTOS, L. M.; SANTOS, C. A. S. T.; STRINA, A.; PRADO, M. S.; ALMEIDA-FILHO, N. M.; RODRIGUES, L. C.; BARRETO, M. L. Determinants of cognitive function in childhood: A cohort study in a middle income context. **BMC Public Health**, v. 8, p. 202-216, 2008.

SANTOS, A. S.; FINLAY, B. B. Bringing down the host: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* effector-mediated subversion of host innate immune pathways. **Cellular Microbiology.**, v. 17, n. 3, p. 318-332, 2015.

SCHORLING, J. B.; GUERRANT, R. L. Diarrhoea and catch-up growth. **Lancet**, v. 335, p. 599–600, 1990.

SOHEL, I.; PUENTE, J. L.; RAMER, S. W.; BIEBER, D.; WU, C. Y.; SCHOOLNIK, G. K. Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. **J. Bacteriology**, v. 178, p. 2613-2628, 1996.

SOLI, W. K.; MAURE, T.; KAS, P. M.; BANDE, G.; BEBES, S.; SIBA, M. P.; MORITA, A.; UMEZAKI, M.; HORWOOD, F. P. Detection of enteric viral and bacterial pathogens associated with paediatric diarrhea in Goroka, Papua New Guinea. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, p. 54-58, 2014.

STOGER, R. The thrifty epigenotype: an acquired and heritable predisposition for obesity and diabetes? **Bioessays**, v. 30, p. 156–166, 2008.

STONE, K. D.; ZHANG, H. Z.; CARLSON, L. K.; DONNENBERG, M. S. A cluster of fourteen genes from Enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. **Mol. Microbiol.**, v. 20, p. 325-337, 1996.

TANIUCHI, M.; WALTERS, C. C.; GRATZ, J.; MARO, A.; KUMBURU, H.; SHETABUTR, O.; BODHIDATTA, L.; KIBIKI, G.; TONEY, M. D.; BERKELEY, L.; NATARO, P. J.; HOUPPT, R. E. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigellas* pp. and its evaluation on colonies, culture broths, and stool. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, p. 121-128, 2012.

TORRES, A. G.; Pathogenic *Escherichia coli* in Latin American; **Bentham e-books**, v. 5, n. 54, 2010.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*; **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 508-513, 2002.

UNICEF, Improving Child Nutrition: The Achievable Imperatives for Global Progress. New York: **United Nations Children's Fund**; 2009.

VALLANCE, B. A.; FINLAY, B. B. Exploitation of host cells by Enteropathogenic *Escherichia coli*. **PNAS**, v. 97, n. 96, p. 8799-8806, 2001.

VASCONCELOS, M. J. O.; BATISTA, M. Doenças diarreicas em menores de cinco anos no Estado de Pernambuco: prevalência e utilização de serviços de saúde. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 11, n. 1, p. 128-138, 2008.

VIDAL, J. E.; CANIZÁLEZ-ROMÁN, A.; GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ, J.; NAVARRO-GARCÍA, F. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. **Salud Pública de México**, v. 49, n.5, p. 376-386, 2007.

WAGNER, S.; KONIGSMAIER, L.; LARA-TEJERO, M.; LEFEBRE, M.; MARLOVITS, T. C.; GALAN, J. E. Organization and coordinated assembly of the type III secretion export apparatus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 107, p. 17745–17750, 2010.

WALKER, S. P.; WACHS, T. D.; GARDNER, J. M.; LOZOFF, B.; WASSERMAN, G. A.; POLLIT, E.; CARTER, J. A.; INTERNATIONAL CHILD DEVELOPMENT STEERING GROUP. Child development: risk factors for adverse outcomes in developing countries. **Lancet**, v. 369, p. 145-157, 2007.

WEISSTAUB, G.; ARAYA, M. Acute malnutrition in Latin America: the challenge of ending avoidable deaths. **J. Pediatr. Gastroenterol.Nutr.**, v. 47, n. 1, p. 10-14, 2008.

WONG, A. R.; PEARSON, J. S.; BRIGHT, M. D.; MUNERA, D.; ROBINSON, K. S.; LEE, S. F.; FRANKEL, G.; HARTLAND, E. L. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. **Molecular Microbiology**, v. 80, p. 1420-1438, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report: make every mother and child count.** Geneva : p. 243, WHO. 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/THE UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done. Geneva, New York: p. 68, WHO. 2013.

ANEXOS

ANEXO A



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N° 338/09 Fortaleza, 20 de novembro de 2009
Protocolo COMEPE n° 238/05
Pesquisador responsável: Aldo Ângelo Moreira Lima
Dept°./Serviço: Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFC
Título do Projeto: "Intervenção com micronutrientes e impacto a longo prazo no Brasil - Subprojeto 2A"

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 nº196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou a realização do subprojeto 2A na reunião do dia 19 de novembro de 2009 nas cidades de Crato, Picos, Cajazeiras, Sousa, Limoeiro e Pacajus cujas declarações de anuência foram apresentadas.

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

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink that reads 'Mirian Parente Monteiro'.

Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

ANEXO B

*Intervenção com Micronutrientes e Impacto a Longo Prazo no Brasil
(Semi-Árido Brasileiro: Objetivos 2a e 2c)*

Nome do Participante _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos convidando sua criança para participar de uma pesquisa de genética para infecções gastrointestinais e impedimento de crescimento e desenvolvimento. Este estudo é uma parceria entre a Universidade Federal do Ceará e a Universidade da Virgínia, nos Estados Unidos. Amostras de fezes, dados antropométricos e dados sócio-culturais serão coletados e examinados. Faremos testes de DNA nas amostras coletadas para ver as características hereditárias que podem previamente produzir infecções gastrointestinais ou impedimento do crescimento e desenvolvimento.

O objetivo deste estudo é aprender sobre a tendência para infecções gastrointestinais e seus efeitos no desenvolvimento. O objetivo do teste genético é identificar os fatores que contribuem para o desenvolvimento de certas doenças.

Para participar deste estudo você deve concordar com os termos aqui expostos.

O que estamos tentando descobrir:

Sua criança foi selecionada porque mora numa cidade situada na região do semi-árido brasileiro e está na faixa etária entre 2 e 36 meses, além de não apresentar sintoma diarréico nos últimos 15 dias antes da coleta das amostras

Nosso grupo de pesquisa tem estudado o impacto das doenças diarréicas em crianças de comunidades carentes de Fortaleza. Os estudos realizados permitiram a associação entre as diarréias persistentes e algumas infecções entéricas específicas com a ruptura da barreira intestinal, provocando alterações na sua função absorptiva e predispondo crianças a uma maior carga diarréica. Observamos que a ocorrência de doenças diarréicas nos dois primeiros anos de vida e a presença de determinados patógenos entéricos, podem influenciar no crescimento linear da criança. Episódios de diarréia persistente nos dois primeiros anos de vida mostraram ter associação com um déficit de crescimento de 1,5 a 4cm aos 4 a 6 anos de idade nessas crianças. Além disso, a idade de início da criança na escola e a idade por ano escolar são significativamente atrasadas pelas doenças diarréicas ocorridas no início da infância.

Na busca por alternativas para a diminuição do impacto causado pelas doenças diarréicas causadas por vírus, bactérias ou parasitas, observamos a grande eficiência da solução de re-hidratação oral baseada em glutamina quando comparada à tradicional solução à base de glicose. Além disso, temos testado a influência da suplementação de micronutrientes, como zinco, vitamina A e arginina, na dieta de crianças susceptíveis às doenças diarréicas, observando a redução no número de crianças doentes.

Estes estudos têm sido realizados em duas comunidades carentes de Fortaleza: Parque Universitário e Gonçalves Dias, ambas situadas em Fortaleza e próximas à Faculdade de Medicina. Acompanhando os quadros diarréicos dessas duas comunidades ao longo dos últimos 20 anos, observamos que mesmo nas crianças que não apresentam diarréia como sintoma, ainda existe uma alta prevalência de inflamação intestinal e de enteropatógenos que podem oportunamente causar as doenças diarréicas quando as defesas imunológicas são reduzidas. Isso vem acontecendo principalmente em virtude de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias e da carência de uma dieta nutricional balanceada.

Para que possamos realmente avaliar o impacto lesivo da presença destes agentes infecciosos, principalmente quando não há diarréia, se faz necessária a avaliação destes agentes em crianças que não residem nessas comunidades. Os resultados deste estudo para os participantes serão mensurados em termos de conhecimento do risco para as doenças diarréicas. A sociedade em geral se beneficia de qualquer redução nestas doenças da pobreza.

O que acontecerá:

Existem duas partes para este estudo:

1. Um profissional de saúde (enfermeira e/ou agente de saúde) coletará uma amostra de fezes e um pouco de saliva, através de um bochecho, de sua criança;
2. Um questionário será aplicado para coletar informações sócio-ambientais;
3. Medidas antropométricas serão também verificadas e registradas em um formulário;
4. As amostras serão enviadas para o Laboratório de Doenças Infecciosas para realizar testes específicos para este estudo. As amostras de fezes serão avaliadas através de métodos e técnicas de biologia molecular para a detecção de bactérias que prejudicam o intestino;
5. Suas amostras ficarão armazenadas por 5 anos após o final do estudo para futuras validações dos testes.

Benefícios:

A detecção de helmintos e protozoários, através do exame parasitológico de fezes, ou de crescimento de bactéria reconhecidamente prejudicial ao intestino será informada aos responsáveis e uma indicação de tratamento será indicada pelo médico pediatra responsável pelo estudo.

Versão: 06.04.2009

(Versão: 001)


Dra. Mirran Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

Página 1 de 2

Riscos:

Não existem riscos físicos, sociais ou psicológicos neste estudo.

Confidencialidade:

A confidencialidade e a privacidade dos dados de sua criança serão resguardadas, segundo normas éticas brasileiras.

Responsabilidade em Caso de Danos:

Se seu filho apresentar qualquer dano como resultado direto do estudo, você deverá entrar em contato com o Dr. Aldo Lima no fone: 3366 8437 para receber a terapia necessária. Qualquer dano resultante de sua participação será avaliado e tratado de acordo com os benefícios e assistência integral que você passa a ter direito ao assinar este formulário de consentimento e entrar na pesquisa, pois todo dano mediante o estudo é de inteira responsabilidade do pesquisador.

Para quem ligar:

Se você tem: (1) alguma questão sobre o estudo, por favor ligue para Dr Aldo A.M. Lima, Unidade de Pesquisa Clínica, UFC (Tel.: 3366 8445); (2) alguma questão sobre seus direitos como participante de um estudo, por favor ligue para Comitê de Ética em Pesquisa da UFC (COMEPE), Tel.: 3366.8346, ou peça a alguém do estudo para ajudar você a contatar com as pessoas citadas acima.

Direito de desistir:

A participação de sua criança neste estudo é completamente voluntária. Você é livre para retirá-la do estudo a qualquer momento sem prejuízos. Apenas avise a um dos membros da equipe.

Nome do Sujeito
(Se < 18 anos)

Pai ou Guardião Legal
(NOME LETRA FORMA)

Pai ou Guardião Legal
(ASSINATURA)

_____/_____/_____
dd/ mm/ ano

Assinatura da Testemunha

_____/_____/_____
dd/ mm/ ano

Assinatura do Membro da Pesquisa

_____/_____/_____
dd/ mm/ ano


Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

ANEXO C