



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

MARA DE MOURA GONDIM PRATA

**INFECÇÃO ENTÉRICA POR *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA EM CRIANÇAS
NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO: CARACTERIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO, PERFIL
DOS GENES DE VIRULÊNCIA E COINFECÇÃO**

**Fortaleza
2018**

MARA DE MOURA GONDIM PRATA

**INFECÇÃO ENTÉRICA POR *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA EM CRIANÇAS
NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO: CARACTERIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO, PERFIL
DOS GENES DE VIRULÊNCIA E COINFECÇÃO**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

FORTALEZA
2018

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)

D32i de Moura Gondim Prata, Mara.
INFECÇÃO ENTÉRICA POR *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA EM CRIANÇAS NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO: CARACTERIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO, PERFIL DOS GENES DE VIRULÊNCIA E COINFEÇÃO / Mara de Moura Gondim Prata. – 2018.
137 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

1. *Escherichia coli* enteroagregativa. 2. Diarreia infantil. 3. Assintomáticos. 4. Virulência. 5. Coinfecções. I. Título.

CDD 615.1

MARA DE MOURA GONDIM PRATA

**INFECÇÃO ENTÉRICA POR *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA EM CRIANÇAS
NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO: CARACTERIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO, PERFIL
DOS GENES DE VIRULÊNCIA E COINFEÇÃO**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina e Fisioterapia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para à obtenção do Título de Doutor em Farmacologia.
Área de concentração: Farmacologia.

Aprovado em: 30/07/2018

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Anastácio de Queiroz Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Luís Carlos Rey
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa
Fundação Oswaldo Cruz do Piauí (FIOCRUZ)

Prof. Dr. Isaac Neto Goes da Silva
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

“A Deus. Obrigada por tudo!”

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, **Mirna de Moura Gondim**, e à minha irmã, **Aglais Cristina Gondim T. Freire**, que sempre me apoiaram com força e incentivo, pois sem elas esse trabalho não seria possível.

Quero também agradecer à minha família que me ajudou, de forma especial, sempre me encorajando para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

Ao meu namorado **Sávio Pinho Nunes**, por estar ao meu lado sempre que eu precisei, com muito amor e compreensão.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, o **Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima**, pela orientação, paciência e disposição na transmissão do seu conhecimento, durante todo o processo, permitindo o meu crescimento acadêmico.

Aos meus companheiros de laboratório, **Pedro Henrique Medeiros, Ana Karolina Santos, Herlice Veras, Marília Amaral, Samilly Ribeiro, Francisco Adelvane Rodrigues, Marina Bona, Rafaela Pankov, Rafaella Della Guardia, Júlio Siqueira, Lyvia Carneiro e Paloma Cavalcante**, obrigada por todo conhecimento, apoio, amizade, paciência, bem como por todo suporte experimental e não experimental, além da companhia nos momentos de cafezinho.

Ao **José Amadeus**, por sempre dar o “seu jeitinho”, para consertar os equipamentos que se quebram no laboratório e realizar serviços gerais, permitindo, assim, que todos os trabalhos sejam concretizados, além da companhia nos momentos de cafezinho.

À toda a equipe do RECODISA composta pelo **Dr. Domingos Barreto, Dra. Josiane Quetz, Dra. Ila Lima, Dr. Alexandre Havt, Dra. Marjorie Guedes, Dra. Noélia Lima, Dr. Richard Guerrant, Lúcia Alves, Maria Luzia, Rosânia, Cláudia, Rosa, Maria do Carmo, Verônica, Fabiana Nascimento, Ana Barreto, Charles Melo e Kátia Lima** que realizou o trabalho fora do laboratório, seja na coleta de amostras ou na aplicação de questionários e o gerenciamento administrativo do projeto.

Às técnicas **Terezinha França, Luciana França, Charliene Melo e Conceição Nogueira**, por todo auxílio na organização do laboratório.

Obrigado ao pessoal do Sistema de Gerenciamento de Dados (SGD), **Francisco Junior, José Q. S. Filho e prof. Dr. Alberto Soares**, por toda a ajuda.

Às crianças e famílias participantes do projeto RECODISA, que contribuíram com as amostras e dados do trabalho.

Logo, agradeço a todos os meus amigos e ao pessoal do UPC-IBIMED, que contribuíram de forma direta e indireta, para que este trabalho fosse realizado. Enfim, sem vocês, nada disso seria possível.

Agradeço ao **Marcos Antonio Frota Ribeiro Filho** pela confecção da belíssima arte gráfica de compilação dos principais resultados do presente trabalho.

As secretárias, **Célia Araújo de Carvalho** e **Laura Alves de Souza**, do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFC que sempre me ajudaram a resolver todos os problemas.

Por fim, às fontes financiadoras: **CNPq** e ao **Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC)**.

Obrigada!

"Where shall I begin, please your Majesty?" asked the White Rabbit, "Begin at the beginning, ... and go on till you come to the end: then stop". Said the King of Hearts.

Lewis Carol. Alice in Wonderland: Alice's evidence.

RESUMO

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é um dos mais prevalentes agentes etiológicos associados à infecções em crianças menores de cinco anos de idade principalmente em países em desenvolvimento. No presente trabalho, investigou-se os determinantes sócioeconômicos vinculados ao desenvolvimento da diarreia ou infecção assintomática na população infantil colonizada pela EAEC, bem como a influência do perfil de genes relacionados à virulência (GRVs) e coinfeções durante as manifestações clínicas. Estas análises podem contribuir para o entendimento da versatilidade dessa infecção e identificar possíveis biomarcadores de fragmentos de DNA que podem ser utilizados para avaliar a evolução da gravidade da doença ou como medida de intervenção da infecção. O estudo transversal de etiologia de diarreia infantil foi realizado em crianças de 2-36 meses de idade residentes no Semiárido brasileiro. Questionário sobre as condições socioeconômicas das famílias foi aplicado no momento da coleta das amostras fecais. O DNA e RNA extraídos foram utilizados para os diagnósticos dos painéis de enteropatógenos (bactérias, vírus e protozoários) pela plataforma *Luminex*. Detectou-se EAEC em 54,6% (650/1191) das crianças. A heterogeneidade da infecção causada pela EAEC foi avaliada pela pesquisa de 27 GRVs investigados por reações de polimerase em cadeia. Para essas análises foram selecionadas 232 crianças identificadas com os dois alvos genéticos de diagnósticos da EAEC. Observam-se que as crianças na primeira infância, mães com idade entre 14 a 25 anos e amamentação não exclusiva foram associados ao desenvolvimento da diarreia; enquanto a infecção assintomática foi correlacionada ao terceiro ano de vida infantil, à amamentação não-exclusiva, à fontes de água não tratadas e à redução dos índices de z-escores de peso-por-altura quando comparados ao grupo diarreico. Na avaliação de GRVs, o gene transmitido pelo plasmídeo que codifica um homólogo de hexosiltransferase (*capU*) foi o mais frequentemente detectado (89,7%). O gene que codifica a enterotoxina EspC (*espC*) foi correlacionado com a diarreia infantil e sua condição grave. Enquanto a presença do gene da hemolisina hipotética codificada pelo plasmídeo (*aar*) foi associado a redução do número de dias e episódios de diarreia por dia. Contudo, apenas a subunidade fimbrial AAF/IV (agg4A) foi correlacionada significativamente ao grupo controle. Quanto à análise das coinfeções, o copatógeno mais detectado foi *Escherichia coli* enteropatogênica atípica (aEPEC) (63,1%), seguido de *Giardia lamblia* (23,5%), *Escherichia coli* enterotoxigênica (20,7%). A combinação de EAEC e *Giardia lamblia* na ausência de aEPEC foi associada especificamente ao grupo controle. Nossos dados indicam que específicos GRVs e coinfeções podem influenciar na indução diarreia. O gene *espC* é proposto como um indicador do aumento da gravidade da doença, enquanto o *aar* indicaria o efeito oposto

Palavras-chaves: EAEC. Diarreia infantil. Assintomáticos. Virulência. Coinfeções.

ABSTRACT

Enteric infection caused by enteroaggregative *Escherichia coli* in children from Brazilian semiarid: characterization of diagnosis, virulence-related genes profile and coinfection

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is one of the most prevalent enteric *E. coli* pathotype associated with diarrhea and asymptomatic infections in children less than five years of age living in developing countries. In the present study, we investigated the socioeconomic determinants related to the development of diarrhea or asymptomatic infection in the childhood population colonized by the EAEC, as well as the influence of virulence-related genes (GRVs) and coinfections during clinical manifestations. In order to better understand the versatility of this infection and to identify DNA markers for potential intervention or used to measure the infection severity. A cross-section study of diarrhea etiology in children aging 2-36 months old from Brazilian semiarid was conducted during 2009 to 2011. Data on health and socio-economic status and health-related behaviors and habits, collected via questionnaires, anthropometric measurements and stool sample have collected from all participants. The extracted DNA and RNA were used for the diagnosis of the enteropathogenic panels (bacteria, viruses and protozoa) by the Luminex platform. EAEC was detected in 54.6% (650/1191) of the children. Only 232 samples identified with the two genetic targets of EAEC diagnoses were selected to the evaluation of 27 GRVs investigated by polymerase chain reactions. Our results showed that children aged 0-6 months, mothers aged 14-25 years and non-exclusive breastfeeding were associated with the development of diarrhea; while the asymptomatic infection was correlated with the third year of infant life, non-exclusive breastfeeding, untreated water sources, and reduction of weight-for-height z scores when compared to the diarrheic group. In the evaluation of GRVs, the plasmid-borne gene encoding a hexosyltransferase homolog (*capU*) was the most frequently detected (89.7%). The gene encoding enterotoxin EspC (*espC*) was correlated with diarrhea infantile and its severe condition. While the presence of the hypothetical plasmid-encoded hemolysin (*aar*) was associated with a reduction of the number of diarrhea days and episodes by day. In addition, only AAF/IV fimbrial subunit (*agg4A*) was associated significantly with the control group. Regarding coinfections analysis, the most detected co-pathogen was atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) (43,5%), followed by *Giardia lamblia* (23.5%), enterotoxigenic *Escherichia coli* (20.7%). The combination of EAEC and *Giardia lamblia* in the absence of aEPEC was associated specifically with the control group. Our data indicate that different VRGs and coinfection profile could influence diarrhea outcomes. The *espC* gene is proposed as an indicator of disease severity increase, whereas the *aar* would indicate the opposite effect

Keywords: Enteroaggregative *Escherichia coli*.. Diarrhea infantile. Asymptomatic. Virulence. Coinfection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fenótipos de aderência da <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa em células HeLa em cepas isoladas de pacientes com quadro clínico diarreico	28
Figura 2 – Estágios da progressão da patogênese da <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	31
Figura 3 – A árvore filogenética das duas classes de serina protease autotransportadora	35
Figura 4 – A delimitação da região do Semiárido brasileiro e as cidades envolvidas no estudo	45
Figura 5 – Modelo de diagnóstico na plataforma <i>Luminex</i> Bio-Plex® 200	47
Figura 6 – Fórmula do cálculo do escore-z para avaliar o estado nutricional da população infantil	53
Figura 7 – Fluxograma da população e das amostras utilizadas	58
Figura 8 – Avaliação do processo inflamatório por meio da quantificação mieloperoxidase fecal entre as crianças com a presença (casos) e a ausência (controles) de diarreia em infecção pela <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa na população infantil do Semiárido brasileiro, Nordeste	65
Figura 9 – Fotodocumentação de gel de agarose com os produtos de PCR representativa do teste de validação dos iniciadores com seus respectivos controles positivos	66
Figura 10 – Representação gráfica usando o método de classificação de árvore de decisão (<i>CART analysis</i>) que mostra a combinação da presença ou ausência dos genes de virulência da <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa entre crianças com a presença (casos) e ausência (controles) da diarreia	68
Figura 11 – Representação gráfica usando o método de classificação de árvore de decisão (<i>CART analysis</i>) que mostra a relação dos casos de desidratação com a presença ou ausência de genes de virulência da <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	75
Figura 12 – Representação gráfica usando o método de classificação de árvore de decisão (<i>CART analysis</i>) que mostra a relação dos casos de febre com a presença ou ausência de genes de virulência da <i>Escherichia coli</i>	

enteroagregativa	76
Figura 13 – Representação gráfica usando o método de classificação de árvore de decisão (<i>CART analysis</i>) que mostra a relação dos casos de vômito com a presença ou ausência de genes de virulência da <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	77
Figura 14 – Representação gráfica usando o método de classificação de árvore de decisão (<i>CART analysis</i>) que mostra a relação dos casos de dor abdominal com a presença ou ausência de genes de virulência da <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	78
Figura 15 – Representação gráfica usando o método de classificação de árvore de decisão (<i>CART analysis</i>) que mostra a relação à gravidade da doença nos casos com a presença ou ausência de genes de virulência da <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	79
Figura 16 – Frequência de cada enteropatógeno em crianças diagnosticadas com <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	81
Figura 17 – Representação gráfica usando o método de classificação de árvore de decisão (<i>CART analysis</i>) que mostra a relação entre crianças com a presença (casos) e a ausência (controles) de diarreia na copatogênese da <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	82
Figura 18 – Modelo de patobiologia da infecção pela <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa destacando os fatores associados a desfecho clínico observado no presente estudo	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Caracterização das principais serina proteases autotransportadoras (SPATEs) da Classe I	36
Tabela 2	– Caracterização das principais serina proteases autotransportadoras (SPATEs) da Classe II	37
Tabela 3	– Patógenos, genes alvos, iniciadores, sondas e condições de PCR para identificação das <i>Escherichia coli</i> diarreioagênicas	48
Tabela 4	– Patógenos, genes alvos, iniciadores, sondas e condições de PCR para identificação de outras bactérias	49
Tabela 5	– Patógenos, genes alvos, iniciadores, sondas e condições de PCR para identificação de vírus	50
Tabela 6	– Sistema de escores para avaliação da gravidade da doença	51
Tabela 7	– Classificação do estado nutricional de crianças menores de cinco anos de idade para os determinados índices antropométricos	52
Tabela 8	– Descrição dos iniciadores de genes de virulência utilizados nos protocolos de reações múltiplas de polimerase em cadeia 1 e 2, indicando a sequência, o número de acesso do GenBank e tamanho dos produtos obtidos	55
Tabela 9	– Descrição dos iniciadores de genes de virulência utilizados nos protocolos de reação de polimerase em cadeia múltipla 3 e 4, indicando a sequência, o número de acesso do GenBank e tamanho dos produtos obtidos	56
Tabela 10	– Descrição dos iniciadores de genes de virulência utilizados nos protocolos de reação de polimerase em cadeia múltipla 5 e 6, indicando a sequência, o número de acesso do GenBank e tamanho dos produtos obtidos	57
Tabela 11	– Frequência da <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa entre as crianças com a presença (casos) e a ausência (controles) de diarreia nas seis cidades do Semiárido brasileiro	60
Tabela 12	– Avaliação da combinação dos alvos genéticos de diagnóstico	

	molecular da <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa no impacto nos determinantes inflamatórios e na gravidade das doenças diarreicas	61
Tabela 13	– Características da população infantil estudada, incluindo sexo, idade, estado de amamentação e informações maternas relacionadas com a presença (casos) e a ausência (controles) de diarreia em infecção pela <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	62
Tabela 14	– Características das condições socioeconômicas e higiênico-sanitárias da população infantil estudada entre crianças com a presença (casos) e a ausência (controles) de diarreia diagnosticadas com a <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa do Semiárido brasileiro, Nordeste	63
Tabela 15	– Características dos dados antropométricos na população infantil estudada entre crianças com a presença (casos) e a ausência (controles) de diarreia na infecção pela <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa na população infantil do Semiárido brasileiro, Nordeste	64
Tabela 16	– Frequência dos parâmetros clínicos e aspectos comportamentais relatados da população de crianças com manifestação diarreica (casos) durante a infecção por <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa na região do Semiárido brasileiro, Nordeste, Brasil	65
Tabela 17	– Frequência dos genes de virulência da <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa entre crianças com a presença (casos) e ausência (controles) da diarreia da região do Semiárido Brasileiro	69
Tabela 18	– Análises bivariadas e multivariadas dos genes de virulência da <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa relacionados à presença ou ausência das manifestações clínicas em crianças com diarreia (casos) da região do Semiárido Brasileiro	73
Tabela 19	– Análise multivariada da presença ou ausência das manifestações clínicas da diarreia nas crianças na presença ou ausência das coinfeções específicas com a <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	83

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
g	Gramas
cm	Centímetros
g	Gramas
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
Kg	Quilogramas
cm	Centímetros
d	dias
m	meses
ng	Nanograma
mL	Mililitros
ng	Nanômetros
pb	Pares de base
%	Por cento

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Fenótipo aderente agregador
AAF	Fímbria de aderência agregativa (<i>aggregative adherence fimbriae</i>)
AAF/I	Fímbria de aderência agregativa I (<i>aggregative adherence fimbriae I</i>)
AAF/II	Fímbria de aderência agregativa II (<i>aggregative adherence fimbriae II</i>)
AAF/III	Fímbria de aderência agregativa III (<i>aggregative adherence fimbriae III</i>)
AAF/IV	Fímbria de aderência agregativa IV (<i>aggregative adherence fimbriae IV</i>)
AAF/V	Fímbria de aderência agregativa IV (<i>aggregative adherence fimbriae V</i>)
aafA	Gene da subunidade da fímbria AAF/I
aafC	Gene da região do <i>Usher</i> da unidade estrutural da AAF/II
aar	Gene do regulador negativo do regulador transcricional (<i>aggR</i>)
air	Gene da proteína repetida da imunoglobulina enteroagregativa
aggA	Gene da subunidade da fímbria AAF/I
agg3A	Gene da subunidade da fímbria AAF/III
agg3/4C	Gene da região do <i>Usher</i> da unidade estrutural da AAF/III-IV
agg4A	Gene da subunidade da fímbria AAF/IV
agg5A	Gene da subunidade da fímbria AAF/V
aggR	Gene do regulador transcricional
aap	Gene da proteína antiagregativa, Dispersina
astA	Gene da toxina termoestável A da EAEC, EAST1
BAZ	Escores- z de IMC-por-idade
capU	Gene da proteína homóloga à hexosiltransferase
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAST-1	Enterotoxina termoestável 1 de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EA <i>heat-stable enterotoxin 1</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

<i>eilA</i>	Gene do homólogo <i>HilA</i> de Salmonella
<i>espC</i>	Gene codificador da enterotoxina EspC
<i>espL</i>	Gene do secretor de protease da <i>Escherichia coli</i>
<i>espP</i>	Gene da serina protease extracelular
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
GEMS	Multicêntrico Entérico Global (<i>The Global Enterics MultiCenter Study</i>)
GRV	Genes relacionados à codificação de virulência
HAZ	Escore- z de altura-por-idade
HCZ	Escore- z de circunferência da cabeça
IMC	Índice de massa corporal
MAL-ED	Interações de Desnutrição e Infecções Entéricas: Consequências para a Saúde Infantil e Desenvolvimento (<i>The Interactions of Malnutrition & Enteric Infections: Consequences for Child Health and Development</i>)
MPO	Mieloperoxidase
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>orf3</i>	Gene da proteína críptica
<i>pet</i>	Gene da toxina codificada por plasmídeo
<i>pic</i>	Gene da proteína envolvida em colonização
<i>sat</i>	Gene da toxina autotransportadora secretada
<i>sepA</i>	Gene da protease extracelular da <i>Shigella</i>
<i>shiA</i>	Gene do supressor inflamatório <i>shiA-like</i>
<i>sigA</i>	Gene da protease homóloga da <i>Shigella IgA-like</i>
SPATE	Serino-proteases auto-transportadoras secretadas por espécies da família das <i>Enterobacteriaceae</i>
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de shiga-toxina
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TLR5	Receptor <i>Toll-like 5</i> (<i>Toll-like receptor 5</i>)

TNF	Fator de necrose tumoral
<i>tsh</i>	Gene da hemaglutinina sensível à temperatura
UFC	Universidade Federal do Ceará
UPC/IBIMED	Unidade de Pesquisas Clínicas/Instituto de Biomedicina
<i>vat</i>	Gene da toxina autotransportadora de vacuolizante
WAZ	Escore- z de peso-por-idade
WHZ	Escore- z de peso-por-altura

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	<i>Escherichia coli</i>	21
1.2	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	23
1.2.1	<i>Epidemiologia</i>	23
1.2.2	<i>Classificação e Diagnóstico</i>	27
1.2.3	<i>Patobiologia</i>	30
1.2.3.3	<i>Adesão celular bacteriana</i>	33
1.2.3.4	<i>Formação de biofilme</i>	33
1.2.3.5	<i>Elaboração e liberação de toxinas</i>	34
1.2.3.5	<i>Outros fatores de virulência</i>	38
1.2.4	<i>Inflamação</i>	39
2	JUSTIFICATIVA	41
3	OBJETIVOS	42
3.1	Objetivo geral	42
3.2	Objetivos específicos	42
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	Considerações éticas	43
4.2	Delineamento do estudo	43
4.3	Local do estudo e população do Semiárido brasileiro	44
4.4	Coleta de amostras e processamento das amostras fecais	45
4.5	Diagnóstico molecular pela tecnologia Luminex XMAP	46
4.5.1	<i>Diagnóstico molecular da Escherichia coli enteroagregativa e de outros enteropatógenos</i>	47
4.5.2	<i>Análise dos resultados para o diagnóstico da Escherichia coli enteroagregativa e de outros enteropatógenos pela plataforma Luminex</i>	50
4.6	Avaliação dos dados clínicos da população infantil	51
4.7	Avaliação do estado nutricional infantil	51
4.8	Dosagem de mieloperoxidase fecal	53

4.9	Pesquisa de genes codificadores de fatores de virulência	53
4.10	Fluxograma da população e amostras utilizadas no estudo	58
4.11	Análise estatística dos dados	59
5	RESULTADOS	60
5.1	Avaliação da frequência da <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa em crianças com e sem diarreia residentes no Semiárido brasileiro	60
5.2	Detalhamento da população infantil, com foco nas crianças diagnosticadas <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa, quanto aos dados: demográficos, socioeconômicos, ambientais, clínicos e nutricionais	61
5.3	Desenvolvimento de iniciadores para a identificação de genes relacionados à virulência da <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa, mediante reações múltiplas em cadeia da polimerase	66
5.4	Análise da distribuição dos genes relacionados à codificação de fatores de virulência (GRVs) relacionados à gravidade da infecção pela <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa diagnosticada em amostras fecais de crianças com e sem diarreia no Semiárido brasileiro	67
5.4.1	<i>Frequência dos GRVs e suas combinações em relação as crianças com a presença e ausência de diarreia</i>	67
5.4.2	<i>Análise dos GRVs em relação aos dados das manifestações clínicas da diarreia das crianças do Semiárido brasileiro</i>	71
5.5	Avaliação da distribuição das coinfeções relacionados à infecção pela <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa diagnosticada em amostras fecais de crianças com e sem diarreia no Semiárido brasileiro	80
6	DISCUSSÃO	84
7	CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS	100
	ANEXO A - Comitê Nacional de Ética em Pesquisa	117
	ANEXO B - Comitê de Ética em Pesquisa da UFC	119
	ANEXO C - Termo de consentimento livre e esclarecido	120

ANEXO D - Ficha epidemiológica	122
ANEXO E - Publicação de artigos e resumos em congresso	128
ANEXO F - Artigos científicos em preparação	137

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli*

Em 1886, Theodor Escherich, médico pediatra austríaco, descreveu pela primeira vez, em detalhes, a *Bacterium coli commune*, conhecida atualmente como *Escherichia coli* (*E.coli*), isolada a partir de amostras fecais infantis, por meio das quais se verificou que o mecônio era estéril e que a colonização microbiana era atribuível ao ambiente da criança (incluindo a introdução do leite materno), durante o período de 2-24 horas após o nascimento (SHULMAN, FRIEDMANN, SIMS, 2007).

A *E. coli* é uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*, do gênero *Escherichia*, que apresenta características: bacilo gram-negativo, móvel e anaeróbio facultativo, sendo a bactéria mais abundante da microbiota intestinal. Normalmente, esse microrganismo é encontrado em fezes, em uma carga bacteriana aproximada de 10^{7-8} unidades formadoras de colônias por grama de fezes (BLOUNT, 2015; KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004; GUERRANT et al., 2001).

Em geral, ainda é um paradigma o modo como a *E. coli* se adaptou à microbiota humana, como um microorganismo “inofensivo” em um modelo simbiótico. Pesquisas relatam a relação mutualística na qual o hospedeiro mamífero secreta imunoglobulina A, que parece facilitar a formação de biofilme na parede intestinal, e em contrapartida, a *E. coli* beneficiaria o hospedeiro de várias maneiras, por exemplo, pela produção de vitamina K e B12, necessárias ao desenvolvimento do sistema neurológico e ao crescimento infantil (BLOUNT, 2015, PINTO et al., 2011).

A *E. coli* pode também ser encontrada em diferentes nichos, em razão da sua expansão, pela necessidade de sobrevivência, como no microbioma de pássaros, répteis e peixes, bem como no solo, na água, nas plantas e nos alimentos. Ao longo dos anos, esse microorganismo foi se adaptando a pressões positivas e seletivas ambientais, o que, de forma atrelada à versatilidade de mecanismos de metabolização e de regulação, permite sua colonização até em períodos de não perpetuação de crescimento bacteriano (LEIMBACH, HACKER, DOBRINDT, 2013).

Os referidos fatores de plasticidade genética dessa bactéria, durante os eventos de replicação e de transferência horizontal, resultaram da aquisição ou da deleção de genes, assim como de seu rearranjo ou de mutações em pontos aleatórios, fato que contribuiu para variação do conteúdo e da estrutura do genoma, favorecendo o processo de colonização subclínica ou patogênese (DOBRINDT et al., 2010).

Vale ressaltar ainda que tanto as *E. coli* patogênicas como as não patogênicas transportam elementos genéticos móveis e acessórios, como plasmídeos ou *transposons*, bacteriófagos, ilhas genômicas, que codificam as funções necessárias a uma adequada adaptação e que podem ser facilmente transferidas a outras bactérias (DOBRINDT et al., 2010, HACKER; HENTSCHEL; DOBRINDT, 2003; JOHNSON; NOLAN, 2009).

Assim, as cepas comensais de *E. coli* raramente causam doenças; mas, quando é rompida a barreira intestinal, observa-se a colonização do hospedeiros em outras partes do corpo, que não sejam o intestino, podendo contribuir para infecções extraintestinais ou sistêmicas (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004).

No curso da dinâmica dos processos de alterações genômicas da *E. coli*, observa-se a introdução de fatores de virulência e de adaptação, que frequentemente estão associados a clones de *E. coli* patogênicas, os quais induzem a um amplo espectro de doenças, como colecistites, bacteremia e sepse, colangite, infecção do trato urinário (UTI), meningite neonatal, pneumonia e diarreia persistente (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004).

As *E. coli* diarreiogênicas (ECDs) apresentam-se como um dos principais agentes infecciosos nos casos de diarreia e desnutrição infantil. Atualmente as ECDs são classificadas em seis subtipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC); *E. coli* enterohemorrágica (EHEC); *E. coli* enteroagregativa (EAEC); *E. coli* enteroinvasiva (EIEC); *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO; KAPPER, 1998).

Clements et al. (2012) sugeriram uma expansão da classificação com a apresentação de outros dois patotipos: *E. coli* aderente e invasiva (AIEC) e *E. coli* agregativa produtora de shiga-toxina (STEC), em vez da denominação de EHEC. Em um surto de diarreia na Europa em 2011, causado por STEC, foi identificada uma EAEC produtora de *shiga* toxina, que causou a síndrome hemolítica urêmica afetando aproximadamente 4.000 pessoas (BIELASZEWSKA et al., 2011; FRANK et al., 2011; SCHEUTZ et al. 2011).

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

1.2 *Escherichia coli* enteroagregativa

Em 1987, Nataro e colaboradores realizaram um estudo com cepas de *E. coli* isoladas de fezes de crianças chilenas com quadro clínico de doença diarreica aguda, cepas em que se observaram distintos padrões de aderência em células de carcinoma cervical humano (HEp-2): localizado, difuso aderente e agregativo. As cepas com a habilidade de produzir o fenótipo aderência agregativa (AA) indicavam uma nova classe das ECDs, posteriormente denominada como EAEC (NATARO et al., 1987). Além disso, diferente das outras cepas padrão de *E. coli*, a cepa EAEC não apresenta a capacidade de secretar enterotoxinas termolábeis (LT) e termoestáveis (ST) (NATARO; STEINER; GUERRANT, 1998).

1.2.1 *Epidemiologia*

Após a descoberta da EAEC, foram isoladas duas cepas: JM221 e 042, a partir de pesquisas em adultos com quadro clínico de diarreia dos viajantes (DDV), no México (MATHEWSON et al., 1985) e em crianças com diarreia aguda, respectivamente (NATARO et al., 1987). Essas cepas foram testadas em voluntários, nos quais a cepa 042 induziu diarreia em sua maioria, enquanto a cepa JM221 não apresentou evidências da doença, revelando a heterogeneidade dessa bactéria (NATARO et al., 1995).

Ao longo dos anos, verificaram-se diversos surtos e estudos de prevalência da EAEC em países desenvolvidos. Em 1997, um surto massivo foi relatado no Japão, onde 2.697 crianças

apresentaram sintomas de diarreia aguda, após se alimentarem em várias escolas. Nesse surto, 40% das amostras testadas foram diagnosticadas como EAEC (ITOH et al., 1997).

A cidade de Akita, Japão, apresentou um surto no qual 42,8% dos casos eram positivos para EAEC, identificadas por dois sorotipos EAECO126:NM e O111:NM (YATSUYANAG et al., 2002). Outro surto foi relatado na cidade de Shizuoka, 77,7% recém admitidos pelo distrito policial adquiriram a bactéria após a ingestão de comida contaminada (HARADA et al., 2007). Na Coreia do Sul, um surto de gastroenterite em colégio da cidade de Incheon apresentou uma taxa de prevalência de 6,1% e 57,1%, respectivamente, em crianças e manipuladores de alimentos com infecção assintomática (SHIN et al., 2015).

No Estados Unidos da América, a EAEC foi relatada como o segundo agente infeccioso (67%) mais detectado em crianças de um estudo caso-controle de diarreia infantil atendidas na emergência de um hospital pediátrico (FOSTER et al., 2015).

Na Europa, em um estudo prospectivo coorte, a EAEC foi identificada em dois surtos de infecção alimentar oriundos de queijos contaminados com EAEC, em três restaurantes na Itália, nos quais foram obtidas taxas de infecção de 43% e 58% (SCAVIA et al., 2008). Na Suíça, 46% de crianças hospitalizadas com quadro clínico diarreico apresentavam infecção por EAEC (TOBIAS et al., 2015). Cinco surtos de EAEC foram identificados na Inglaterra, durante o consumo de alimentos em restaurantes e conferências. As análises desses casos mostraram cepas oriundas de diferentes clones de EAEC e suas coinfeções (CHATTAWAY et al., 2013; DALLMAN et al., 2014; SMITH et al., 1997, WILSON et al., 2001). Na República da Sérvia, descreveu-se um surto de diarreia, em que 63,3% de crianças e neonatos internados foram diagnosticados com o referido microorganismo (COBELJIC et al, 1996).

O último grande surto ocorreu na Europa no ano de 2011, onde brotos de feijão contaminados pelo híbrido de EAEC e STEC induziram a síndrome hemolítico-urêmica, acarretando em 45 mortes e 3.500 internações, (FRANK et al., 2011). Logo, mostrou-se a importância da contínua vigilância, nos países em desenvolvimento, das infecções por EAEC.

Na investigação da doença diarreica dos viajantes (DDV), observa-se que a prevalência de EAEC varia entre 30 a 70% dos casos, dependendo do local de destino e da estação do ano. Ademais, 80 a 90% dos casos são de origem bacteriana (CONNOR, 2017). O primeiro estudo a identificar EAEC associada à DDV foi realizado por Mathewson et al. (1985), no qual

reconheceram a EAEC como enteropatógeno presente em 14,9% dos casos com diarreia e em 7,6% de portadores assintomáticos, pacientes que tinham viajado para o México.

Até recentemente, a ETEC era o principal agente infeccioso identificado em DDV na maioria das regiões. Contudo, em um recente estudo prospectivo desenvolvido por Lääveri et al. (2017), EAEC (42%) e EPEC (42%) foram detectadas como os patógenos mais prevalentes, seguidos por *Campylobacter jejuni/coli* (31,7%) e ETEC (19%). Os autores avaliaram 459 participantes, por meio da análise de amostras fecais, antes e depois de viagens a vários destinos. Adicionalmente, em estudo recente realizado na região do sudeste da Ásia, verificou-se a EAEC como o segundo agente mais frequente (27%) nos casos de DDV (AHN et al., 2011). Por conseguinte, considerando as informações descritas, revela-se a importância da infecção de EAEC durante a DDV.

Relatos descritos por Mayer e Wanke (1995), inicialmente, mostraram um paciente com diarreia persistente e infectado com o vírus da imunodeficiência (HIV), no qual, após a triagem de identificação de enteropatógenos, foi indicada a presença da EAEC, diagnosticada pelo método de padrão de aderência, mediante a utilização de células de adenocarcinoma cervical (HeLa). Na mesma pesquisa, posteriormente, a EAEC foi encontrada em mais sete pacientes portadores de HIV com baixa contagem de leucocitária T auxiliar, CD4⁺, e quadro clínico de diarreia crônica.

Em estudo prospectivo descrito em 140 crianças infectadas com HIV, conduzido em três hospitais no Peru, a EAEC foi identificada como o enteropatógeno de maior prevalência, entre as quais 6% apresentavam diarreia e 10% eram assintomáticas. Ressalta-se que crianças com HIV e diarreia apresentaram piora relativa da imunossupressão, com aumento da carga viral (MEDINA et al., 2010). Na investigação de Samie et al. (2007), participaram 322 dos pacientes portadores do HIV, dos quais 29,5% foram diagnosticados com a EAEC, associada à inflamação e à diarreia. Em outra pesquisa, a EAEC foi diagnosticada em 10,7% do total de 56 crianças com diarreia aguda portadoras de HIV, em dois hospitais do Quênia (PAVLINAC et al., 2014). Assim, nota-se que a EAEC continua uma bactéria oportunista, de relevância, em crianças e adultos que apresentam imunossupressão.

Ao longo dos anos, estudos do ciclo vicioso da diarreia e desnutrição infantil mostram que a desnutrição pode causar distúrbios na função imunológica e perda da integridade da barreira intestinal, o que favorece o aparecimento de infecções entéricas, perpetuado em

diarreia aguda ou crônica, principalmente, nos dois primeiros anos de vida, após a contínua exposição a EAEC e a outros enteroapatoxenos, como consequências das precárias condições socioeconômicas e higiênico – sanitárias (LIMA et al., 1992; LIMA, GUERRANT, 1992; 2000; STEINER et al., 1998).

Nesse sentido, o projeto caso-controle de etiologia de diarreia moderada a severa denominado Multicêntrico Entérico Global (GEMS), em crianças até cinco anos de idade, realizado em sete países da África e Ásia, mostrou que, em algumas das regiões, a detecção EAEC foi associada à diarreia, de acordo com a idade estratificada.

Como parte do projeto Interações de Desnutrição e Infecções Entéricas: Consequências para a Saúde Infantil e Desenvolvimento (MAL-ED) realizado em oito países da Ásia, África e América do Sul, descrito por Rogawski et al. (2017), determinou-se que a EAEC foi encontrada em 94,8%, pelo menos uma vez, nas amostras das crianças, sendo considerada frequente nos primeiros anos de vida do infante, contribuindo para a redução do crescimento linear infantil e inflamação crônica.

PLATTS-MILLS et al (2015), durante a pesquisa de etiologia de diarreia do coorte multicêntrico (MAL-ED), acompanharam 2.145 crianças do décimo terceiro dia de vida até os dois anos de idade, das quais 24.310 amostras fecais foram coletadas e testadas, identificando a EAEC como um dos enteropatóxenos mais prevalentes no primeiro e no segundo ano de vida.

Nos anos 90, iniciaram-se pesquisas no Brasil, indicando a EAEC como responsável pela diarreia persistente, interligada à redução do crescimento, à inflamação intestinal, ao déficit do desenvolvimento cognitivo e à morte em crianças residentes em comunidades carentes (WANKE et al., 1991; LIMA, GUERRANT, 1992; STEINER et al., 1998).

Em investigação realizada por Amaral et al. (*Manuscrito em submissão*), relata-se uma alta variabilidade da prevalência de EAEC, de 0,7% a 71%, na população infantil com quadro clínico diarreico, nas diversas regiões do Brasil. Contudo, ainda há poucas pesquisas relativas à prevalência de EAEC no Nordeste brasileiro.

Nesse contexto, os resultados dos estudos acerca da frequência de EAEC desenvolvidos no Nordeste brasileiro indicam o seguinte: o percentual de 41% do total de 325 crianças com idade de 2 e 36 meses, em estudo caso-controle de diarreia nas comunidades de Gonçalves Dias e do Parque Universitário, em Fortaleza/CE (LIMA et al., 2013); em estudo caso-controle de diarreia, 16,9% do percentual total de 580 crianças menores de 2 anos de idade

atendidas na emergência do Hospital Pediátrico Arlinda Marques em João Pessoa/PB (MORENO et al., 2010); prevalência total de 4,2% na diarreia infantil, após o monitoramento de 1.233 crianças do pré-escolar, em várias regiões de Salvador/BA (FRANZOLIN et al., 2005); 10,68% do total de 1, 207 crianças atendidas em ambulatórios de várias regiões de Salvador/BA (BUERIS et al., 2007).

Uma importante problemática é a influência das coinfeccções com EAEC, no estudo coorte de desnutrição infantil em Fortaleza/CE, indicando que crianças diagnosticadas com EAEC, com pelo menos uma coinfeccção, obtiveram a redução dos escores antropométricos (LIMA et al., 2018). Em pesquisa prospectiva desenvolvida em crianças com diarreia com idade abaixo de cinco anos, oriundas de 3 hospitais em Israel, mostrou-se a correlação sinérgica da EAEC e do rotavírus, quando do aumento do número de evacuações e da ocorrência de vômitos e febre, acima de 39°C (TOBIAS et al., 2015). Entretanto, as análises de coinfeccções ainda são um desafio, por existir poucos relatos acerca da influência na gravidade das doenças diarreicas e da desnutrição.

O fator de transmissão é a via fecal-oral o que facilita a disseminação da infecção causada pela EAEC por alimentos e água contaminados. O referido patógeno também foi detectado em amostras de mamadeiras e frascos utilizados na alimentação infantil, manipulados por mães com baixo nível socioeconômico (GOMES et al., 2016). Além disso, Zhang et al. (2016) analisou em geral 1.142 amostras de diferentes fontes de origem, com os seguintes percentuais de detecção de EAEC: 6% em pessoas saudáveis; 25% em animais (porcos e animais de estimação domésticos); em água 8,3%; 52,4% em pacientes com manifestações diarreicas, sendo essa a maior taxa de detecção.

1.2.2 Classificação e Diagnóstico

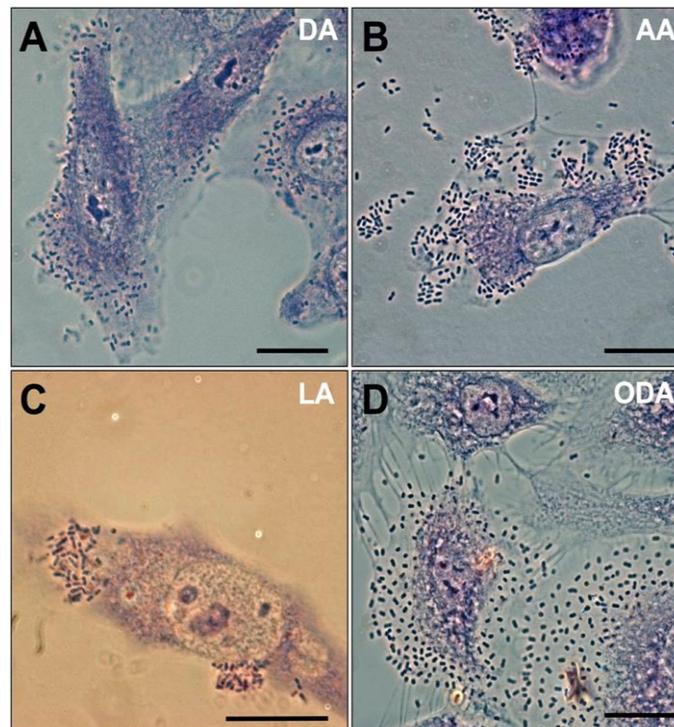
Estudos mostram que as cepas da EAEC indicam o método de padrão de aderência em células de adenocarcinoma cervical humano (HeLa), como padrão ouro de diagnóstico, o qual apresenta um padrão do fenótipo AA, semelhante a “tijolos empilhados” (NATARO; STEINER; GUERRANT, 1998).

Contudo, mudanças do fenótipo de aderência têm sido observadas em diferentes isolados de EAEC (LIEBCHEN et al., 2011; RAJAN et al., 2018). Pesquisa realizada em cepa

knockout da cepa EAEC 042 para o gene ativador transcricional (*aggR*) e cepas de EAEC isoladas de estudos clínicos identificadas por diagnóstico molecular mostraram um padrão difuso aderente em modelo *in vitro* de enteroides de jejuno oriundo de biópsias de endoscopia em adultos (RAJAN et al., 2018).

Ademais, Liebchen et al. (2011) caracterizaram em nível molecular 59 cepas isoladas de EAEC, oriundas de pacientes com diarreia, e observaram diferentes padrões de aderência indicando pelo o fenótipo difuso–aderente (DA) que estava presente em cerca de 48,4% das cepas, enquanto 9,4% exibiram o fenótipo de aderência-localizada (LAL), 9,4% foram caracterizadas com o padrão AA e 7,2% não aderiram, como visto na **Figura 1**.

Figura 1 – Fenótipos de aderência da *Escherichia coli* enteroagregativa em células HeLa em cepas isoladas de pacientes com quadro clínico diarreico



Fonte: Liebchen et al. (2011). Legenda: células de origem de câncer cervical humano – HeLa. Cepas apresentam fenótipo difuso–aderente – DA (A), fenótipo aderente agregador – AA (B), fenótipo como aderência-localizada – LAL (C) e fenótipo organizado em aderência difusa – ODA (D).

Nesse contexto, encontram-se dificuldades a fim de realizar o diagnóstico da EAEC por essa metodologia, uma vez que são requeridos laboratórios de referência para cultura celular,

material de alto custo, de tempo e de mão de obra treinada, além de apresentar alta variabilidade e não possibilitar a diferenciação de cepas patogênicas e não-patogênicas (JENSEN et al., 2014).

Em relação à sorotipagem, esse método não constitui uma ferramenta ideal para o diagnóstico de EAEC (cepas identificadas pelos antígenos de superfície O, somático, e H, flagelar); pois apresentam como limitações: demanda de material de alto custo, mão de obra e tempo de procedimento; presença de reatividade cruzada dos soros com diferentes sorogrupos; limitada disponibilidade de antissoros restritos a laboratórios especializados; variações entre lotes e existência de cepas não tipáveis. As cepas tipáveis de EAEC pertencem a uma vasta variedade de sorogrupos incluindo O3, O7, O15, O44, O55, O77, O86, O126 e O127 (FRATAMICO et al., 2016; VILLASECA et al., 2005).

Atualmente, as técnicas moleculares são utilizadas para o diagnóstico da EAEC, por serem rápidas e precisas na investigação epidemiológica em animal, humano e ambiental. (FRATAMICO et al., 2016). No entanto, ainda é necessário o desenvolvimento de alvos de referência para o diagnóstico da EAEC.

Inicialmente, como primeiro diagnóstico, foi utilizada a *probe* do gene transportador de proteína de anti-agregação (*aatA*), chamado anteriormente de sonda CVD432, localizada no plasmídeo (SCHMIDT et al., 1995; BAUDRY et al., 1990). Ao longo dos anos, novos alvos genéticos, como o gene codificador do regulador transcricional (*aggR*), transportador de proteína de anti-agregação (*aatA*) e o gene plasmidial codificador da dispersina (*aap*) (VIAL et al., 1988).

No estudo multicêntrico MAL-ED, a identificação da EAEC foi realizada por meio dos genes: codificador da ilha de ativação do regulador transcricional (*aaiC*) e transportador de proteína de anti-agregação (*aatA*) (HOUPY et al., 2014). O gene *aaiC* está localizado no cromossomo e codifica a “ilha” genômica, relacionando-se ao sistema de secreção IV (DUDLEY et al., 2006a).

Na pesquisa realizada por Andrade, Gomes e Elias (2014), 75 cepas de EAEC foram testadas previamente para a identificação dos genes *aatA* e *aggR*, em combinação com o teste de padrão de aderência. No mesmo estudo, as cepas foram reavaliadas por um novo multiplex, utilizando os seguintes genes: *aatA*, *aggR* e dois codificadores das proteínas do sistema de secreção IV (*aaiA* e *aaiG*) na detecção de EAEC típica e atípica. Os resultados desse novo multiplex mostraram uma sensibilidade de 94,8% e uma especificidade de 94,3%. No citado estudo, além dos genes já utilizados na identificação da EAEC (*aatA* e *aagR*), foi sugerida a

incorporação de mais dois genes alvos de diagnóstico: *aaiA* e *aaiG*, que são oriundos da “ilha” de patogenicidade *pheU*, identificada no protótipo da EAEC 042.

Em relação ao regulador transcricional (*aggR*), vários estudos vêm utilizando a diferenciação classificatória de EAEC típicas e atípicas (ANDRADE, GOMES, ELIAS, 2014; ANDRADE et al., 2017; MORIN et al., 2013). O gene *aggR* é um importante ativador transcricional, que modula em torno de 44 genes, incluindo a biogênese da fímbria II, a dispersina e o seu sistema secretório, codificador de proteína homóloga a *Shigella flexneri* (Shf), sistema de secreção tipo VI e o próprio *aggR* (ELIAS, NAVARRO-GARCIA, 2016)

Atualmente, de acordo com segmentos genômicos específicos, a EAEC pode também ser subdividida em seis grupos filogenéticos: A, B1, B2 e D, E, F (ANDRADE et al., 2017; CLERMONT et al., 2013; REGUA-MANGIA et al., 2009; FRANÇA et al., 2013). Observam-se fatores de risco específicos, como o uso de antibióticos, durante o processo diarreico, relacionados aos determinados grupos filogenéticos (REGUA-MANGIA et al., 2009).

A identificação da EAEC permanece um desafio; pois, apesar do uso do padrão de aderência em HEp-2, sorotipagem e biologia molecular, o diagnóstico desse microrganismo ainda não foi definido, em razão da alta heterogeneidade genética e fenotípica, relacionada aos seus diferentes “comportamentos” na interação com o hospedeiro nos estudos clínicos, *in vitro* e *in vivo*.

1.2.3 Patobiologia

A patogênese da infecção causada por EAEC é complexa e muito heterogênea, o que dificulta estabelecer os mecanismos pelos quais esse microrganismo causa a doença (ELIAS et al., 2002). Assim, diversos estudos mostram que tanto fatores do hospedeiro como da bactéria podem influenciar o desenvolvimento da EAEC. Determinantes relacionados ao hospedeiro, como imunossupressão, desnutrição infantil e polimorfismos, aumentam a susceptibilidade e a indução das doenças diarreicas causadas pelo patógeno.

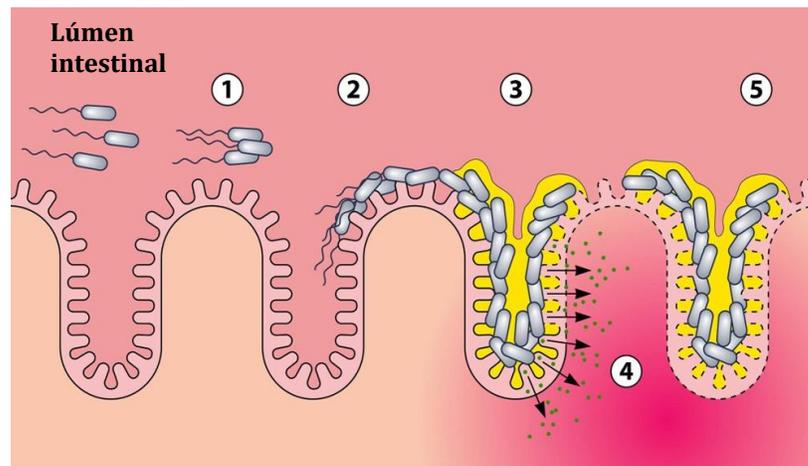
Essa bactéria leva normalmente a uma diarreia aquosa, com muco, podendo apresentar sangue nas fezes e possíveis manifestações clínicas, como dores abdominais, vômitos, náuseas e febre baixa (CROXEN et al., 2010). Portanto, a variabilidade de fatores como adesinas, toxinas e proteínas, associados à virulência parecem apresentar relação com a carga bacteriana, a

gravidade da doença e a distinção geográfica dos padrões de distribuição dessa bactéria (CROXEN et al., 2013).

Estudos sugerem que a progressão da patogênese de EAEC se inicia com a aglutinação plactônica da bactéria, o que acarreta a sua adesão ao epitélio, por meio de fímbrias de aderência agregativa (AAFs) e de outros fatores de adesão do microrganismo, seguida pela formação de biofilme, juntamente com a secreção e depósito de muco na superfície dos enterócitos, o que levaria, conseqüentemente, à colonização intestinal (JENSEN et al., 2014).

Logo, como último estágio, ocorre o estabelecimento da completude do biofilme adicional, com liberação de toxinas bacterianas, induzindo à suscitação da resposta inflamatória do hospedeiro, como reflexo ao dano causado no epitélio, o que inclui a destruição parcial ou total das vilosidades, a vacuolização do citoplasma basal dos enterócitos, o destacamento do epitélio e a desorganização da estrutura, com extrusão de células epiteliais, a secreção e a apoptose celular intestinal (JENSEN et al., 2014; ANDRADE, HAAPALAINEN, FAGUNDES-NETO, 2011; PRATA et al., 2018). Resumidamente, na **Figura 2**, é possível verificar as etapas da patogênese da infecção por EAEC no hospedeiro.

Figura 2 – Estágios da progressão da patogênese da *Escherichia coli* enteroagregativa



Fonte: Adaptado de Jensen et al. (2014). Legenda: Aglutinação em forma plactônica da bactéria (1); Aderência ao epitélio e colonização intestinal; (2) Formação de biofilme (3); Liberação de toxinas, indução de dano intestinal e aumento de secreção (4); Estabelecimento de biofilme adicional (5).

As alterações descritas, durante a infecção da EAEC, em interação com o epitélio do hospedeiro, poderiam explicar as anormalidades digestivo-absortivas, em resposta ao prolongamento da diarreia ou à colonização subclínica (ANDRADE, HAAPALAINEN,

FAGUNDES-NETO, 2011; ANDRADE, FREYMÜLLER, FAGUNDES-NETO, 2011). Nesse esteio, estudos demonstraram que a EAEC 042 adere à mucosa do jejuno, ao íleo e, mais fortemente, ao colón, em cultura de órgãos *in vitro* (NATARO et al. 1996).

Em fragmentos de biopsias infectados com a cepa protótipo EAEC 042, mudanças no colón, com o maior número de células caliciformes com área de lise e destruição celular nas regiões mais próximas das microvilosidades podem justificar a presença de muco e de sangue nas fezes (ANDRADE, HAAPALAINEN, FAGUNDES-NETO, 2011).

O mesmo estudo realizado com a cepa de EAEC 171-1 indicou a capacidade dessa bactéria de invadir o tecido, o qual se mostrou totalmente desagregado e destruído após 6 horas de incubação bacteriana; enquanto a cepa EAEC 042 causou alterações significativas no epitélio, porém, de forma menos intensa, quando analisadas por microscopia de luz.

A pesquisa de Vial et al. (1998) relatou que após a inoculação das cepas de EAEC (042 e 17-2) na região do íleo de coelhos, resultou no encurtamento das microvilosidades, hemorragia, necrose e infiltração por mononucleares na submucosa. Contudo, a análise por microscopia eletrônica não revelou invasão da bactéria na estrutura das microvilosidades.

Em outro estudo realizado por Prata et al. (2018), durante a incubação bacteriana da cepa protótipo 042 (isolada de caso de diarreia) e de uma cepa isolada de desnutrição infantil (LDI001), por 3 horas, em células intestinais, determinou-se que a cepa protótipo 042 causou um maior nível de necrose que o verificado na cepa LDI001, demonstrando comportamentos diferentes na indução do dano celular, os quais poderiam ser explicados pela heterogeneidade dos genes codificadores de virulência identificados.

Além disso, diferentes cepas de EAEC testadas em material de biopsias intestinais de crianças indicaram predileções de aderência pelas distintas regiões intestinais (jejuno, íleo e cólon), onde a cepa protótipo 042 aderiu em todas as áreas, enquanto que algumas das cepas testadas apresentaram diferentes padrões (HICKS, CANDY, PHILLIPS, 1996).

Com relação à diversidade de padrões de comportamento da EAEC, estudos mostram que esse microorganismo configura uma bactéria multifacetada, com alta diversidade de genes de virulência, o que pode estar associado à habilidade de virulência e de patogenicidade. No entanto, os genes bacterianos desse microorganismo podem estar hipoteticamente relacionados com a progressão da doença ou com a sua não perpetuação (BOISEN et al., 2012; LIMA et al., 2013; HAVT et al., 2017; JESEN et. 2017).

1.2.3.1 Adesão celular bacteriana

O processo de adesão celular é a primeira etapa da colonização bacteriana na mucosa intestinal, sendo esse mecanismo mediado principalmente pelas fímbrias de aderência agregativa (AAF) (JENSEN et al., 2014; NAVARRO-GARCIA, ELIAS, 2011). Atualmente, cinco variações de subunidades fimbriais (AAFI a AAFV) foram confirmadas com o emprego de microscópio eletrônico, cristalografia de raios-X e ressonância magnética, apresentando estruturas distintas do pilin (BERRY et al., JØNSSON et al., 2015, 2017).

Estudos demonstram que as fímbrias da EAEC são comparadas a “organelas multifuncionais”, que, além de atuarem na adesão de explantes intestinais humanos (SHEIKH et al., 2001), facilitam a formação de biofilme em superfícies abióticas (DUDLEY et al., 2006b; BOLL et al., 2012), interagem com fibronectina associada à AAF/V (JØNSSON et al., 2017) e estimulam a liberação de interleucina-8 (IL-8) (STRAUMAN et al., 2010), e ainda, especificamente, AAF/II foi capaz de modular o ciclo celular e a indução de apoptoses (PRIYA et al., 2017).

Outro fator que corrobora para adesão bacteriana é o gene *aap* que codifica a proteína de dispersão, induzindo a uma mudança eletrostática na superfície da camada lipossacarídica bacteriana, o que facilita a movimentação do patógeno, promovida pelas projeções fimbriais, as quais se ligam aos componentes bacterianos como a matriz celular intestinal, citoqueratina-8 e a fibronectina (FARFAN et al., 2008; JØNSSON et al., 2017).

Ademais, as fímbrias I, II e III contribuem para o fenótipo padrão AA, controlado pelo gene *aggR*, que é um importante ativador transcricional, responsável pela adesão da EAEC, que promove a expressão de fímbrias e dispersina, o que está relacionado às cepas de EAEC “típicas” (DUDLEY et al., 2006b; JENSEN et al., 2014).

1.2.3.2 Formação de biofilme

Após a excreção da camada de muco nos enterócitos, ocorre a formação de biofilme, que é um importante passo na patogênese da EAEC e um fator de virulência importante, que pode fornecer resistência ao microrganismo contra a atividade de agentes físicos e químicos (MARQUES, 2005; RICKARD et al., 2003), bem como contribuir para infecções subclínicas e manifestações persistentes da doença, ao permitir que as bactérias evadam o sistema imunológico

local, podendo inibir a quimiotaxia, a fagocitose e a proliferação de linfócitos, além de limitar a atuação dos macrófagos, prevenir o transporte de fatores antibacterianos e também a passagem de antibióticos (PEREIRA et al., 2007; TOKUDA et al., 2010; VASUDEVAN et al., 2003).

Uma característica relevante da EAEC é sua capacidade de formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas, fato resultante de sua genética multifatorial (DUDLEY et al., 2006b; ESTRADA-GARCIA, NAVARRO-GARCIA, 2012).

Sheikh et al. (2001) demonstraram que o produto de *YafK*, proteína relacionada à transpeptidase, é requerido na regulação e biossíntese de AAF/II e regulador da expressão AAF (*Fis*), os quais contribuem para formação de biofilme, sendo o último relacionado ao seu tempo-dependente de crescimento bacteriano. Distintas das outras cepas de *E. coli*, o biofilme da EAEC indica não estar relacionado ao *curli*, ao flagelo nem ao antígeno 43.

Fujiyama et al. (2008) mostraram que na cepa padrão 042 ocorre estimulação do codificador de proteína homóloga à *Shigella flexneri* (*shf*), aumentando os níveis transcricionais de *aggR*, o que é necessário para formação de biofilme. Outros estudos clínicos com amostras diarreicas demonstraram que o gene regulador transcricional (*aggR*), proteína antiagregativa (*aap*), transportador de proteína de anti-agregação (*aatA*), toxina termoestável A (*astA*) e enterotoxina *ShET-1* (*set1A*), bem como a combinação proteína envolvida em colonização (*pic*), protease extracelular da *Shigella* (*sepA*) e subunidade da AAF/IV (*agg4A*) estão associados com a presença de biofilme (CENNIMO et al., 2009; NEZARIEH et al., 2015).

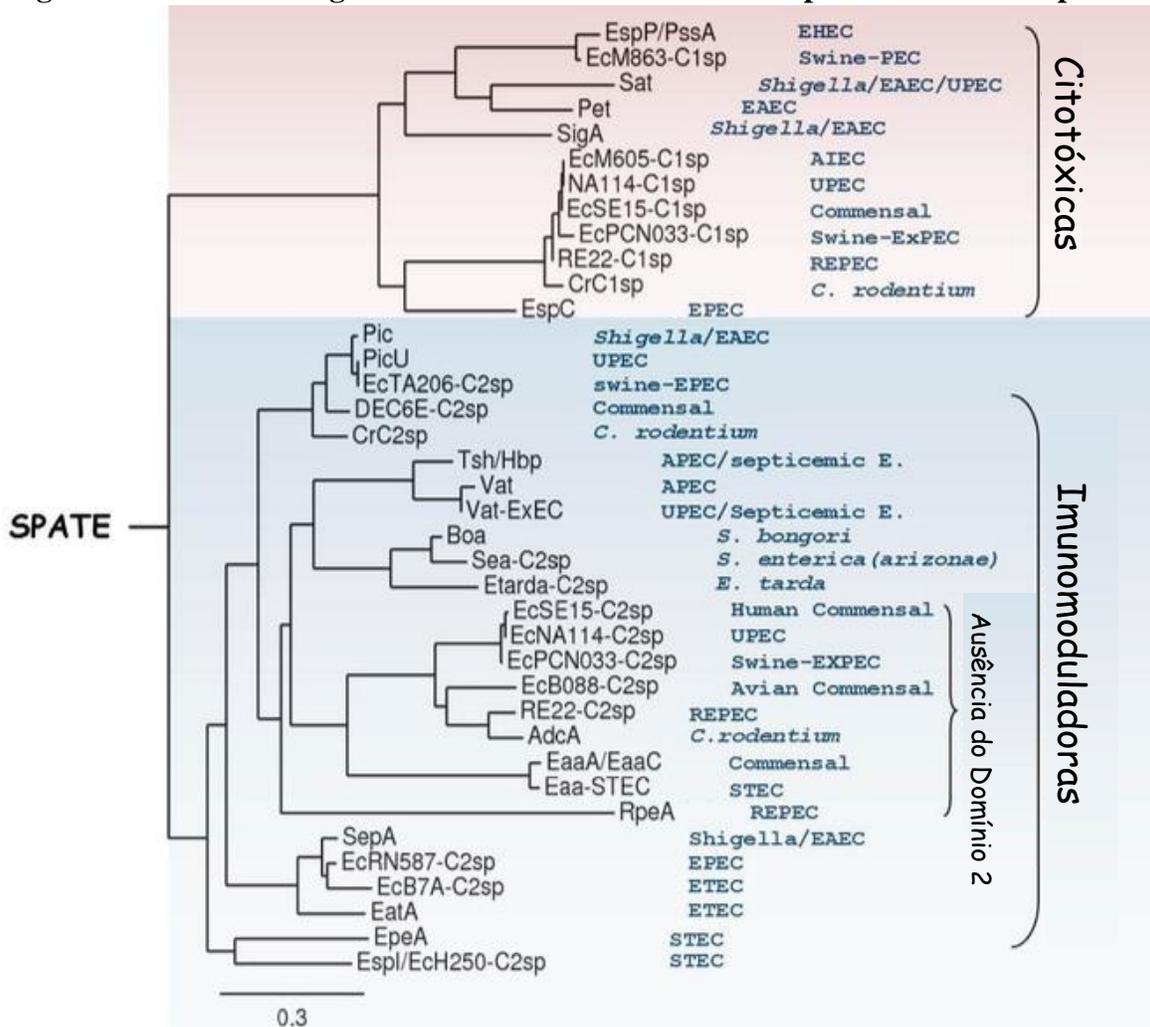
1.2.3.3 Elaboração e liberação de toxinas

Uma vez completa a formação do biofilme, pode ocorrer a liberação de citocinas e proteínas imunomoduladoras, o que pode alterar o epitélio intestinal, induzindo o processo inflamatório e até a morte celular (PRIYA et al., 2017; PRATA et al, 2018).

Uma ampla variedade de substâncias liberadas pela EAEC nesta etapa encontra-se dentro da família das serinas proteases autotransportadoras (SPATEs), que apresentam, como sítio ativo, uma tríade catalítica (Ser/His/Asp), a qual induz a atividade proteolítica (RUIZ-PEREZ, NATARO, 2014). As SPATEs incluem 25 proteases com substratos diferentes, distribuídos em diversos organismos, e são divididas em duas classes, com base na filogenética, podendo apresentar duas distintas sequências de aminoácidos no domínio passageiro ou no

domínio alfa, região que apresenta características funcionais da proteína (RUIZ-PEREZ, NATARO, 2014). Assim, a árvore filogenética das duas classes de SPATEs pode ser visualizada na **Figura 3**.

Figura 3 – A árvore filogenética das duas classes de serina protease autotransportadora



Fonte: Adaptado de Ruiz-Perez e Nataro (2014). Legenda: *E. coli* uropatogênica – UPEC; *E. coli* enteroagregativa – EAEC; *E. coli* de adesão difusa – DAEC; *E. coli* enteropatogênica – EPEC; *E. coli* enterohemorrágica – EHEC; *E. coli* patogênica aviária – APEC; *E. coli* enterotoxigênica – ETEC; *E. coli* produtora de shiga toxin – STEC; *E. coli* patogênica extra-intestinal – EXPEC; *E. coli* aderente-invasiva – AIEC; e *E. coli* enteropatogênica de coelho – REPEC.

A classe I das SPATEs (**TABELA 1**) compreende os genes codificadores de proteínas que demonstram citotoxicidade *in vitro* e atividade enterotoxigênica em tecidos animais com alvos intracelulares. Assim, incluem os seguintes genes: toxina autotransportadora secretada–*Sat* (GUYER et al., 2000), toxina codificada por plasmídeo – *pet* (ESLAVA et al.,

1998), protease homóloga da *Shigella IgA-like- sigA* (AL-HASANI et al., 2000), codificador da enterotoxina EspC – *espC* (STEIN et al., 1996) e serina protease extracelular – *espP* (BRUNDER, SCHMIDT, KARCH, 1997).

Tabela 1 – Caracterização das principais serina proteases autotransportadoras (SPATEs) da Classe I

SPATEs da Classe I	Manifestações Clínicas	Função/Efeito	Substrato Biológico	Patógenos
Sat – toxina autotransportadora secretada	Cistite, Pielonefrite, Muco e sangue nas fezes e Diarreia aquosa	Citotoxicidade, enterotoxina, danos nas proteínas de junções firmes da barreira intestinal, autofagia	- Espectrina - Fator V	- UPEC - <i>Shigella</i> - EAEC - DAEC
Pet – toxina codificada por plasmídeo	Diarreia aquosa	Citotoxicidade, enterotoxina	- Espectrina - FAK - Fator V	EAEC
SigA – protease homóloga da <i>Shigella IgA-like</i>	Muco e sangue nas fezes, Diarreia aquosa	Citotoxicidade, enterotoxina	- Espectrina	- <i>Shigella</i> -EAEC
EspC – codificador da enterotoxina EspC	Diarreia aquosa	Citotoxicidade, enterotoxina	- Espectrina - Fator V - Hemoglobina	- EPEC
EspP – serina protease extracelular	Diarreia hemorrágica	Citotóxica, aderência e biofilme	- Fator V - C3/C3b/C5	- EHEC - EPEC

Fonte: Adaptado de Ruiz-Perez e Nataro (2014). Legenda: *E. coli* uropatogênica - UPEC; *E. coli* enteroagregativa - EAEC; *E. coli* de adesão difusa - DAEC; *E. coli* enteropatogênica – EPEC e *E. coli* enterohemorrágica - EHEC

Estudos mostram que a classe II das SPATEs (TABELA 2) é conhecida como imunomoduladora, apresentando a atividade proteolítica, como mucinase, e habilidade de aderir glicoproteínas, o que pode refletir na sua capacidade de aglutinar os glóbulos vermelhos, atuando também na clivagem de glicoproteínas leucocitárias, as quais são substituídas por carboidratos, apresentando estrutura similar às encontradas em mucinas de glicoproteínas humanas, de modo a induzir o comprometimento leucocitário. Por conseguinte, sugere-se o seu envolvimento na

evasão imunológica do hospedeiro, o que confere vantagens no seu processo de colonização (RUIZ-PEREZ, NATARO, 2014).

Tabela 2 – Caracterização das principais serina proteases autotransportadoras (SPATEs) da Classe II

SPATEs da Classe II	Manifestações Clínicas	Função/Efeito	Substrato Biológico	Patógenos
Pic – proteína envolvida em colonização	Cistite, Pielonefrite e Diarreia	Mucinase, Imunomodulação, Colonização, Hemaglutinina lectina-like, Atividade secretória de muco, resistente a soro	- Mucina - Glicoproteínas ligadas O: CD43,CD44, CD45, CD93,CD162, CX3CL1	- <i>Shigella</i> - EAEC
Tsh – hemaglutinina sensível à temperatura	Injúria infecciosa, Septicemia	Mucinase, Imunomodulação, Sequestro iônico, Hemaglutinina lectina-like, Proteínas de ligação ECM	- Mucina - Hemoglobina - Glicoproteínas ligadas O: CD43,CD45, CD93, CD93,CD162, CXCL1	- <i>E. coli</i> causadora de Sepsis - APEC
Vat – toxina autotransportadora de vacuolizante	Septicemia, Doença respiratória, celulites	Agente de vacuolizante, Vat efeitos desconhecidos	Desconhecido	- APEC
SepA – protease extracelular da <i>Shigella</i>	Sangue e muco nas fezes, Diarreia aquosa	Enterotoxina, SepA efeitos desconhecidos	Desconhecido	- <i>Shigella</i> - EAEC
EatA – proteína autotransportadora de <i>E. coli</i> enterotoxigênica	Diarreia aquosa	Enterotoxina, EatA efeitos desconhecidos	- Adesina EtpA	- ETEC
EspL – <i>Escherichia coli</i> secretora de protease	Diarreia, SHU	Mucinase, Bloqueio de Necroptose	- Mucina	- STEC

Fonte: Adaptado de Ruiz-Perez e Nataro (2014). Legenda: Síndrome Hemolítico Urêmica – SHU; *E. coli* enteroagregativa – EAEC; *E. coli* patogênica aviária – APEC; *E. coli* enterotoxigênica – ETEC; e *E. coli* produtora de shiga toxina – STEC.

Na classe II, os principais alvos estão presentes no compartimento extracelular e incluem os genes: proteína envolvida na colonização – *pic* (HENDERSON et al., 1999); hemaglutinina sensível à temperatura – *tsh* (PROVENCE, CURTIS, 1994); toxina autotransportadora vacuolização – *vat*, (SALVADORI et al., 2001); protease extracelular da *Shigella* – *sepA* (SANDT, HILL, 2000); proteína autotransportadora de *E. coli* enterotoxigênica – *eatA* (PATEL et al., 2004); e *Escherichia coli* secretora de protease – *espL* (SCHMIDT et al., 2001).

Assim, estudos têm focado na elucidação dos mecanismos secretores das SPATEs, apesar da elevada variação da biogênese, que inclui mecanismos de clivagem e requerimento de chaperonas, além das diferentes funções desempenhadas, como proteases e adesinas, dos diversos mecanismos, por exemplo, citotóxicos e imunomoduladores.

Nesse contexto, observam-se ainda discrepâncias experimentais *in vitro* e *in vivo* e diversidade de relações com estudos clínicos, como transferências genéticas plasmidiais, o que torna um desafio a determinação do papel das SPATEs na patogênese da EAEC.

1.3.3.4 Outros fatores de virulência

Um amplo número de genes de virulência pode estar presente em cepas isoladas de EAEC, promovendo mecanismos complexos de colonização do hospedeiro, que podem contribuir para a patogênese ou inibi-la.

Toxina enteroagregativa termolábil (EAST-1) é codificada pelo *astA*, gene adjacente ao *pet*, que está presente também nas cepas de EPEC, ETEC e EHEC. Nesse esteio, apesar de ser uma toxina, EAST-1 não está inserida na classe das SPATEs. Yatsuyanagi et al. (1996) sugerem que a presença de EAST-1, confirmada por análises de *southern blot*, poderia estar vinculada ao surto de diarreia no Japão. Ademais, EAST-1 é frequentemente comparada à enterotoxina termoestável de *E. coli* (STa); pois ambas são consideradas indutoras de diarreia secretória. Contudo, em estudo realizado nas câmeras de *ussing* em isolados de íleo de coelho, EAST-1 não demonstrou atividade enterotóxica (SAVARINO et al., 1993).

Além disso, em pesquisa realizada com cepas de EAEC (17-2), detectadas com EAST-1, introduzidas em voluntários, não se observaram manifestações clínicas da diarreia (NATARO et al., 1995), uma vez que, provavelmente, a combinação de outros genes seja requerida para a indução da diarreia; logo o sequenciamento da cepa padrão EAEC 042

confirmou a presença do gene *astA* (CHAUDHURI et al. 2010), o que pode contribuir para sua capacidade de indução da diarreia em voluntários.

Sheikh et al. (2006) identificaram que cepas mutantes de 042 para o gene regulador homólogo ao *Salmonella* *HilA* (*eilA*) causavam alterações direta e indiretas em diversos genes das ilhas de patogenicidade *eip* (ex., *eipB*, *eipC*, *eipD*, *eicA* and *eaeX*) e em dois genes não oriundos de *eip* (ETT2 -*Escherichia coli* sistema de secreção 2 tipo 3), bem como tornavam a bactéria menos aderente às células epiteliais *in vitro*, reduzindo a formação do biofilme, que se apresentou menos abundante e isogênico. O sistema ETT2 apresenta semelhança aos encontrado em *E. coli* enterohemorrágica e *Salmonella*. Neste sentido, é possível que similares efetores do sistema ETT2 estejam localizados no mesmo *locus* (*selC* tRNA) do gene *air* (proteína repetida da imunoglobulina enteroagregativa), o qual está envolvido na adesão e na agregação da EAEC (ELIAS, NAVARRO-GARCIA, 2016; SHEIKH et al. 2006).

Estudos relacionados à *Shigella flexneri* mostram o aumento da expressão de ShiA, proteína imunomoduladora (codificada pelo gene *shIA*), pode reduzir o recrutamento de neutrófilos e a deleção do gene, o que causa a indução do processo inflamatório (INGERSOLL et al., 2003; INGERSOLL, ZYCHLINSKY, 2006).

Além disso, após o recente sequenciamento da cepa EAEC 042 (, novos genes foram descobertos, dentre os quais, o *aar*, anteriormente conhecido como *orf61*, que se apresenta como um possível plasmídeo codificador da proteína hemolisina (CHAUDHURI et al., 2010). Contudo, em estudo transversal de diarreia infantil realizado por Lima et al. (2013), observou-se que o gene *aar* foi associado às crianças assintomáticas.

1.3.3.5 Inflamação

Estudos clínicos mostram que a EAEC é capaz de causar resposta inflamatória, induzindo a liberação de interleucina (IL)-8, IL-1 β , interferon (INF)- γ , leucócitos, sangue oculto e lactoferrina, identificados em amostras fecais (STEINER et al., 1998; GREENBERG et al., 2002; JIANG et al., 2002; CENNIMO et al., 2009; JIANG et al., 2002). Ademais, Gupta et al. (2016) testaram cepas de EAEC isoladas de crianças indianas com manifestações de diarreia, *in vitro*, mostrando a heterogeneidade de marcadores de virulência, estimulando a resposta

inflamatória, com aumento da expressão de IL-8, IL-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral (TNF)- α e TLR-5.

Em relação ao mecanismo da EAEC, pesquisas sugerem que a flagelina (FliC) estimula a liberação de IL-8 em células epiteliais após se ligar ao receptor de *Toll-like 5* (TLR5). Logo, TLR5 sinaliza para ativação de proteína quinase, ativada por mitógeno (MAPK) (ERK-1/2, JNK e p38MAPK), o que estimula a ligação de NF- κ B e AP-1, resultando na liberação de citocinas pró-inflamatórias e IL-8, que é um potente indutor de migração de polimorfonucleares (PMN) (KHAN, KANG, STEINER, 2004; KHAN et al., 2010).

Boll e McCormick (2012) sugerem que, para a indução de PMN na infecção por EAEC, é necessária uma segunda secreção (lipídica) na zona apical do epitélio. Desse modo, inicia-se pela polarização das células epiteliais, ativando a fosfolipase A₂ (iPLA2) - independente de cálcio, que modula a liberação do ácido araquidônico a partir da membrana celular. Mediante a ação da 12-lipoxigenase e do ácido araquidônico, é gerado o metabólito da hepxilina A₃ (HXA₃), um potente quimioatraente.

Ademais, a infecção por EAEC também causa aumento da expressão do transportador de cassete de ligação a ATP (ABC) associado à proteína 2 de resistência (MRP2), a qual apresenta função de liberação de HXA₃, na zona apical da membrana, cuja sua secreção forma um gradiente quimiotático entre as proteínas de junção firme. Logo, os PMN transitam por meio da via paracelular em direção ao lúmen. No mesmo grupo de pesquisa, Boll et al. (2017) demonstraram que a interação de AAF com MUC-1 (mucina), além de facilitar a adesão, induziu a migração neutrofílica pela mucosa epitelial, após a infecção por EAEC.

De forma interessante, observam-se, em crianças sem manifestações clínicas e com indução de leve a moderada, inflamação durante a colonização pela EAEC (ROGAWISKI et al., 2017, STEINER et al., 1998, HAVT et al., 2017), o que pode estar associado a consequências da infecção a longo prazo, como redução da velocidade de crescimento infantil.

2 JUSTIFICATIVA

Ao longo dos últimos anos, a taxa de mortalidade infantil decorrente de doenças diarreicas sofreu um declínio de 57%, em termos globais. Entretanto, as doenças diarreicas continuam em segundo lugar, como causa de mortalidade em crianças abaixo de cinco anos de idade (UNICEF, 2016; OMS, 2017a).

As informações do Ministério da Saúde brasileiro mostram a notificação de mais de 1,5 milhão de casos de diarreia registrados pelas unidades sentinelas, entre os anos de 2011 e 2015. A região do Nordeste brasileiro é a mais afetada, sendo responsável pela metade de óbitos das doenças diarreicas do país, o que reflete as precárias condições higiênico-sanitárias e o baixo perfil socioeconômico da população local (BRASIL, 2015a).

Em geral, o maior percentual de casos de diarreia no Nordeste brasileiro foi reportado em crianças menores de cinco anos de idade, as quais, em casos persistentes de diarreia, podem apresentar severo desequilíbrio hidroeletrólítico e desidratação. Em conjunto com a desnutrição, esses distúrbios são associados ao aumento das taxas de óbito infantil (BRASIL, 2015b,c).

Estudos multicêntricos internacionais relatam a alta prevalência de infecções por EAEC na população infantil em casos diarreicos ou assintomáticos. Nesse contexto, as colonizações subclínicas têm sido reconhecidas como um importante fenômeno que compõe a DEA (PLATTS-MILLS et al., 2015; KEUSCH et al., 2014).

No Brasil, a EAEC foi reconhecida como um importante agente etiológico presente em crianças com quadro clínico diarreico e nos casos de colonização subclínica, o que pode resultar em redução de crescimento linear infantil, déficit cognitivo e inflamação crônica (BUERIS et al., 2007; FRANZOLI et al., 2005; LIMA, GUERRANT, 1992; LIMA et al., 2000; MORENO et al., 2010; STEINER et al., 1998). Entretanto, ainda existem poucos estudos que investigaram a epidemiologia molecular de patógenos específicos das infecções entéricas na região do Semiárido brasileiro.

Diante do exposto, considerando o importante papel da colonização pela EAEC na população infantil brasileira, tornou-se fundamental investigar a patobiologia dessa bactéria, relacionado os fatores de virulência com as infecções com manifestações diarreicas e subclínicas. Além disso, a busca de biomarcadores para os diferentes desfechos clínicos da infecção por EAEC mostra-se de extrema importância para o melhor manejo da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a frequência da infecção pela *Escherichia coli* enteroagregativa, fatores determinantes do perfil de genes codificadores de virulência, inflamação e gravidade da doença em crianças, participantes do estudo transversal de diarreia, residentes no Semiárido brasileiro

3.2 Objetivos específicos

1. Investigar a frequência da infecção pela EAEC em crianças com e sem diarreia residentes no Semiárido brasileiro;
2. Caracterizar a distribuição dos determinantes populacionais, socioeconômicos, sanitários antropométricos e clínicos na infecção por EAEC em crianças com e sem diarreia residentes no Semiárido brasileiro;
3. Desenvolver iniciadores para a identificação de novos genes relacionados à virulência da EAEC, mediante reações múltiplas em cadeia da polimerase;
4. Analisar a distribuição dos genes codificadores de fatores de virulência relacionados à gravidade da infecção pela EAEC diagnosticada em amostras fecais de crianças com e sem diarreia no Semiárido brasileiro;
5. Avaliar a distribuição das coinfeções relacionadas à infecção pela EAEC diagnosticada em amostras fecais de crianças com e sem diarreia no Semiárido brasileiro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

O presente estudo é derivado do projeto intitulado “Intervenção com micronutrientes e impactos ao longo prazo no Brasil –Subprojeto 2A - Rede de Ovino Caprino Cultura e Diarreia Infantil no Semiárido Brasileiro - RECODISA - (CONEP, protocolo n°.238□05 –**ANEXO A**, protocolo n°.238□05) e recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da UFC (COMEPE/UFC, ofício n°.338□2009 – **ANEXO B**). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**ANEXO C**) foi revisado e aprovado pelo COMEPE (ofício n°. 338□2009, protocolo n°. 238□05) em 06 de Abril de 2009.

4.2 Delineamento do estudo

RECODISA é um estudo epidemiológico, observacional, analítico, transversal, envolvendo a participação de 1.200 crianças, com faixa etária de 2 a 36 meses de idade, das quais 596 foram consideradas casos (crianças com diarreia) e 604, controles (crianças assintomáticas), no período entre setembro de 2009 a março de 2011 (Lima et al. *Manuscrito em submissão*). Os seguintes critérios de inclusão e exclusão dos participantes foram utilizados no estudo:

1. Critérios de inclusão:

- 1.1.Casos: crianças que apresentaram 3 ou mais evacuações líquidas, ou semissólidas nas últimas 24 horas; consentimento escrito emitido por pelo menos um dos pais;
- 1.2.Controles: crianças que não apresentaram diarreia nas últimas duas semanas imediatas ao recrutamento do estudo; consentimento escrito emitido por pelo menos um dos pais;

2. Critérios de exclusão de casos e controles: crianças que previamente participaram de outros estudos, ou cujos pais não entregaram o termo de consentimento assinado, ou que fizeram uso de antibióticos nos últimos 30 dias ou apresentaram doenças moderadas a graves (por exemplo, pneumonia, doença de Crohn etc), ou que estiveram internadas em unidades básicas de saúde por mais de 12 horas.

Após a etapa de inclusão das crianças com a assinatura do TCLE (**ANEXO C**), o questionário epidemiológico foi aplicado. Os dados solicitados sobre as crianças foram: idade, sexo, altura, peso, circunferência da cabeça e aleitamento materno; da mãe, idade atual e anos de escolaridade; levantamento de sinais e sintomas das doenças diarreicas; além das variáveis socioeconômicas e demográficas, como renda familiar, origem da água de beber, presença de sanitário nas residências, e outros dados conforme descrito no questionário anexo (**ANEXO D**).

Para a execução dos procedimentos delineados nos protocolos do estudo, equipes de campos multidisciplinares de cada cidade foram treinadas por nossa equipe laboratorial na Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará (LDI/IBISAB-UFC), as quais realizaram a aplicação do questionário, instrução de coleta das amostras aos responsáveis pelas crianças, o recebimento e acondicionamento do material coletado.

4.3 Local do estudo e população do Semiárido brasileiro

Os participantes foram atendidos em unidades básicas de saúde ou durante a atuação de vigilância dos agentes de saúde em comunidades carentes de seis cidades da região do Semiárido: Crato, localizada no estado do Ceará; Picos, no Piauí; Ouricuri, em Pernambuco; e Cajazeiras, Sousa e Patos, na Paraíba, os quais são municípios representantes do Semiárido brasileiro, com populações com mais de 50.000 habitantes (**FIGURA 4**).

Recentemente, a Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste (2017) relatou que o Semiárido brasileiro passou a ter 1.189 cidades, localizadas nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe. Essa região concentra uma população superior a 25 milhões de habitantes (11,4% da população brasileira) que residem em 54 municípios, dos quais 31 deles estão entre os 20% do país com pior Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDHM). Diante do exposto, os mais afetados pela pobreza são crianças e adolescentes que compõem, aproximadamente, 67,4% da população do Semiárido brasileiro (UNICEF, 2011), onde as famílias são influenciadas drasticamente pelas alterações ambientais.

O Semiárido brasileiro apresenta uma vasta área de 1,03 milhão km², que equivale a 12% do espaço brasileiro e constitui aproximadamente 89,5% da região no Nordeste. Essa região apresenta como características, em grande parte dos seus municípios, altos índices de aridez de

Thorntwaite (até 0,5), índices pluviométricos anuais abaixo de 800mm durante o ano, risco de seca superior a 60% e a Caatinga como bioma predominante (ALVARES et al., 2014).

Figura 4 – A delimitação da região do Semiárido brasileiro e as cidades envolvidas no estudo



Fonte: Adaptado da Agência Nacional de Águas (ANA) / Ministério da Integração (MI). Legenda: A rede do estudo foi formada por seis cidades no Semiárido selecionadas aleatoriamente, com base em municípios com frequência de mais de 50.000 habitantes, pertencentes aos estados que são constituídos por área acima de 50% pertencente ao Semiárido, estando as cidades representadas por pontos amarelos.

4.4 Coleta de amostras e processamento das amostras fecais

Após as instruções dos agentes de saúde, as amostras foram coletadas em tubos estéreis pelos pais ou responsáveis, seguido pelo acondicionamento em freezer a -20°C , para posterior transporte e envio ao Laboratório de Doenças Infecciosas localizado na unidade de Pesquisas Clínicas & Instituto de Biomedicina/Centro de Saúde Global, na Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará (LDI/IBISAB-UFC). No momento da entrada das amostras no laboratório, foram alíquotadas, etiquetadas com códigos de barras (com identificação numeral), inseridas no sistema de gerenciamentos de dados e acondicionadas em freezer com a temperatura em -80°C até a extração do material genômico.

As amostras fecais eram alíquotadas em aproximadamente 200mg (com a pesagem em balança analítica), com a adição de 300mg de microesferas de vidro em um tubo de 2mL, o que facilitou a lise celular, após a diluição em tampão de lise celular ASL do *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA), utilizado para extração do DNA, conforme as instruções do fabricante, seguido de armazenado em freezer a -20°C.

Em relação à extração do RNA viral, a amostra fecal era transferida para um tubo de 2mL, homogeneizada, centrifugada a 10.000 rpm por 1 min a 4°C. Após o descarte do sobrenadante com a finalidade da retirada de *RNA later Stabilization Reagent*, agente estabilizador do RNA (Qiagen, Valencia, CA), prosseguiu-se com a diluição do pellet com 1ml de solução salina estéril, logo a amostra foi centrifugada novamente e um alíquota de 140µl foi retirada para a extração do RNA viral com a utilização do *QIamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA), de acordo com o manual de instruções da fabricante, o material genético extraído foi em seguida armazenamento em freezer a -80°C.

No intuito de analisar a quantificação e qualidade do DNA e RNA, obtidos pela extração das amostras fecais, o material genômico foi submetido ao espectrofotômetro *Nano Drop 2000c* (Thermo Scientific, Waltham, MA).

O rendimento de ácido nucléico foi avaliado pelo comprimento de onda 260nm. Para as análises de pureza desse material genômico extraído foi utilizado a estimativa de razão de 260/280nm, na qual os valores para a extração do DNA e RNA foram respectivamente, 1,8 e 2,0, que indicam a pureza do material genômico com ausência de contaminantes (THERMO-SCIENTIFIC, 2012).

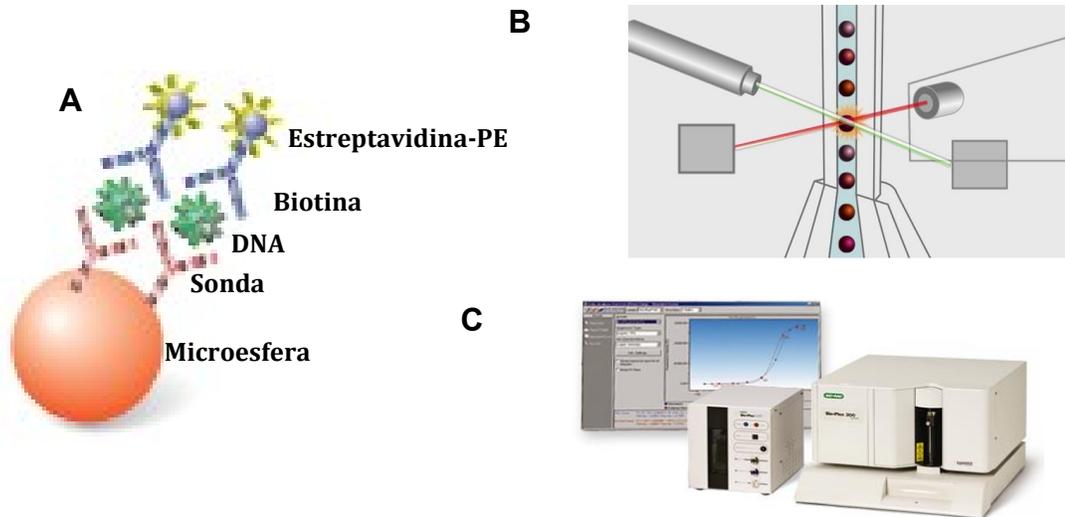
4.5 Diagnóstico molecular pela tecnologia Luminex XMAP

Com a colaboração do professor Eric Houpt do Centro de Saúde Global, Divisão de Doenças Infecciosas e Medicina Internacional, da Faculdade de Medicina na Universidade da Virgínia, foi possível realizar o diagnóstico molecular, pela técnica do *Luminex XMAP* (**FIGURA 5**).

Essa tecnologia proporciona a detecção de múltiplos fragmentos de DNA, pela sua amplificação, empregando o ensaio de reações múltiplas em cadeia de polimerase (PCR-*multiplex*), o qual é hibridizado com microesferas eletromagnéticas, acopladas a sondas

específicas, para identificação de uma variedade de microrganismos. A vantagem dessa tecnologia é a alta sensibilidade e especificidade, além da rapidez de aplicação no diagnóstico. Nesse projeto foi utilizado o equipamento Bio-Plex[®]200 (Bio-rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) no diagnóstico da EAEC e dos outros enteropatógenos.

Figura 5 – Modelo de diagnóstico na plataforma *Luminex*Bio-Plex[®] 200.



Fonte: Adaptado de Camara (2014). Legenda: Esta tecnologia é baseada em três sistemas: microesferas que fornecem uma marcação espectral associada à hibridização com reação múltiplas em cadeia da polimerase acopladas a sondas específicas para cada alvo (A), citometria de fluxo, a qual, por meio de dois lasers, detecta a intensidades de fluorescência: um laser vermelho, que identifica cada microesfera (ou o agente patogênico) pelo seu código de cores e um laser verde detecta o sinal de hibridação associada a cada grânulo, o que indica a intensidade da média de fluorescência de um agente patogênico particular (B) e um processador digital associado a *software* para análise de dados (C).

4.5.1 Diagnóstico molecular da *Escherichia coli* enteroagregativa e de outros enteropatógenos

As análises moleculares diagnosticaram quatro painéis de enteropatógenos:

1. *Escherichia coli* patogênicas: a *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *Escherichia coli* enteroapatógênica (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) e *Escherichia coli* produtora de shiga-toxina (STEC) (**TABELA 3**);
2. Outras bactérias: *Shigella* spp./EIEC, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp, *Aeromonas* spp e *Vibrio* spp. (**TABELA 4**);
3. Protozoários: *Giardia* spp, *Cryptosporidium* spp e *Entamoeba histolytica* (**TABELA 4**);

4. Vírus: rotavírus, norovírus, astrovírus e sapovírus (TABELA 5).

Tabela 3 – Patógenos, genes alvos, iniciadores, sondas e condições de PCR para identificação das *Escherichia coli* diarrreio gênicas

Patógenos	Gene alvo (No. de acesso)		Sequência (5' – 3')	Temperatura de anelamento
<i>EAECl</i>	<i>aaiC</i> -codificador da ilha de ativação do regulador transcricional (FN5547661)	F ⁵	ATTGTCCTCAGGCATTTAC	30s a 94° C
		R ⁶	ACGACACCCCTGATAAACAA	30s a 60° C
		P ⁷	GTAGTGCATACTCATCATTTAAG	60s a 72° C
<i>EAEc</i>	<i>aatA</i> - transportador de proteína anti-agregação (AY351860)	F	CTGGCGAAAGACTGTATCAT	30 s a 94° C
		R	TTTTGCTTCATAAGCCGATAGA	30 s a 60° C
		P	TGGTTCACAGCTCATCTATTACAG	60s a 72° C
<i>EHEC²</i>	<i>stx1</i> - Shiga toxina 1 (AE0051742)	F	ACTTCTCGACTGCAAAGACGTATG	30 s a 94° C
		R	ACAAATTATCCCCTGAGCCACTATC	30 s a 60° C
		P	CTCTGCAATAGGTACTCCA	60s a 72° C
<i>EHEc</i>	<i>stx2</i> - Shiga toxina 2 (AE0051742)	F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	30 s a 94° C
		R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	30 s a 60° C
		P	GGGGAGAATATCCTTTAATA	60s a 72° C
<i>EHEc</i> / <i>EPEC³</i>	<i>eaeA</i> - Intimina proteína aderência (NC0116011)	F	GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG	30 s a 94° C
		R	CAAAGCGCACAAAGAYTACCA	30 s a 60° C
		P	GCACATAAGCAGGCAAAATAGC	60s a 72° C
<i>EPEC</i>	<i>bfpA</i> - gene estrutural pilus (pilina tipo 4) (NC0116011)	F	GGAAGTCAAATTCATGGGGG	30 s a 94° C
		R	GGAATCAGACGCAGACTGGT	30 s a 60° C
		P	GCTGCAACCGTTACCGCAGG	60s a 72° C
<i>ETEC⁴</i>	<i>eltB</i> – subunidade enterotoxin B (NC0176331)	F	TTCCCACCGGATCACCAA	30 s a 94° C
		R	CAACCTTGTTGGTGCATGATGA	30 s a 60° C
		P	CTTGAGAGAAGAACCCT	60s a 72° C
<i>ETEc</i>	<i>estA</i> – enterotoxina estável ao calor (NC0176331)	F	GCTAAACCAGTARGGTCTTCAAAA	30 s a 94° C
		R	CCCGGTACARGCAGGATTACAACA	30 s a 60° C
		P	TGGTCCTGAAAGCATGAA	60s a 72° C

Fonte: Taniuchi et al. (2013). Legenda: 1 - *E. coli* enteroagregativa (EAEc), 2 - *E. coli* enterohemorrágica (EHEc), 3 - *E. coli* enteropatogênica (EPEC), 4 - *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), 5 – iniciador senso (F), 6 – iniciador reverso (R) e 7 – sonda (P).

Tabela 4 – Patógenos, genes alvos, iniciadores, sondas e condições de PCR para identificação de outras bactérias.

Patógenos	Gene alvo (No. de acesso)		Sequência (5' – 3')	Temperatura de anelamento
Outras bactérias				
<i>Shigella</i> spp./ EIEC	<i>ipaH</i> - antígeno plasmidial de invasão(M32063)	F ¹	CGGAATCCGGAGGTATTGC	30 s a 95° C
		R ²	CCTTTTCCGCGTTCCTTGA	30 s a 60° C
		P ³	CGCCTTTCCGATACCGTCTCTGCA	60s a 72° C
<i>Aeromonas</i> spp.	<i>aerA</i> - aerolisina codificada por plasmídeo (M16495)	F	TYCGYTACCAGTGGGACAAG	30 s a 95° C
		R	CCRGCAAACCTGGCTCTCG	30 s a 60° C
		P	CAGTTCAGTCCCACCACTT	60s a 72° C
<i>Campylobacter jejuni</i> e <i>coli</i>	<i>cadF</i> -Campylobacter adesão a fibronectina(AF104303)	F	CTGCTAAACCATAGAAATAAAATT TCTCAC	30 s a 95° C
		R	CTTTGAAGGTAATTTAGATATGGA TAATCG	30 s a 60° C
		P	CATTTTGACGATTTTGGCTTGA	60s a 72° C
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i> – <i>Salmonella</i> gene de invasão(M90846)	F	TCGGGCAATTCGTTATTGG	30 s a 95° C
		R	GATAAACTGGACCACGGTGACA	30 s a 60° C
		P	GAAGACAACAAAACCCACCGCC	60s a 72° C
<i>Vibrio cholera</i>	<i>toxR</i> - ativador transcricional da Cólera(M21249)	F	GTTTGGCGWGAGCAAGGTTT	30 s a 95° C
		R	TCTCTTCTTCAACCGTTTCCA	30 s a 60° C
		P	CGCAGAGTMGAAATGGCTTGG	60s a 72° C
Protozoários				
<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>COWP</i> - <i>Cryptosporidium</i> proteína 1 (AF279916)	F	CAAATTGATACCGTTTGTCTTCT G	30 s a 95° C
		R	GGCATGTCGATTCTAATTCAGCT	30 s a 55° C
		P	TGCCATACATTGTTGTCCTGACAA ATTGAAT	30s a 72° C
<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>18S rRNA</i> -18S ribossomo RNA(X641142)	F	AACAGTAATAGTTTCTTTGGTTAG TAAAA	30 s a 95° C
		R	CTTAGAATGTCATTTCTCAATTCAT	30 s a 55° C
		P	ATTAGTACAAAATGGCCAATTCAT TCA	30s a 72° C
<i>Giardia lamblia</i>	<i>18S rRNA</i> -18S ribossomo RNA(M54878)	F	GACGGCTCAGGACAACGGTT	30 s a 95° C
		R	TTGCCAGCGGTGTCCG	30 s a 55° C
		P	CCC GCGCGGTCCCTGCTAG	30s a 72° C

Fonte: Liu et al., (2012) e Taniuchi et al., (2011). Legenda: 1– iniciador senso (F), 2 – iniciador reverso (R) e 3 – sonda (P).

Tabela 5 – Patógenos, genes alvos, iniciadores, sondas e condições de PCR para identificação de vírus

Patógenos	Gene alvo (No. de acesso)		Sequência (5' – 3')	Temperatura de anelamento
Adenovírus	<i>Hexon</i> - proteína do capsídeo (L19443 e M21163)	F ¹	GCCACRGTGGGRTTCTCAACTT	30 s a 94° C
		R ²	GCCGCAATGGTCTTACATGCACATC	30 s a 60° C
		P ³	TGCACCAGGCCCGGGCTCAG	60s a 72° C
Astrovírus	Capsídeo (AY720892)	F	CAGTTGCTTGCTGCGTTCA	30 s a 94° C
		R	CTTGCTAGCCATCACACTTCT	30 s a 60° C
		P	CACAGAAGAGCAACTCCATCGC	60s a 72° C
Norovírus GII	<i>ORF1-ORF2</i> – Open reading frame 1 e 2 (AF145896)	F	CARGARBCNATGTTYAGR	30 s a 94° C
		R	TGGATGAGTCGACGCCATCTTCATTCACA	30 s a 60° C
		P	TGGGAGGGCGATCGCAATCT	60s a 72° C
Rotavírus	<i>NSP3</i> - proteína 3 (X81436)	F	ACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG	30 s a 94° C
		R	GGTCACATAACGCCCTATAGC	30 s a 60° C
		P	AGTAAAAGCTAACACTGTCAAA	60s a 72° C
Sapovírus	<i>RdRp</i> -capsídeo (AY237420, U73124 e AY646856)	F1	GAYCAGGCTCTCGCYACCTAC	
		F2	TTGGCCCTCGCCACCTAC	30 s a 94° C
		R1	TTTGAACAAGCTGTGGCATGCTAC	30 s a 60° C
		R2	CCCTCCATYTCAAACACTA	60s a 72° C
		P1	CYTGGTTCATAGGTGGTRCAG	
		P2	CAGCTGGTACATTGGTGGCAC	

Fonte: Liu et al. (2011). Legenda: 1 – iniciador senso (F), 2 – iniciador reverso (R) e 3 – sonda (P).

4.5.2 Análise dos resultados para o diagnóstico da *Escherichia coli* enteroagregativa e de outros enteropatógenos pela plataforma *Luminex*

Os dados da plataforma *Luminex* foram analisados com base na média de intensidade de fluorescência (cMFI) corrigida pelo *background* da fluorescência das microesferas, o qual é referente ao controle negativo (MFI_{controle negativo}). A fórmula seguinte mostra como foi calculada a média de fluorescência: $cMFI = ([MFI_{alvo} - MFI_{controle\ negativo}] / MFI_{controle\ negativo})$. Nos controles positivos, foram utilizados DNA ou RNA de organismos de referência ou amostras previamente diagnosticadas (TANIUCHI et al., 2013). Os controles negativos eram água livre de nuclease. Os dois controles, positivo e negativo, foram incluídos em todos os experimentos. Para que o ensaio fosse válido, os controles positivos e negativos tiveram que produzir, respectivamente, altos e baixos sinais, respectivamente, sendo o limite de cMFI para indicação de positividade estabelecido em ≥ 3 (TANIUCHI et al., 2013). No projeto RECODISA foram identificadas 650

crianças diagnosticadas com EAEC, contudo após análises de triagem para prosseguir com a pesquisa foram utilizadas as 232 crianças que apresentavam ambos os genes de diagnóstico (LIMA et al. *Manuscrito em submissão*).

4.6 Avaliação dos dados clínicos da população infantil

Informações sobre as manifestações clínicas da doença diarreica foram coletadas durante a aplicação do questionário, o que inclui os seguintes sintomas e sinais:

- Febre confirmada pela medição de temperatura $\geq 37,8$ °C;
- Sintomas respiratórios que incluíam dor de garganta, secreção nasal, espirros ou tosse;
- A desidratação foi caracterizada como irritabilidade, aumento da sede, olhos encovados, redução da elasticidade e turgor da pele, letargia, apatia, diminuição da diurese e dificuldade da interação da mãe com a criança;
- Vômito e dor abdominal;
- Tempo de duração da diarreia e número de evacuações.

Ainda no contexto científico, as variáveis clínicas foram convertidas em escores que refletem a gravidade do desfecho da doença de acordo com Lee et al. (2016) (**TABELA 6**).

Tabela 6 – Sistema de escores para avaliação da gravidade da doença

Pontuação	Manifestações clínicas da diarreia			
	Número de dias de diarreia	Número de evacuações em 24 horas	Grau de desidratação	Febre
1	2-4	< 5	-	Reportado pela mãe
2	5-7	5-7	Moderada	-
3	≥ 8	>7	Severa	Temperatura confirmada $> 37,8^{\circ}\text{C}$

Fonte: Adaptado de Lee et al. (2016).

4.7 Avaliação do estado nutricional infantil

A avaliação da antropometria é um importante parâmetro de diagnóstico nutricional individual ou coletivo da população infantil (OMS, 2017b). A classificação do estado nutricional

foi indicada pelos índices peso-por-idade (*weight for age* – WAZ), peso-por-estatura (*weight for height* – WHZ), estatura-por-idade (*height for age* – HAZ), e índice de massa corporal (IMC)-por-idade (*Body mass index -for-age* – BAZ) calculados pelo software Anthro (OMS, 2011), a partir da conversão dos valores de idade, peso e altura, expressos em escores-z para avaliar o padrão de crescimento infantil (TABELA 7).

Tabela 7 – Classificação do estado nutricional de crianças menores de cinco anos de idade para os determinados índices antropométricos

Valores críticos de escores-z	Índices antropométricos			
	WAZ ¹	WHZ ²	HAZ ³	BAZ ⁴
< -3	Muito baixo peso para a idade	Desnutrição acentuada (<i>Severely wasted</i> ⁵)	Muito baixa estatura para a idade (<i>Severely stunted</i> ⁶)	Desnutrição acentuada (<i>Severely wasted</i>)
≥ -3 e < -2	Baixo peso para a idade	Desnutrição (<i>Wasted</i>)	Baixa estatura para a idade (<i>Stunted</i>)	Desnutrição (<i>Wasted</i>)
≥ -2 e < -1	Peso adequado para a idade	Eutrofia	Estatura adequada para a idade	Eutrofia
≥ -1 e ≤ +1		Risco de sobrepeso		Risco de sobrepeso
> +1 e ≤ +2	Peso elevado para a idade	Sobrepeso		Sobrepeso
> +2 e ≤ +3		Obesidade		Obesidade
> +3				

Fonte: Adaptado de BRASIL (2011) e OMS (2017b). Legenda: os índices de escores-z estudados foram peso-por-idade (*weight for age* – WAZ¹), peso-por-altura (*weight for height* – WHZ²), estatura-por-idade (*height for age* – HAZ³), e índice de massa corporal (IMC)-por-idade (*Body mass index -for-age* – BAZ⁴) calculados pelo software Anthro 2007 a partir da conversão dos dados de idade, peso, altura e índice de massa corporal. De acordo com a OMS (2017) – *Wasting*⁵ é a deficiência no crescimento infantil como resultado da rápida recente perda de peso ou da falha em ganhar peso (desnutrição aguda), pode ser medido pelos índices de peso-por-altura e de massa corporal (IMC)-por-idade escores-z (WHZ e BAZ). *Stunting*⁶ é a falha no desenvolvimento do crescimento infantil que ocorre em um lento processo acumulativo, resultante de nutrição inadequada e / ou infecções repetidas (desnutrição crônica) o que pode ser irreversível, é mensurado pelo índice de altura por idade escore-z (HAZ).

O software Anthro é disponível gratuitamente no site Organização Mundial de Saúde (2011), possibilitando o cálculo do escore-z que representa a diferença do valor aferido individual em relação ao valor de referência da população específica, normalizada pelo desvio-padrão da população de referência como visto na **Figura 6**.

Figura 6 – Fórmula do cálculo do escore-z para avaliar o estado nutricional da população infantil

$$\text{Escore-z} = \frac{(\text{valor observado}) - (\text{valor da mediana de referência})}{\text{Desvio-padrão da população de referência}}$$

Fonte: BRASIL (2011) e OMS (2011).

4.8 Dosagem de mieloperoxidase fecal

A mieloperoxidase é um importante biomarcador, o qual indica de forma indireta os níveis neutrofílicos fecais. Essa técnica está sendo utilizada em diversos estudos clínicos e em animais com a finalidade de avaliação do processo inflamatório (BARTELT et al., 2017, BOLL et al., 2017, HAVT et al., 2017; PRATA et al., 2016). Do total das 650 crianças identificadas com EAEC, foram testadas 231 amostras: 172 casos e 177 controles.

Resumidamente, as amostras fecais foram descongeladas, em temperatura ambiental, e diluídas na proporção de 1:7, em tampão inibidor de protease (RIPA). Em seguida, foram homogeneizadas e centrifugadas, sendo o sobrenadante utilizado para dosar mieloperoxidase fecal. Para ensaio, foi utilizado o teste imunoenzimático do kit comercial *R&D systems, Inc.* (Minneapolis, MN), de acordo com o manual do fabricante. As leituras das medidas de absorção foi realizada pelo *Epoch plate reader, Bio-tek Instruments, Inc.* (Winooski, VT).

4.9 Pesquisa de genes codificadores de fatores de virulência

O presente estudo realizou a pesquisa de 27 genes relacionados à codificação de fatores de virulência (GRVs) na subpopulação de amostras identificadas com os dois alvos de diagnóstico da EAEC (codificador da ilha de ativação do regulador transcricional- *aaiC* e transportador de proteína anti-agregação -*aatA*), com o intuito de avaliar a influência do GRVs com o fenótipo da doença.

A sequência dos iniciadores (*primers*), tamanho de produtos, temperatura de anelamento (°C) e concentração dos *primers* (pmol/μL) dos seguintes genes relacionados à codificação de fatores de virulência, tais como: adesão (*aggA*, *aafA*, *aafC*, *agg3A*, *agg3/4C*, *agg4A*, *agg5A*, *aap* e *air*), citotoxinas (*sat*, *pet*, *sigA*, *espC* e *espP*), enterotoxinas (*astA*),

imunomoduladores (*pic*, *tsh*, *vat*, *sepA*, *eatA*, *espL* e *eshiA*) e reguladores (*aggR*, *aar*, *eilA* e *orf3*), transferase (*capU*) estão dispostos nas **Tabelas 8, 9 e 10**.

Os painéis de PCR-*multiplex*, 1 a 5 foram descritos em prévio estudo de Boinsen et al. (2012). Além disso, o painel de PCR-*multiplex* 6 e o *uniplex* (*espP*) foram desenvolvidos por nosso grupo, no qual os iniciadores de DNA aqui utilizados foram desenhados com base nas seqüências de DNA dos genes investigados descritos, obtidas no sítio eletrônico do National Center for Biotechnology Information (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando a ferramenta OligoPerfect™ Designer (Thermo Fischer Scientific) e, então, sintetizados pela Invitrogen (São Paulo, Brasil).

Todas as reações de amplificação de DNA citadas foram realizadas com a enzima *Master Mix PCR Multiplex Platinum®* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), com o seguinte protocolo: (1) 2 minutos de desnaturação inicial a 95°C, (2) com 40 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 95°C e 90 segundos de anelamento com a temperatura adequada para cada painel de reação e 60 segundos de extensão 72°C e (3) extensão final de 10 minutos por 72°C, utilizando equipamento *MyCycler™ thermal cycler* (BioRad Laboratories, Hercules, CA).

A separação dos produtos foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 2% e marcada com corante de brometo de etídio (0,5µg/ mL) por aproximadamente 15 min. Após a corrida eletroforética os produtos de DNA foram visualizados e fotografados no transiluminador (*ChemiDoc XRS, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA*).

Em cada ensaio, cepas padrões de *E. coli* foram utilizadas como controle positivo para a detecção dos alvos genéticos: EAEC JM221 (identificação dos genes *aggA* e *sat*), EAEC 042 (genes *aggR*, *aap*, ORF3, *pic*, *pet*, *astA*, *aafA*, *aafC*, *air*, *capU* e *eilA*), EAEC 55989 (genes *agg3A* e *agg3/4C*), EAEC H223-1 (gene *sigA*), EAEC C1010-00 (genes *agg4A*, *agg3/4C*, *sat* e *sepA*) (BOISEN et al., 2012), EPEC e234/69 (genes *espC*, *espL* e *espP*), APEC 212A (genes *vat* e *tsh*) e ETEC H10407 (gene *eatA*) e *agg5A* foi identificado entre as amostras.

Para a obtenção do DNA dos controles positivos de cada reação, as cepas de *E. coli* foram semeadas em ágar MacConkey e incubadas a 37°C por 24 horas, em estufa bacteriológica, seguida da extração de DNA das cepas, pelo método de ebulição em solução de Triton-X a 0,5%, de acordo como descrito em Houpt et al. (2014). Enquanto a água livre de nuclease foi empregada como controle negativo em todas as reações.

Tabela 8 – Descrição dos iniciadores de genes de virulência utilizados nos protocolos de reações múltiplas de polimerase em cadeia 1 e 2, indicando a sequência, o número de acesso do GenBank e tamanho dos produtos obtidos

Descrição dos genes alvos (Número de acesso do GenBank)	Sequência dos primers (5'→3')	Produto (bp)	Temperatura de anelamento/ concentração do primer (°C, pmol/μL)
<i>Multiplex 1</i>			
<i>astA</i> – toxina termoestável A da EAEC, EAST1 (L11241)	ATGCCATCAACACAGTATATGCGAGT GACGGCTTTGTAGT	110	57/10
<i>pet</i> – toxina codificada por plasmídeo (AF056581)	GGCACAGAATAAAGGGGTGT TTCCTCTTGTTCCACGACATAC	302	57/10
<i>sigA</i> – protease homóloga da <i>Shigella IgA-like</i> (NC_004337)	CCGACTTCTCACTTTCTCCCG CCATCCAGCTGCATAGTGTGTTG	430	57/10
<i>pic</i> – proteína envolvida em colonização (AF097644)	ACTGGATCTTAAGGCTCAGGA TGACTTAATGTCACTGTTCAGCG	572	57/10
<i>sat</i> – toxina autotransportadora secretada (AE014075)	TCAGAAGCTCAGCGAATCAT TGCCATTATCACCAGTAAACGCACC	932	57/20
<i>Multiplex 2</i>			
<i>orf3</i> – codifica proteína críptica (FN554767.1)	CAGCAACCATCGCATTTCTA CGCATCTTTCAATACCTCCA	121	57/10.
<i>aap</i> – proteína antiagregativa, Dispersina (Z32523)	GGACCCGTCCCAATGTATAA CCATTCGGTTAGAGCACGAT	250	57/10
<i>agg3A</i> – subunidade da fímbria AAF/III* (AF411067)	CCAGTTATTACAGGGTAACA AGGAATTGGTCTGGAATAACAACCT GAACG	370	57/20
<i>sepA</i> – protease extracelular da <i>Shigella</i> (Z48219)	GCAGTGGAATATGATGCGGC TTGTTTCAGATCGGAGAAGAACG	794	57/20

Fonte: Boisen et al. (2012). Legenda: * Os primers AAF/III foram desenhados para a amplificar a região codificadora da área *usher* da proteína da fímbria.

Tabela 9 – Descrição dos iniciadores de genes de virulência utilizados nos protocolos de reação de polimerase em cadeia múltipla 3 e 4, indicando a sequência, o número de acesso do GenBank e tamanho dos produtos obtidos

Descrição dos genes alvos (Número de acesso do GenBank)	Sequência dos primers (5'→3')	Produto (bp)	Temperatura de anelamento / concentração do primer (°C, pmol/μL)
Multiplex 3			
<i>eilA</i> – homólogo <i>HilA</i> de <i>Salmonella</i> (FN554766.1)	AGGTCTGGAGCGCGAGTGTT GTAAAACGGTATCCACGACC	130	57/20
<i>aafA</i> – subunidade da fímbria AAF/II (AF012835)	CTACTTTATTATCAAGTGGAGCCGCTA GGAGAGGCCAGAGTGAATCCTG	289	57/10
<i>agg3/4C*</i> – <i>Usher</i> , unidade estrutural da AAF/III-IV (AF411067, AB255435, EU637023)	TTCTCAGTAACTGGACACGCAATTTA ATTGGTTACGCAATCGCAATTCTGACC AAATGTTTACCTTCAATATG	409	57/20
<i>aafC</i> – <i>Usher</i> , unidade estrutural da AAF/II (AF114828)	ACAGCCTGCGGTCAAAAAGCG CTTACGGGTACGAGTTTTACGG	491	57/10 .
Multiplex 4			
<i>aar</i> – (<i>chamada antes de orf61</i>) - regulador negativo do <i>aggR</i> (FN554767.1)	AGCTCTGGAAACTGGCCTCT AACCGTCCTGATTTCTGCTT	108	57/10
<i>aggA</i> – subunidade da fímbria AAF/I (Y18149, AY344586)	TCTATCTRGGGGGGCTAACGCTACCTG TTCCCCATAACCAGACC	220	57/20 .
<i>capU</i> – homóloga à hexosiltransferase (AF134403)	CAGGCTGTTGCTCAAATGAA GTTTCGACATCCTTCTGCTC	395	57/10
<i>air</i> – proteína repetida da imunoglobulina enteroagregativa (FN554766.1)	TTATCCTGGTCTGTCTCAAT GGTTAAATCGCTGGTTTCTT	600	57/10

Fonte: Boisen et al. (2012). Legenda: * Para amplificação do *agg3/4C* foram utilizados dois primer sensos e um antisenso.

Tabela 10 – Descrição dos iniciadores de genes de virulência utilizados nos protocolos de reação de polimerase em cadeia múltipla 5 e 6, indicando a sequência, o número de acesso do GenBank e tamanho dos produtos obtidos.

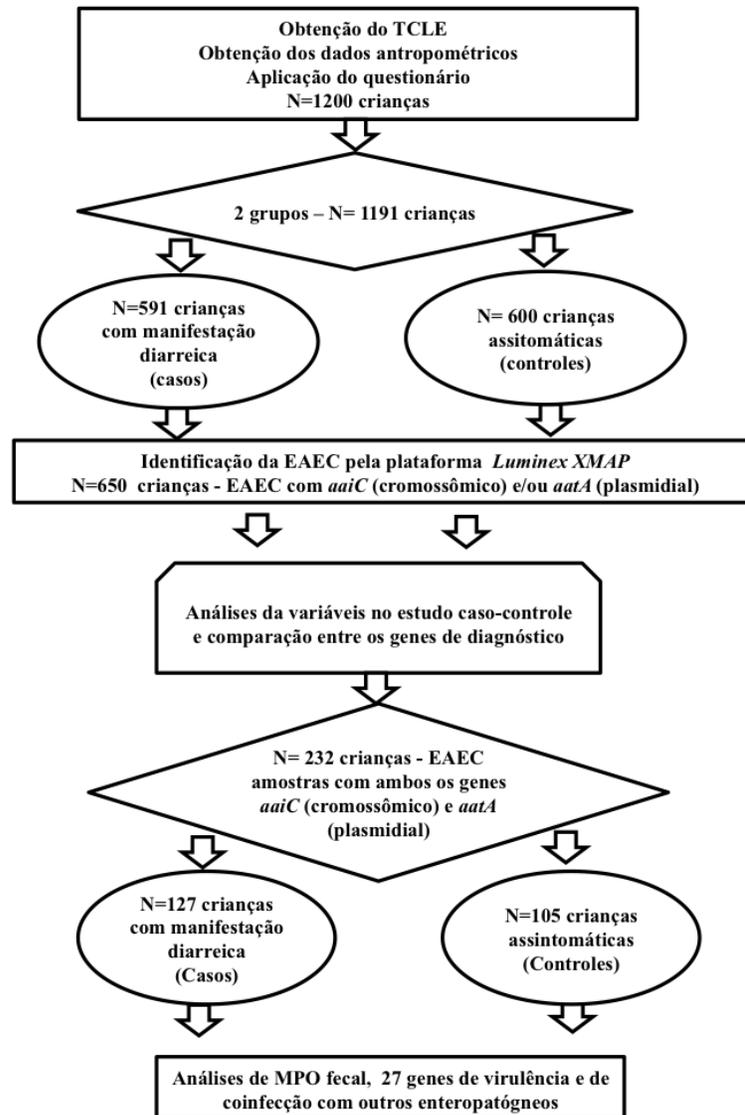
Descrição dos genes alvos (Número de acesso do GenBank)	Sequência dos primers (5'→3')	Produto (bp)	Temperatura de anelamento / concentração do primer (°C, pmol/μL)	Referência
<i>Multiplex 5</i>				
<i>agg4A</i> – subunidade da fímbria AAF/IV (EU637023)	TGAGTTGTGGGGCTAYCTGGA CACCATAAGCCGCCAAATAAGC	169	57/10	Boisen et al. (2012)
<i>shiA</i> – supressor inflamatório <i>shiA-like</i> (ECB_03517)	CAGAATGCCCCGCGTAAGGC CACTGAAGGCTCGCTCATGATCGCC G	292	57/10	Boisen et al. (2012)
<i>aggR</i> – regulador transcricional (Z18751)	GCAATCAGATTAARCAGCGATACA CATTCTTGATTGCATAAGGATCTGG	426	57/10	Boisen et al. (2012)
<i>Multiplex 6</i>				
<i>eatA</i> – proteína autotransportadora de <i>E. coli</i> enterotoxigênica (AY163491.2)	CTGAATCAACGCCCTGATGA CCGCCTCTATATCCCCATGA	137	61/10	Este estudo
<i>tsh</i> –hemaglutinina sensível à temperatura (JX466850.1)	GGGAGAATTTGTTCGGTACGC CAGATATGCGCCAGCCACT	286	61/10	Este estudo
<i>agg5A</i> – subunidade da fímbria AAF/V (KP202151.1)	CATTGCGAGTCTGGTATTCAGC GTTTGTGCGGGAGTTCCTTT	420	61/10	Este estudo
<i>espC</i> – codificador da enterotoxina EspC (U69128.1)	CCGGATGACGAATGGAGATT TGAGACCACCAGAGCCAATG	650	61/10	Este estudo
<i>espL</i> – <i>Escherichia coli</i> secretora de protease (FM180568.1)	CCAGCTTCAGAGGAAAGACAGC ATGCCGCTTGATACCCTTTC	854	61/10	Este estudo
<i>vat</i> – toxina autotransportadora de vacuolizante (AY151282.1)	GGGAGAACAGGACGTTTCAGC GTGCGCTGACCAGTGGAATA	1100	61/10	Este estudo
<i>Uniplex</i>				
<i>espP</i> – serina protease extracelular (NC_002128.1)	TGTTGTTGAGACCCGAGGTG GCCCCTGACATATCCACGTT	471	61/2	Este estudo

Legenda: *Os primers IV foram desenhados para a amplificar a região codificadora da área *usher* da proteína da fímbria.

4.10 Fluxograma da população e amostras utilizadas no estudo

A **Figura 7** mostra o resumo do fluxograma da população das crianças e amostras utilizadas. Do estudo original, do qual participaram 1.191 crianças, 650 amostras foram identificadas como EAEC (LIMA et al. *Manuscrito em submissão*). Na busca de avaliação do *screening* de fatores vinculados à diarreia ou sua ausência, 232 foram analisadas para os GRVs, inflamação e coinfeção.

Figura 7 –Fluxograma da população e das amostras utilizadas.



Fonte: próprio autor. Legenda: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, *Escherichia coli* enteroagregativa – EAEC e mieloperoxidase – MPO.

4.11 Análise estatística dos dados

As análises dos dados foram realizadas pelo uso do programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 21 (Chicago, US). Para avaliar as associações entre as variáveis do estudo transversal, foram realizadas análises do tipo caso-controle relacionando a identificação dos genes de virulência com a presença (casos) e a ausência (controles) de diarreia, juntamente com manifestações clínicas, em modelo de análises bivariadas calculados pelo teste exato do Qui-quadrado (X^2) ou *Fisher*, bem como medidas de força de associação razão de chances (*odds ratio*; OR) e intervalo de confiança (IC) de 95%. Em relação as análises das variáveis contínuas (por exemplo, número de dias de diarreia, número de evacuações por dia, níveis de mieloperoxidase etc), foram utilizados a média e o erro padrão, por meio dos testes T de *Student* (variação normal do dados) ou Mann-Whitney (não apresentam variação normal dos dados).

Para análises de múltiplas variáveis que poderiam servir como preditores da virulência e da copatogênese atrelados ao desenvolvimento da presença ou da ausência das manifestações clínicas (por exemplo, diarreia, febre, desidratação etc.), tais dados foram transformados em valores binários que foram aplicados à técnica de regressão logística multivariada utilizado o programa *Classification and Regression Trees* (*CART software*, versão 7.0; Salford Systems, San Diego, CA).

Para o fator combinatório entre os genes de virulência, avaliou-se as diferenças dos GRVs entre a presença ou ausência das manifestações clínicas (por exemplo, diarreia, febre, desidratação etc.), utilizando o programa *Classification and Regression Trees* (*CART software*, versão 7.0; Salford Systems, San Diego, CA), que realiza a análise multivariada, baseada em árvores de decisão, podendo ser usado como uma ferramenta gráfica, para demonstrar possíveis eventos (ANDERSON, 2007). *P*-valores de $\leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da frequência da *Escherichia coli* enteroagregativa em crianças com e sem diarreia residentes no Semiárido brasileiro

Do total de crianças avaliadas originalmente no estudo RECODISA, 650 (54,5%) foram diagnosticadas com a EAEC, que por sua vez, apresentou correlação com o processo diarreico (TABELA 11). Assim, na avaliação da frequência de EAEC de cada cidade do Semiárido brasileiro observa-se que Patos, localizado no estado da Paraíba (PB), apresentou o maior percentual de detecção dessa bactéria (97%). Contudo, apenas as cidades de Crato, localizada no estado do Ceará – CE (49% vs. 34%; P=0,0442; OR= 1,865; 95%IC=1,055-3,298) e de Ouricuri – no estado de Pernambuco – PE (38% vs. 14,1%; P=0,0002; OR=3,721; 95%IC=1,857-7,455) foram correlacionados aos casos, quando comparado com os controles (TABELA 11).

Tabela 11 – Frequência da *Escherichia coli* enteroagregativa entre as crianças com a presença (casos) e a ausência (controles) de diarreia nas seis cidades do Semiárido brasileiro

Cidades	Total Nº pos/Nº total (%)	Presença de Diarreia Nº pos/Nº total (%)	Ausência de Diarreia Nº pos/Nº total (%)	P value*	OR	95%IC
Crato (CE)	83/200 (41,5)	49/100 (49)	34/100 (34)	0,0442*	1,865	1,055 - 3,298
Ouricuri (PE)	52/199 (26,1)	38/100 (38)	14/99 (14,1)	0,0002*	3,721	1,857 - 7,455
Cajazeiras (PB)	68/200 (34)	38/100 (38)	30/100 (30)	0,2961	1,430	0,7941 - 2,576
Picos (PI)	92/200 (46)	43/94 (44,3)	49/103 (47,6)	0,6722	0,8776	0,5028 - 1,532
Sousa (PB)	161/192 (83,9)	83/94 (88,3)	78/98 (79,6)	0,1185	1,935	0,8709 - 4,298
Patos (PB)	194/200 (97)	99/100 (99)	95/100 (95)	0,211	5,211	0,5973 - 45,45
Total	650/1191 (54,6)	350/591 (59,2)	300/600 (50)	0,0017*	1,452	1,155 - 1,826

Fonte: Próprio autor. Legenda: ¹CE – Ceará, ²PE – Pernambuco, ³PI – Piauí, ⁴PB – Paraíba. Associações significantes (P<0.05*) de EAEC entre os grupos casos e controles realizados em cada localidade do estudo, após os teste Chi-squared, Fisher's exact e odds ratio (OR), estão marcados em negritos.

Para selecionar as amostras identificadas com a EAEC que seriam utilizadas nas análises de perfil de genes de virulência (GRVs) e das coinfeções, foram realizadas avaliações combinatórias dos dois marcadores genéticos de diagnóstico: (1) apenas o gene cromossomal – *aaiC*, (2) apenas o gene plasmidial – *aatA*, (3) ambos os genes e (4) os genes *aaiC* e/ou *aatA*

(TABELA 12). Entre essas combinações não se observaram diferenças significativas associadas à gravidade da doença e à inflamação (TABELA 12). Portanto, uma amostragem representativa de 232 crianças diagnosticadas com EAEC na presença simultânea de ambos os genes foram escolhidas para a continuidade do estudo.

Tabela 12 – Avaliação da combinação dos alvos genéticos de diagnóstico molecular da *Escherichia coli* enteroagregativa no impacto nos determinantes inflamatórios e na gravidade das doenças diarreicas

Aspectos da doença diarreica	Alvos genéticos			
	Positivo somente para o gene <i>aaiC</i> ¹ N=376	Positivo somente para o gene <i>aatA</i> ² N=42	Os dois genes simultaneamente presentes N=232	Positivo para os genes N=650
Presença nos casos (Nº, %)	198 (52,6)	25 (59,5)	127 (54,7)	350 (53,8)
Gravidade da doença ³ (Média ± E.P.M ⁴)	4,515 ± 0,1720	3,880 ± 0,3844	4,857 ± 0,2230	4,593 ± 0,1299
Mieloperoxidase Fecal (Média ± E.P.M; ng/mL)	12377±1945	10591± 4613	11117±2267	11869±1432

Fonte: Próprio autor. Legenda: 1 – codificador da ilha de ativação do regulador transcricional (*aaiC*); 2 – transportador de proteína de anti-agregação (*aatA*); 3 – A gravidade da doença foi avaliada de acordo com a adaptação dos escores do projeto MAL-ED; 4 – Erro padrão da média (E.P.M).

5.2 Detalhamento da população infantil, com foco nas crianças diagnosticadas com a *Escherichia coli* enteroagregativa, quanto aos dados: demográficos, socioeconômicos, ambientais, clínicos e nutricionais

Características da população infantil e materna do estudo estão dispostas na **Tabela 13**. A faixa etária infantil apresentava uma média de idade de 16,7 meses (variando de 2,2 a 35,7 meses). Com os casos, foram associados as crianças com a idade igual ou abaixo a 6 meses (primeira infância) que estavam em amamentação (22% vs. 1%; P=0,0001; OR=21,79; IC95%=2,883 – 164,7) e, com mães incluídas na faixa de idade de 14 a 25 anos (59,1% vs. 43,8%; P= 0,0249; 95%IC=1,096 – 3,122). Além disso, das 31 crianças que se encontravam na primeira infância, apenas 29% (9/31) estavam em aleitamento materno exclusivo e, entre os casos, 53,9% (14/26) relataram amamentação não-exclusiva, quer dizer, com introdução de

outros alimentos, inclusive industrializados, além de água, em adição ao aleitamento materno. Quanto aos controles, houve uma significativa associação com as crianças que apresentavam idade acima de 24 meses, das quais 33,3% (12/36) já se encontravam em aleitamento não-exclusivo (2,4% vs. 11,4%; $P=0,0065$; $OR=0,1875$; $95\%IC=0,0514 - 0,683$).

Tabela 13 – Características da população infantil estudada, incluindo sexo, idade, estado de amamentação e informações maternas relacionadas com a presença (casos) e a ausência (controles) de diarreia em infecção pela *Escherichia coli* enteroagregativa

Características da população	Total N= 232 (Nº, %)	Presença de Diarreia N=127 (Nº, %)	Ausência de Diarreia N=105 (Nº, %)	P value*	OR	95%IC
Dados da população infantil						
Sexo						
Masculino	132 (56,9)	73 (57,5)	59 (56,2)	0,8943	1,054	0,6253 – 1,776
Feminino	100 (43,1)	54 (42,5)	46 (43,8)			
Idade (meses)						
0 – 6	31 (13,4)	26 (20,5)	5 (4,8)	0,0004*	5,149	1,901 – 13,95
6.1 – 12	60 (25,9)	28 (22)	32 (30,5)	0,1754	0,6452	0,3574 – 1,165
12.1 – 24	78 (33,6)	46 (36,2)	32 (30,5)	0,4031	1,296	0,7466 – 2,248
> 24	63 (27,2)	27 (21,3)	36 (34,6)	0,0374*	0,5175	0,2881 – 0,929
Aleitamento materno¹ (por idade - meses)						
0 – 6	23 (9,9)	22 (17,3)	1 (1)	<0,0001*	21,79	2,883 – 164,7
6.1 – 12	39 (16,8)	21 (16,5)	18 (17,1)	1,000	0,9575	0,48 – 1,91
12.1 – 24	36 (15,5)	24 (18,9)	12 (11,4)	0,14561	1,806	0,855 – 3,814
> 24	15 (6,5)	3 (2,4)	12 (11,4)	0,0065*	0,1875	0,0514 – 0,683
Total	113 (48,7)	70 (55,1)	43 (41)			
Dados da mãe						
Anos de escolaridade materna						
0	8 (3,4)	5 (3,9)	3 (2,9)	0,7319	1,393	0,325 – 5,974
1 – 5	105 (45,3)	55 (43,3)	50 (47,6)	0,5962	0,8403	0,499 – 1,413
5.1 – 9	111 (47,8)	63 (49,6)	48 (45,7)	0,5984	1,169	0,696 – 1,963
> 9.1	8 (3,4)	4 (3,1)	4 (3,8)	1,000	0,8211	0,2-3,367
Idade materna (anos)						
≥14 ≤ 25	121 (52,2)	75 (59,1)	46 (43,8)	0,0249*	1,850	1,096 – 3,122
> 25	111 (47,8)	52 (40,9)	59 (56,2)			

Fonte: Próprio autor. Legenda:1- Estratificação por idade (meses) em crianças que estão em aleitamento materno exclusivo e não-exclusivo; Associações significantes entre os casos e controles após o teste Qui-Quadrado, teste exato de Fisher e *odds ratio* (OR) * $P<0.05$ estão marcados em negrito.

As informações das condições socioeconômicas e higiênico-sanitárias da população infantil estudada estão sumarizadas na **Tabela 14** que evidencia a correlação das crianças com

infecção assintomática e a origem de outras fontes de água para beber (P=0,0121), referente ao uso de água de açude ou rio, carro pipa, cisterna, cacimba, entre outros.

Tabela 14 – Características das condições socioeconômicas e higiênico-sanitárias da população infantil estudada entre crianças com a presença (casos) e a ausência (controles) de diarreia diagnosticadas com a *Escherichia coli* enteroagregativa do Semiárido brasileiro, Nordeste.

Condições socioeconômicas e higiênico-sanitárias	Total N= 232	Presença de Diarreia N=127	Ausência de Diarreia N=105	P value*	OR	95%IC
Renda familiar (em salários mínimos - R\$¹) (Nº, %)						
≤ 500	60 (25,9)	33 (26)	27 (25,7)	1,000	1,014	0,561 – 1,831
>500 ≤ 1000	121 (52,2)	66 (52)	55 (52,4)	1,000	0,983	0,586– 1,651
>1000 ≤1500	41 (17,7)	22 (17,3)	19 (18,1)	1,000	0,948	0,481 – 1,866
≥1251	9 (3,9)	6 (4,7)	3 (2,9)	0,5174	1,686	0,411 – 6,913
Não respondeu	1 (0,4)	0	1 (1)			
Número de cômodos (Média ±E.P.M²)						
	4,80 ± 0,113	4,68 ± 0,147	4,95 ± 0,175	0,5339	-	-
Número de residentes (Média ±E.P.M)						
	4,47 ± 0,102	4,41 ± 0,143	4,54 ± 0,146	0,2825	-	-
Variáveis de Higiene e Sanitário (Nº, %)						
Fossa	167 (72)	89 (70,1)	78 (74,3)	0,5573	0,8107	0,454 – 1,447
Sem sistema de esgoto	14 (6)	9 (7,1)	5 (4,8)	0,5835	1,525	0,495 – 4,701
Esgoto público	51 (22)	29 (22,8)	22 (21)	0,7527	1,116	0,596 – 2,089
Sanitário dentro de casa (Nº, %)						
Sim	213 (91,8)	116 (91,3)	97 (92,4)	0,8146	0,869	0,336– 2,249
Não	59 (25,4)	11 (8,7)	8 (7,6)			
Água Corrente no Banheiro (Nº, %)						
Sim	137 (59,1)	72 (56,7)	65 (61,9)	0,5026	0,805	0,475– 1,366
Não	95 (40,9)	55 (43,3)	40 (38,1)			
Origem da água (Nº, %)						
Água encanada	218 (94)	121 (95,3)	97 (92,4)	0,05178	0,0977	0,058 – 1,231
Poço profundo	4 (1,7)	3 (2,4)	1 (1)	1,000	1,362	0,14 – 13,26
Outra fontes ³	10 (4,3)	3 (2,4)	7 (6,7)	0,0121*	0,1834	0,0465 – 0,724

Fonte: Próprio autor. Legenda: Associações significantes após o teste Qui-Quadrado, teste exato de Fisher e *odds ratio* (OR) *P<0.05 estão marcados em negritos. 1 – No período do estudo o salário mínimo era referente a 500 reais; 2 – EPM: Erro da média padrão. 3 –A origem de outras fontes de água para beber é referente ao uso de água de açude ou rio, carro pipa, cisterna, cacimba, entre outros.

Considerando as análises de antropometria infantil (**TABELA 15**), os casos apresentaram menores médias significantes relativas à idade ([Média ± EPM]; 15,4 ± 0,842 vs.

18,24 ± 0,907; P=0,0187) e a altura (75,24 ± 0,957 vs. 78,6 ± 0,925; P=0,0271) em comparação aos controles. Embora, na conversão de normalização dos valores antropométricos em índices de escores-z, um menor valor do índice de peso-por-altura (WHZ) foi correlacionado estatisticamente aos controles (0,8978 ± 0,128 vs. 0,5508 ± 0,147; P=0,0331).

Alem disso, as médias gerais da população infantil referentes aos índices de escores-z não indicaram desnutrição ou obesidade, visto que apenas 3,5% das crianças apresentavam desnutrição (WHZ <-2 escores-z), e 16,4% exibiam evidências de sobrepeso ou obesidade, representado pelo aumento do índice de massa corpórea-por-idade (BAZ>2).

Tabela 15 – Características dos dados antropométricos na população infantil estudada entre crianças com a presença (casos) e a ausência (controles) de diarreia na infecção pela *Escherichia coli* enteroagregativa na população infantil do Semiárido brasileiro, Nordeste.

Dados Antropométricos	Total N= 232 (Média ± EPM)	Presença de Diarreia N=127 (Média ± EPM)	Ausência de Diarreia N=105 (Média ± EPM)	P value*
Idade (meses)	16,69 ± 0,623	15,4 ± 0,842	18,24 ± 0,907	0,0187*
Altura(cm)	76,76 ± 0,678	75,24 ± 0,957	78,6 ± 0,925	0,0271*
Peso(kg)	10,43 ± 0,166	10,2 ± 0,231	10,71 ± 0,236	0,1053
Circunferência da cabeça (cm)	46,31 ± 0,212	45,92 ± 0,306	46,77 ± 0,284	0,1015
WHZ ¹	0,7393 ± 0,097	0,8978 ± 0,128	0,5508 ± 0,147	0,0331*
HAZ ²	-0,6515 ± 0,106	-0,6998 ± 0,149	-0,593 ± 0,15	0,4558
WAZ ³	0,1829 ± 0,084	0,2617 ± 0,106	-0,0882 ± 0,133	0,3974
BAZ ⁴	0,8101 ± 0,102	0,9645 ± 0,141	0,6249 ± 0,145	0,0778
HCZ ⁵	0,3884 ± 0,092	0,41 ± 0,127	0,3624 ± 0,133	0,9063

Fonte: Próprio autor. Legenda: EPM - Erro padrão da média. Os escores-z peso-por-altura (WHZ)¹, altura-por-idade (HAZ)², peso-por-idade (WAZ)³, IMC-por-idade (BAZ)⁴ e circunferência da cabeça (HCZ)⁵. Associações significantes de EAEC entre os grupos casos e controles após os testes T ou Mann-Whitney, *P<0.05 estão marcados em negritos.

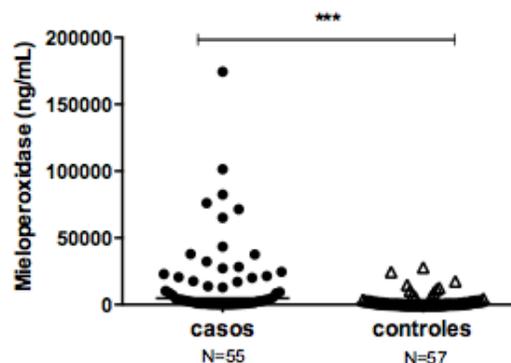
A respeito dos aspectos clínicos da diarreia aguda desenvolvidos na população infantil estudada estão dispostos na **Tabela 16**. Entre os principais sintomas que foram relatados estão a desidratação (47,2%), a febre (40,9%) e o vômito (36,2%). A média total dos escores de gravidade da doença foi de 4,5, variado de 1 a 10. Em relação ao processo inflamatório pode ser visualizado na **Figura 8**, onde se mostra o aumento significativo inflamatório nos casos (P<0,0001) em comparação aos controles, indicado pela quantificação de mieloperoxidase fecal (MPO).

Tabela 16 – Frequência dos parâmetros clínicos e aspectos comportamentais relatados da população de crianças com manifestação diarreica (casos) durante a infecção pela *Escherichia coli* enteroagregativa na região do Semiárido brasileiro, Nordeste.

Dados clínicos	Presença de Diarreia N=127 (%)	Média ± E.P.M	Varição (mín.- máx.; mediana)
Sinais			
Dias de duração de diarreia	-	4,429 ± 0,123	4-8; 4
Número de evacuações por dia	-	4,587 ± 0,071	4-7; 4
Evento de diarreia nos últimos 14 dias	125 (98,4)	-	-
Muco nas fezes	4 (3,1)	-	-
Sangue nas fezes	0	-	-
Sintomas			
Desidratação	60 (47,2)	-	-
Febre ($\geq 37,3$ °C)	52 (40,9)	37,7 ± 0,062	37,2-39,2; 37,6
Vômitos	46 (36,2)	-	-
Dor abdominal	12 (9,4)	-	-
Sintomas respiratórios	20 (15,7)	-	-
Aspectos Comportamentais			
Agitação	51 (40,2)	-	-
Fraqueza	30 (23,6)	-	-

Fonte: Próprio autor. Legenda: E.P.M - Erro padrão da média; mín.: mínimo; máx.: máximo.

Figura 8 – Avaliação do processo inflamatório por meio da quantificação mieloperoxidase fecal entre as crianças com a presença (casos) e a ausência (controles) de diarreia em infecção pela *Escherichia coli* enteroagregativa na população infantil do Semiárido brasileiro, Nordeste.

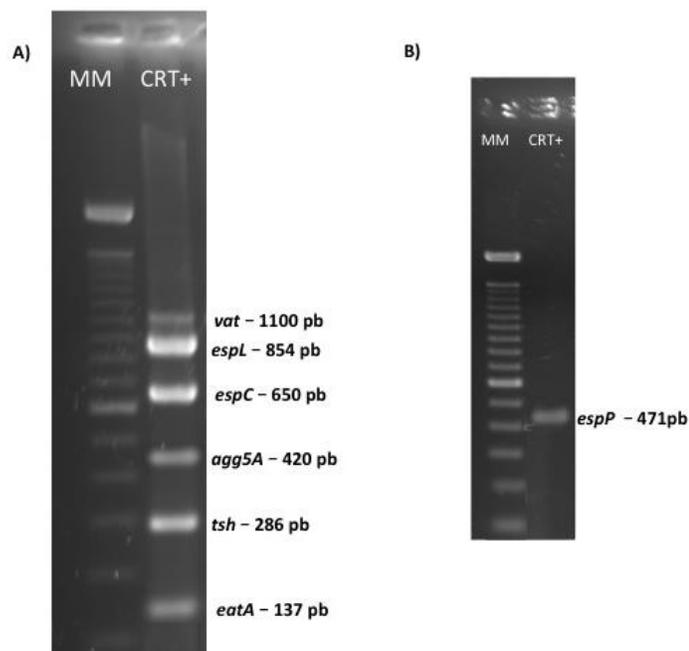


Fonte: Próprio autor. Legenda: MPO-mieloperoxidase fecal. * $P < 0,0001$ (***) mostra diferenças significativas nas análises com Mann-Whitney após a identificação da não normalidade dos dados.

5.3 Desenvolvimento de iniciadores para a identificação de genes relacionados à virulência da *Escherichia coli* enteroagregativa, mediante reações múltiplas em cadeia da polimerase

Além dos 20 iniciadores que compõem as cinco reações PCR múltiplas para a pesquisa de genes relacionados à virulência (GRVs) da EAEC já em estudo pelo nosso grupo de pesquisa. Foram desenvolvidos novos iniciadores para os testes de identificação de GRVs que foram testados previamente com seus respectivos controles positivos, mostrando especificidade, com fragmentos de DNA, formando bandas nítidas que contemplaram duas reações de PCR, uma múltipla e uma convencional, como podem ser visualizadas na **Figura 9**. As sequências dos iniciadores e protocolo das reações dos ensaios desenvolvidos estão descritos no item 4.10.

Figura 9 – Fotodocumentação de gel de agarose com os produtos de PCR representativa do teste de validação dos iniciadores com seus respectivos controles positivos



Fonte: Próprio autor. Legenda: MM - Marcador Molecular 100pb; CTR+ - Controle positivo; *vat* - toxina autotransportadora de vacuolizante; *espL* - *Escherichia coli* secretora de protease; *espC* - codificador da enterotoxina EspC; *agg5A* - subunidade da fimbria AAF/V; *tsh* - hemaglutinina sensível à temperatura; *eatA*- proteína autotransportadora de *E. coli* enterotoxigênica; *espP* - serina protease extracelular.

5.4 Análise da distribuição dos genes relacionados à codificação de fatores de virulência (GRVs) relacionados à gravidade da infecção pela *Escherichia coli* enteroagregativa diagnosticada em amostras fecais de crianças com e sem diarreia no Semiárido brasileiro

5.4.1 Frequência dos GRVs e suas combinações em relação as crianças com a presença e ausência de diarreia

As análises individuais e multivariadas dos 27 GRVs entre casos e controles estão sumarizadas na **Tabela 17**. O perfil geral da detecção dos GRVs obtido mostrou o *CapU*, um homólogo da hexosiltransferase, como o gene de maior prevalência 89,7% (208/232) nas amostras.

Em relação às categorias dos genes estudados, dentre os codificadores fímbricas, observa-se uma frequência de 62,1% (144/232), do gene *agg3/4C*, portador das variantes de unidades estruturais AAF/III-IV. O gene codificador de pilin fimbrial de maior frequência foi AAF/V, codificado por *agg5A*, com 32,3% (75/232), seguido por AAF/I, *aggA*, com 31% (72/232), AAF/IV, *agg4A*, com 26,3% (61/232), AAF/III, *aafC* com 24,6% (57/232), AAF/II, *aafA*, com 22,8% (53/232) e AAF/III, *agg3A*, com 8,2% (19/232). Ademais, apenas 23 amostras, isto é, 10% não apresentaram nenhum GRVs fimbrial.

Na classe das SPATES I, que abriga os genes codificadores de proteínas citotóxicas, o mais detectado foi a *sat* (toxina autotransportadora secretada) com um percentual de 58,2% (135/232), seguido de *espC* (codificador da enterotoxina EspC), com 42,2% (98/232), *pet* (toxina codificada por plasmídeo), com 37,9% (88/232), *espP* (serina protease extracelular), com 28,9% (67/232) e *sigA* (protease homóloga da *Shigella IgA-like*), com 25% (58/232).

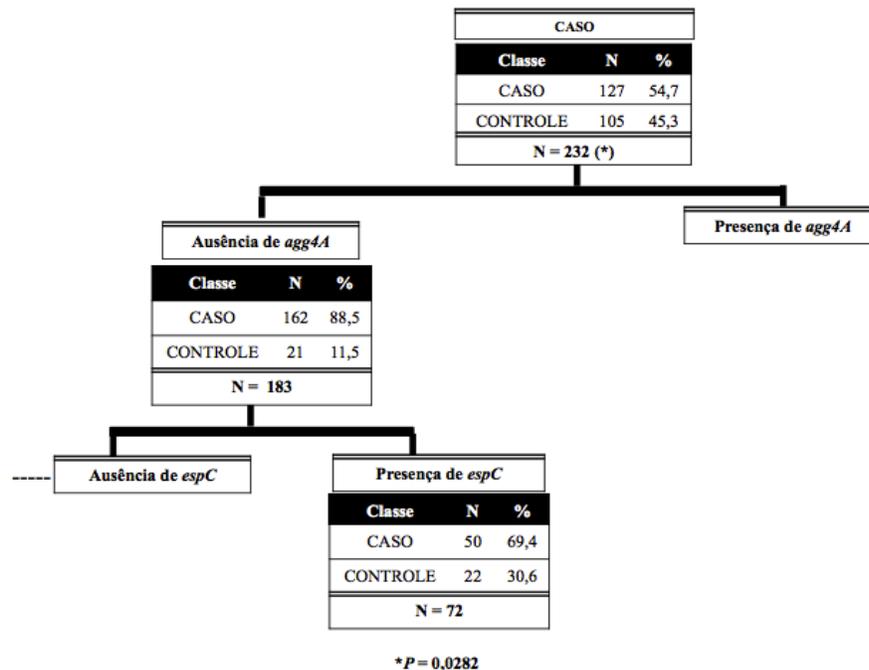
Considerando a classe das SPATES II, que abriga os GRVs com função imunomoduladoras, a proteína envolvida em colonização (*pic*), com 70,3% (163/232), apresentou a maior taxa de frequência, e a menor foi apresentada pela *sepA* (protease extracelular da *Shigella*), com 36,6% (85/323). Dessa forma, 26 (11,2%) amostras não apresentaram algum tipo de SPATE I ou II.

As análises bivariadas mostraram *espC* em significativa correlação com os casos (48,8% vs. 34,3%; P=0,0257; OR=1,828; 95%IC=1,07-3,11); enquanto *agg4A* (26,3% vs. 19,7%; P= 0,0119; OR=0,4698; 95%IC=0,26 - 0,85), associou-se ao controles.

Quando as variáveis foram ajustadas pela análise de regressão logística, observam-se diferenças significativas no *agg4A* que se mantém relacionados aos controles ($P=0,0085$; $OR=0,3841$; $IC95\% =0,18 - 0,78$), enquanto, o gene *pic* foi associado aos casos ($P=0,0329$; $OR=2,3929$; $IC95\% =1,07 - 5,33$).

Ademais, avaliações específicas das combinações genéticas analisadas pelo programa de *CART analysis*, revelaram como única associação significativa: a ausência do codificador da fímbria IV, *agg4A*, em combinação com a presença de *EspC* que apresentou relação com os casos ($P= 0,0282$; $OR= 2,054$; $95\%IC= 1.085 - 3.889$), sendo representada na **Figura 10**.

Figura 10 – Representação gráfica usando o método de classificação de árvore de decisão (*CART analysis*) que mostra a combinação da presença ou ausência dos genes de virulência da *Escherichia coli* enteroagregativa entre crianças com a presença (casos) e ausência (controles) da diarreia



Fonte: Próprio autor. Legenda: A presença ou ausência de cada gene entre os grupos casos e controles é indicada de acordo com as áreas terminais (nodos) da árvore. Cada ramo da árvore termina em um nó terminal definido pela presença ou ausência dos genes de virulência em que a análise estatística foi realizada. Para análise estatística foi utilizado o teste Qui-Quadrado, teste exato de Fisher e *odds ratio* (OR) ($*P<0,05$). Os ramos que terminaram em um nó terminal não estatístico não foram mostrados, mas representados por linhas tracejadas. No desfecho do algoritmo binário observou-se a associação significativa da ausência do gene da subunidade da fímbria AAF/IV (*agg4A*), com a presença do codificador da enterotoxina *EspC* (*espC*) com o grupo dos casos ($P= 0,0282$; $OR=2,054$; $95\%IC= 1.085 -3.889$).

Tabela 17 – Frequência dos genes de virulência da *Escherichia coli* enteroagregativa entre crianças com a presença (casos) e ausência (controles) da diarreia da região do Semiárido Brasileiro

Genes de virulência	Total N= 232 (%)	Casos N=127 (%)	Controles N=105 (%)	Análises Bivariadas ¹		Análises Multivariadas ²	
				P value	OR (95%IC)	P value	OR (95%IC)
Fimbrias							
<i>aggA</i> – subunidade da fímbria AAF/I	72 (31)	35 (27,6)	37 (35,2)	0,2541	0,699 (0,4 - 1,22)	0,5700	0,8018 (0,37 – 1,72)
<i>aafA</i> – subunidade da fímbria AAF/II	53 (22,8)	32 (25,2)	21 (20)	0,4324	1,347 (0,72 - 2,51)	0,1221	1,907 (0,84 – 4,32)
<i>aafC</i> – Usher, unidade estrutural da AAF/II	57 (24,6)	32 (25,2)	25 (23,8)	0,2443	1,078 (0,59 - 1,96)	0,5682	0,7948 (0,36 – 1,75)
<i>agg3A</i> – subunidade da fímbria AAF/III	19 (8,2)	11 (8,7)	8 (7,6)	0,7732	1,150 (0,44 - 2,97)	0,4763	1,4962 (0,45 – 4,53)
<i>agg3/4C</i> – Usher, unidade estrutural da AAF/III-IV	144 (62,1)	59 (46,5)	55 (52,4)	0,3690	0,788 (0,46 - 1,32)	0,43524	0,7789 (0,41 – 1,4)
<i>agg4A</i> – subunidade da fímbria AAF/IV	61 (26,3)	25 (19,7)	36 (34,3)	0,0119**	0,469 (0,26 - 0,85)	0,0085**	0,3841 (0,18 – 0,78)
<i>agg5A</i> – subunidade da fímbria AAF/V	75 (32,3)	39 (30,7)	36 (34,3)	0,5620	0,849 (0,49 - 1,47)	0,78327	0,9149 (0,48 – 1,72)
Classe das SPATEs I							
<i>sat</i> – toxina autotransportadora secretada	135 (58,2)	77 (60,6)	58 (55,2)	0,4072	1,248 (0,74 - 2,10)	0,3143	1,4065 (0,72 – 2,73)
<i>pet</i> – toxina codificada por plasmídeo	88 (37,9)	48 (37,8)	40 (38,1)	0,9626	0,987 (0,58 - 1,68)	0,4416	0,7665 (0,39 – 1,51)
<i>sigA</i> – protease homóloga da <i>Shigella</i> <i>IgA-like</i>	58 (25)	30 (23,6)	28 (26,7)	0,5940	0,850 (0,47 - 1,54)	0,7418	0,8850 (0,42 – 1,83)
<i>espC</i> – codificador da enterotoxina EspC	98 (42,2)	62 (48,8)	36 (34,3)	0,0257*	1,828 (1,07 - 3,11)	0,1685	1,5815 (0,82 – 3,03)
<i>espP</i> – serina protease extracelular	67 (28,9)	40 (31,5)	27 (25,7)	0,3334	1,328 (0,75 - 2,36)	0,8161	1,0896 (0,52 – 2,24)
Classe das SPATEs II							
<i>pic</i> – proteína envolvida em colonização	163 (70,3)	92 (72,4)	71 (67,6)	0,6396	1,259 (0,71 - 2,21)	0,0329*	2,3929 (1,07 – 5,33)
<i>tsh</i> – hemaglutinina sensível à temperatura	139 (59,9)	79 (62,2)	60 (57,1)	0,4336	1,234 (0,73 - 2,09)	0,2601	1,4257 (2,64 – 0,77)
<i>vat</i> – toxina autotransportadora de vacuolizante	96 (41,4)	51 (40,2)	45 (42,9)	0,6777	0,894 (0,53 - 1,51)	0,7793	0,9158 (0,49 – 1,69)
<i>sepA</i> – protease extracelular da <i>Shigella</i>	85 (36,6)	47 (37)	38 (36,2)	0,8977	1,036 (0,60 - 1,77)	0,6891	0,8736 (0,45 – 1,69)
<i>espL</i> – <i>Escherichia coli</i> secretora de protease	98 (41,8)	60 (47,2)	38 (36,2)	0,0898	1,579 (0,93 - 2,68)	0,2922	0,7144 (0,38 – 1,33)

Continuação Tabela 17 – Frequência dos genes de virulência da *Escherichia coli* enteroagregativa entre crianças com a presença (casos) e ausência (controles) da diarreia da região do Semiárido Brasileiro

Genes de virulência	Total N= 232 (%)	Casos N=127 (%)	Controles N=105 (%)	Análises Bivariadas ¹		Análises Multivariadas ²	
				P value	OR (95%IC)	P value	OR (95%IC)
Outros GRVs³							
<i>astA</i> – toxina termoestável A da EAEC, EAST1	159 (68,5)	90 (70,9)	69 (65,7)	0,4003	1,269 (0,73 - 2,21)	0,6589	1,1731 (2,38 –0,57)
<i>air</i> – proteína repetida da imunoglobulina enteroagregativa	183 (78,9)	101 (79,5)	82 (78,1)	0,7902	1,090 (0,58 - 2,05)	0,1397	1,9598 (0,80 – 4,78)
<i>capU</i> – homóloga à hexosiltransferase	208 (89,7)	110 (86,6)	98 (93,3)	0,0944	0,462 (0,18 - 1,16)	0,0612	0,2988 (0,08 – 1,05)
<i>eilA</i> – homólogo <i>HilA</i> de Salmonella	128 (55,2)	71 (55,9)	57 (54,3)	0,8050	1,068 (0,63 - 1,79)	0,9702	1,0121 (0,53 – 1,9)
<i>aar</i> – regulador negativo do <i>aggR</i>	148 (63,8)	76 (59,8)	72 (68,6)	0,1685	0,683 (0,39 - 1,17)	0,2049	0,5937 (0,26 – 1,33)
<i>shiA</i> – supressor inflamatório <i>shiA-like</i>	195 (84,1)	103 (81,1)	92 (87,6)	0,1772	0,606 (0,29 - 1,26)	0,1339	0,5189 (0,22 – 1,33)
<i>aap</i> – proteína antiagregativa, Dispersina	183 (78,9)	98 (77,2)	85 (81)	0,4818	0,795 (0,42 - 1,50)	0,84021	1,0946 (0,45 –2,63)
<i>orf3</i> – codifica proteína críptica	157 (67,7)	83 (65,4)	74 (70,5)	0,4064	0,790 (0,45 - 1,37)	0,4770	0,7543 (0,34 – 1,64)
<i>aggR</i> – regulador transcricional	190 (15,95)	102 (17,25)	88 (14,66)	0,3032	1,192 (0,87 - 1,62)	0,6628	1,2259 (0,49 – 3,06)

Fonte: Próprio autor. Legenda: 1 – Associações significantes dos genes codificadores de virulência de EAEC entre os grupos de casos e controles, após o teste o teste Qui-Quadrado, teste exato de Fisher e *odds ratio* (OR). 2 – Associações significantes dos genes codificadores de virulência de EAEC entre os grupos de casos e controles, após os teste de *Regressão* logística e *odds ratio* (OR). Todos os valores com significância estatística ($P < 0,05$) foram marcados em negritos, indicado a correlação entre (*) aos caso e (**) aos controles. 3 – Genes relacionados à virulência (GRVs).

5.4.2 Análise dos GRVs em relação aos dados das manifestações clínicas da diarreia das crianças do Semiárido brasileiro

A **Tabela 18** apresenta os resultados das análises bivariadas e multivariadas relacionados à influência dos GRVs no aparecimento ou na ausência das manifestações clínicas da doença diarreica.

Um importante aspecto clínico da diarreia é a desidratação que apresentou como preditores os genes da protease homóloga a *Shigella IgA-like* – *sigA* ([presença vs. ausência do sintoma] 23% vs. 2,9%; P= 0,0021; OR=4,327; IC95%=1,71 – 10,95) e do codificador da enterotoxina EspC – *espC* (60% vs. 38,8%; P=0,0211; OR= 2,365; IC95%=1,159 – 4,826), sendo esse último gene associado também à desidratação durante a análise multifatorial (P=0,04375; OR= 2,6441; IC95%=1,02 – 6,8).

Em relação à febre, verificou-se um significativo aumento do percentual de casos associados aos genes da subunidade da fímbria AAF/IV – *aag4A* (34,6% vs. 9,3%; P= 0,0004; OR=5,143; IC95%=1,958 – 13,5), da protease extracelular da *Shigella* – *sepA* (51,9% vs. 26,7%; P= 0,0037; OR=2,970; IC95%=1,407 – 6,26) e da proteína repetida da imunoglobulina enteroagregativa - *air* (88,5% vs. 73,3%; P=0,0451; OR=2,788; IC95%= 1,03 – 7,52).

Na análise multivariada, entre os genes estudados, os resultados apontaram novamente para o gene da subunidade da fímbria AAF/IV – *aag4A* correlacionado com a febre, além da proteína envolvida em colonização – *pic* (P=0,0223; OR=5,5219; IC95%=1,27 – 23,9). Em oposição, os genes do homólogo de *HilA* da *Salmonella* – *eilA* (P=0,01795; OR= 0,2582; IC95%=0,08 – 0,79) e do regulador transcricional – *aggR* (P=0,02485; OR=0,1963; IC95%= 0,04 – 0,81) foram associados a ausência desse sintoma.

Quanto aos dados clínicos de vômito, não houve diferenças significativas nas análises bivariadas em relação às proporções de percentual GRVs entre a presença e a ausência desse sintoma. Embora as análises multivariadas relativas à febre indicaram os seguintes preditores da indução desse sintoma, a unidade estrutural da AAF/II – *aafC* (P=0,025; OR=4,386; IC95%=1,19 – 16,05) e a toxina termoestável A da EAEC, EAST1 – *astA* (P=0,0215; OR=1,1416; IC95%=1,23 – 13,29); ao contrário do gene hemaglutinina sensível à temperatura – *tsh* (P= 0,0434; OR=0,3347; IC95%= 0,11 – 0,96) que apresentou efeito oposto.

Observa-se nas avaliações bivariadas dos dados de dor abdominal, como única correlação a presença do gene da proteína autotransportadora de *E. coli* enterotoxigênica – *eatA* (25% vs. 67%; P=0,0088; OR=0,1645; IC95%=0,04 – 0,64) com a ausência desse sintoma. Em contrapartida, nas análises multivariadas com todos os genes, não houve diferença estatística.

O aumento da média do número de dias de diarreia associou-se com os seguintes preditores da doença: subunidade da fímbria AAF/III - *agg3A* [(Média ± E.P.M) 3,455 ± 0,56 vs. 4,522 ± 0,12; P=0,0138], subunidade da fímbria AAF/IV - *agg4A* (5,360 ± 0,28 vs. 4,198 ± 0,12; P=0,0001). Ainda na mesma análise, os genes da subunidade da fímbria AAF/I - *aggA* e o regulador *negativo* do controlador transcricional - *aar* foram correlacionados com a redução da média do número de dias de diarreia e do número de evacuações por dia (P<0,05). Contudo apenas o último gene referido também foi correlacionado à redução dos dias de diarreia nas análises multivariadas (P<0,05).

O gene do codificador da enterotoxina EspC – *espC*, em concordância com as duas formas de análise, mostrou-se correlacionado ao aumento do número de dias de diarreia, do número de evacuações por dia e da pontuação de escores da gravidade da doença diarreica aguda (P<0,05).

Para a análise de *clusters* genéticos neste estudo relacionados à presença ou ausência das manifestações clínicas utilizou-se o *software CART analysis*. Nesse contexto, verificou-se que a desidratação foi associada com o seguinte aglomerado de genes presentes: o codificador da enterotoxina EspC – *espC*, a toxina codificada por plasmídeo – *pet* e a toxina termoestável A da EAEC – *astA* (P= 0,0114; OR=28,0; 95%IC= 1,987 to 394,7) (**FIGURA 11**).

Constatou-se também a relação da febre com *cluster* genético composto pela presença da subunidade da fímbria AAF/IV – *agg4A*, hemaglutinina sensível à temperatura – *tsh* e protease extracelular da *Shigella* – *sepA* (P=0,0491; OR=11,25; 95%IC=1,192-106,2) (**FIGURA 12**).

Pode-se observar ainda a correlação do vômito com o seguinte aglomerado de genes presentes: a proteína repetida da imunoglobulina enteroagregativa – *air*, a toxina termoestável A da EAEC – *astA*, codificador da enterotoxina EspC – *espC* e a toxina codificada por plasmídeo – *pet* (P= 0,0156; OR=8; 95%IC= 1,42 to 45,8) (**FIGURA 13**).

Tabela 18 – Análises bivariadas e multivariadas dos genes de virulência da *Escherichia coli* enteroagregativa relacionados à presença ou ausência das manifestações clínicas em crianças com diarreia (casos) da região do Semiárido Brasileiro

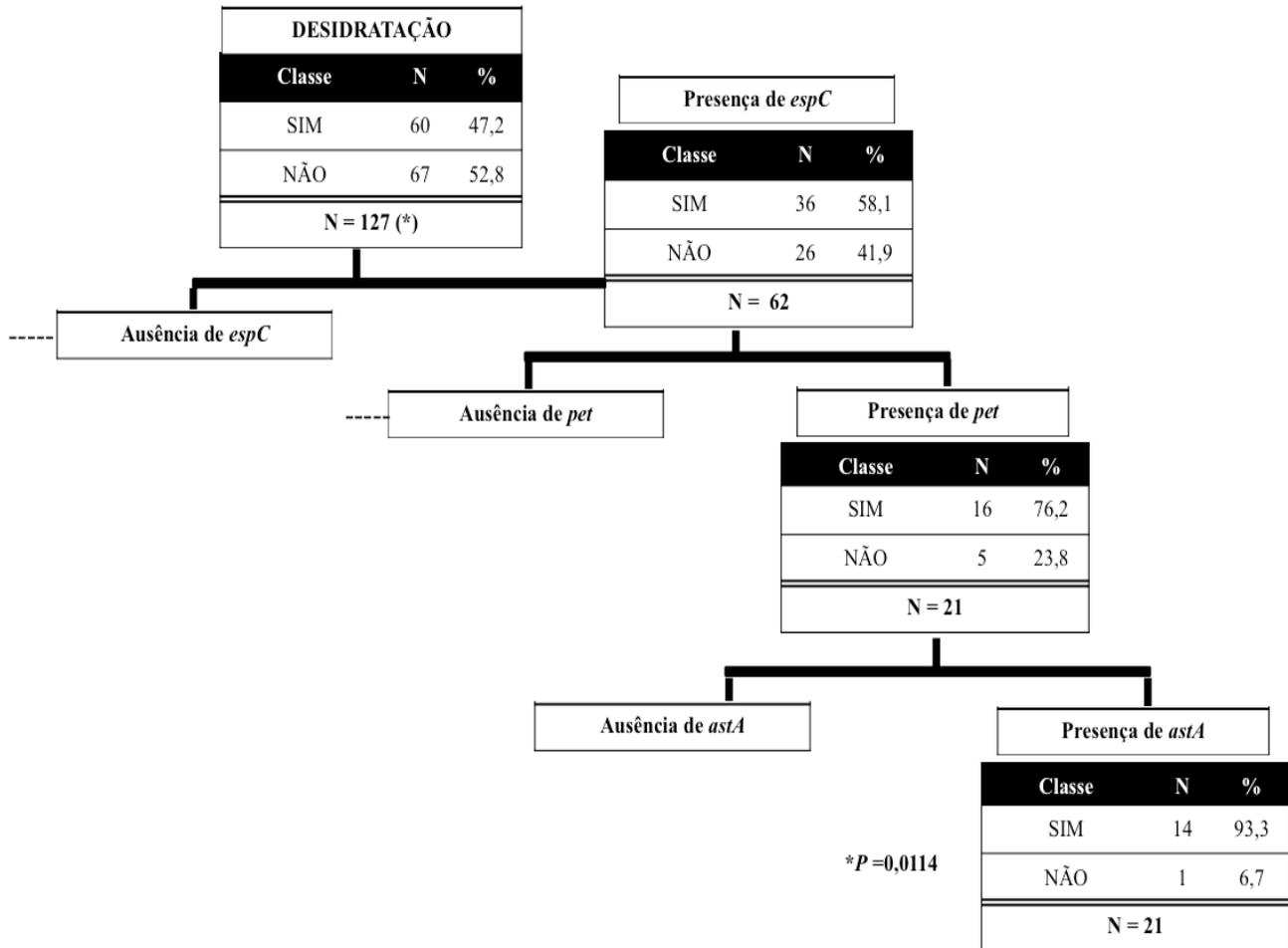
Genes de virulência	Desidratação N= 60 (%)	Febre N= 52 (%)	Vômitos N=46 (%)	Dor Abdominal N=12 (%)	Número de dias de diarreia ¹ Média ± E.P.M	Número de evacuações por dia ¹	Escore de gravidade da doença ¹
						Média ± E.P.M	Média ±E.P.M
Fimbrias							
<i>aggA</i> – subunidade da fímbria AAF/I	17 (28,3)	12 (23,1)^{b*}	10 (21,7)	5 (41,7)	3,971 ± 0,20^{a**}	4,32 ±0,10^{a**}	4,441 ± 0,39
<i>aafa</i> – subunidade da fímbria AAF/II	19 (31,7)	14 (26,9)	12 (26,1)	4 (33,3)	4,625 ± 0,22	4,5±0,11	5,094±0,4
<i>aafC</i> – Usher, unidade estrutural da AAF/II	17 (28,3)	12 (23,1)	14 (30,4)^{b*}	5 (41,7)	4,406 ± 0,23	4,344±0,10	4,750±0,43
<i>agg3A</i> – subunidade da fímbria AAF/III	5 (8,3)	2 (3,8)	5 (10,9)	1 (8,3)	3,455 ± 0,56^{a*}	4,273±0,19	3,909±0,81
<i>agg3/4C</i> – Usher, unidade estrutural da AAF/III-IV	26 (43,3)	24 (46,2)	23 (50)	3 (25)	4,397 ± 0,17	4,483±0,09	4,776±0,31
<i>agg4A</i> – subunidade da fímbria AAF/IV	15 (25)	18 (34,6)^{a*}	12 (26,1)	2 (16,7)	5,360 ± 0,28^{a*}	4,84±0,17	6,2 ± 0,49
<i>agg5A</i> – subunidade da fímbria AAF/V	20 (33,3)	18 (34,6)	15 (32,6)	3 (25)	4,462 ± 0,22	4,692±0,13	5,103± 0,41
Classe das SPATEs I							
<i>sat</i> – toxina autotransportadora secretada	38 (63,3)	36 (69,2)	28 (60,9)	8 (66,7)	4,513 ± 0,15	4,539± 0,08	5,039± 0,29
<i>pet</i> – toxina codificada por plasmídeo	27 (45)	19 (36,5)	18 (39,1)	6 (50)	4,271± 0,23	4,458± 0,11	4,875± 0,38
<i>sigA</i> – protease homóloga da <i>Shigella</i> IgA-like	14 (23,3)^{a*}	13 (25)	13 (28,3)	1 (8,3)	4,333 ± 0,24	4,467±0,133	4,9 ± 0,44
<i>espC</i> – codificador da enterotoxina EspC	36 (60)^{c*}	30 (57,7)	27 (58,7)	6 (50)	4,852 ± 0,17^{c*}	4,803 ±0,10^{c*}	5,65 ± 0,33^{c*}
<i>espP</i> – serina protease extracelular	19 (31,7)	17 (32,7)	25 (54,3)	4 (33,3)	4,675 ± 0,12	4,675±0,12	4,9 ± 0,38

Continuação Tabela 18 – Análises bivariadas e multivariadas dos genes de virulência da *Escherichia coli* enteroagregativa relacionados à presença ou ausência das manifestações clínicas em crianças com diarreia (casos) da região do Semiárido Brasileiro

Genes de virulência	Desidratação N= 60 (%)	Febre N= 52 (%)	Vômitos N=46 (%)	Dor Abdominal N=12 (%)	Número de dias de diarreia ¹	Número de evacuações por dia ¹	Escore de gravidade da doença ¹
					Média ± E.P.M	Média ± E.P.M	Média ±E.P.M
Classe das SPATEs II							
<i>pic</i> – proteína envolvida em colonização	44 (73,3)	41 (78,8)^{b*}	33 (71,7)	11 (91,7)	4,396 ± 0,15	4,505± 0,08	4,868± 0,26
<i>tsh</i> – hemaglutinina sensível à temperatura	35 (58,3)	32 (61,5)	27 (58,7)^{b**}	4 (33,3)	4,474 ± 0,14	4,577± 0,08	4,833± 0,28
<i>vat</i> – toxina autotransportadora de vacuolizante	24 (40)	21 (40,4)	19 (41,3)	4 (33,3)	4,686 ± 0,18	4,569± 0,10	4,961± 0,34
<i>sepA</i> – protease extracelular da <i>Shigella</i>	23 (38,3)	27 (51,9)^{a*}	20 (43,5)	4 (33,3)	4,723 ± 0,18	4,532±0,10	5,298± 0,40
<i>espL</i> – <i>Escherichia coli</i> secretora de protease	37 (61,7)	24 (46,2)	30 (65,2)	6 (50)	4,525 ± 0,179	4,600± 0,08	5,102± 0,30
<i>eatA</i> – proteína autotransportadora de <i>E. coli</i> enterotoxigênica	31 (51,7)	35 (67,3)	24 (52,2)	3 (25)^{a**}	4,575 ± 0,14	4,661± 0,10	4,988± 0,27
Outros GRVs¹							
<i>astA</i> – toxina termoestável A da EAEC, EAST1	44 (73,3)	38 (73,1)	37 (80,4)^{b*}	6 (50)	4,551 ± 0,14	4,573± 0,08	4,989± 0,27
<i>air</i> – proteína repetida da imunoglobulina enteroagregativa	52 (86,7)	46 (88,5)^{a*}	41 (89,1)	10 (83,3)	4,510 ± 0,13	4,630± 0,082	5,1 ± 0,25
<i>capU</i> – homóloga à hexosiltransferase	55 (91,7)	47 (90,4)	41 (89,1)	11 (91,7)	4,514 ± 0,127	4,615± 0,07	4,982± 0,24
<i>eilA</i> – homólogo <i>HilA</i> de Salmonella	33 (55)	25 (48,1)^{b**}	26 (56,5)	4 (33,3)	4,343 ± 0,13	4,571±0,09	4,671± 0,26
<i>aar</i> – regulador negativo do <i>aggR</i>	34 (56,7)	29 (55,8)	24 (52,2)	10 (83,3)	4,173 ± 0,16^{c**}	4,453±0,08^{a**}	4,493± 0,28
<i>shiA</i> – supressor inflamatório <i>shiA-like</i>	49 (81,7)	42 (80,8)	35 (76,1)	10 (83,3)	4,422 ± 0,13	4,637±0,08	4,843± 0,24
<i>aap</i> – proteína antiagregativa, Dispersina	48 (80)	39 (75)	38 (82,6)	11 (91,7)	4,495 ± 0,14	4,557±0,07	4,907 ±0,25
<i>orf3</i> – codifica proteína críptica	41 (68,3)	32 (61,5)	31(67,4)	8 (66,7)	4,390 ± 0,15	4,512±0,08	4,390± 0,15
<i>aggR</i> – regulador transcricional	49 (81,7)	40 (76,9)^{b**}	39 (84,8)	10 (83,3)	4,515 ± 0,13	4,614±0,08	4,911± 0,25

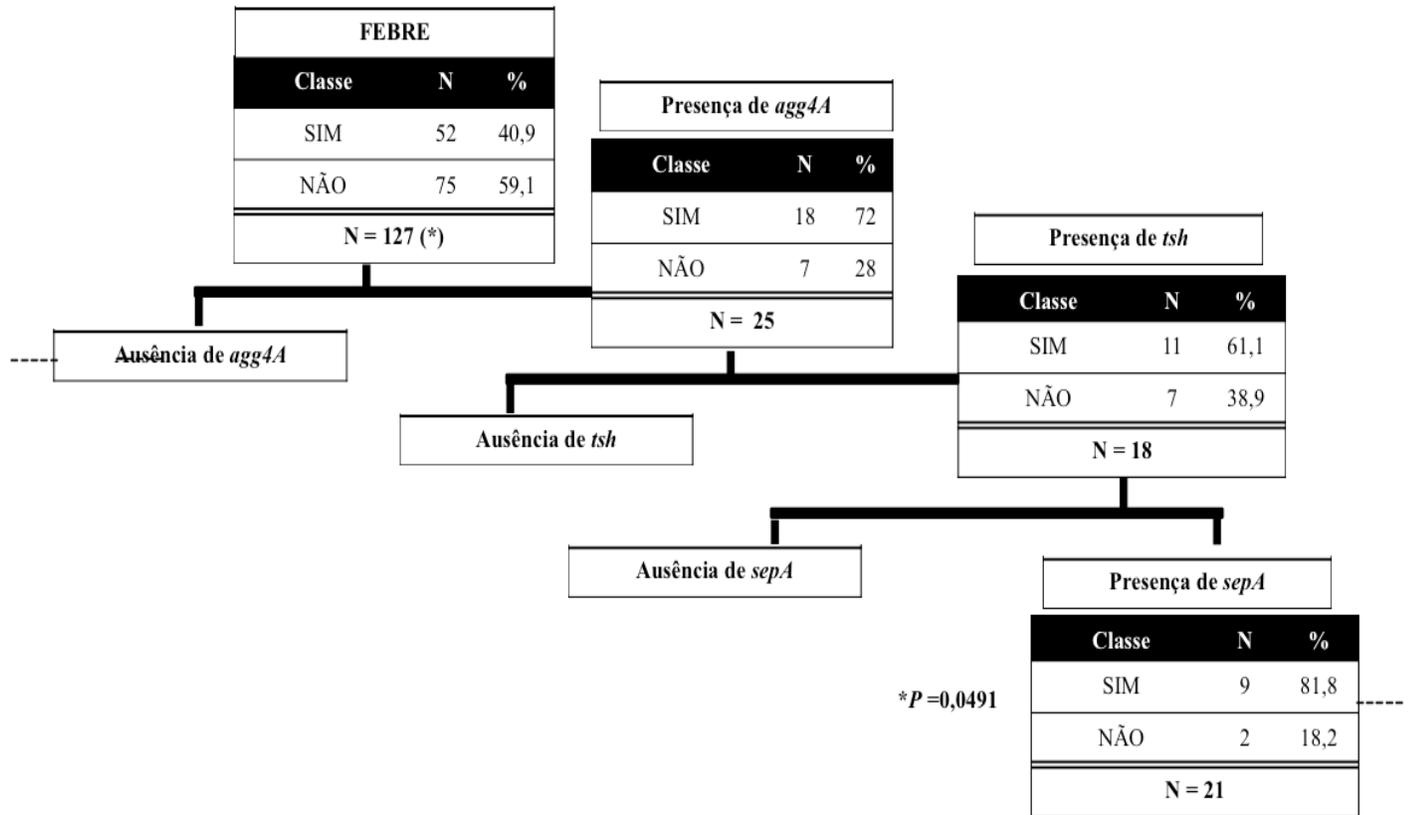
Fonte: Próprio autor. Legenda: ¹ Dados foram convertido em valor binário, em pontuações de leve/ moderada-grave quando foi utilizado na logística de regressão. ² Genes relacionados à virulência (VGRs). **a** – Associações significantes dos genes codificadores de virulência de EAEC entre a presença ou ausência de sintomas, após o teste Qui-Quadrado, teste exato de Fisher, teste *T* ou *Mann-Whitney* ($P<0,05$), estão marcadas em negrito. **b** – Associações significantes dos genes codificadores de virulência de EAEC entre a presença ou ausência de sintomas, após os teste de regressão logísticas em conjunto todos os GRVs ($P<0,05$), estão marcadas em negrito. **c** – Associação significativa pela análise bivariada e regressão logística com o GRV ($P<0,05$), estão marcadas em negrito. * indica a associação significativa com aumento da média da manifestação clínica; ** indica a associação significativa com a redução da média da manifestação clínica.

Figura 11 – Representação gráfica usando o método de classificação de árvore de decisão (CART analysis) que mostra a relação dos casos de desidratação com a presença ou ausência de genes de virulência da *Escherichia coli* enteroagregativa



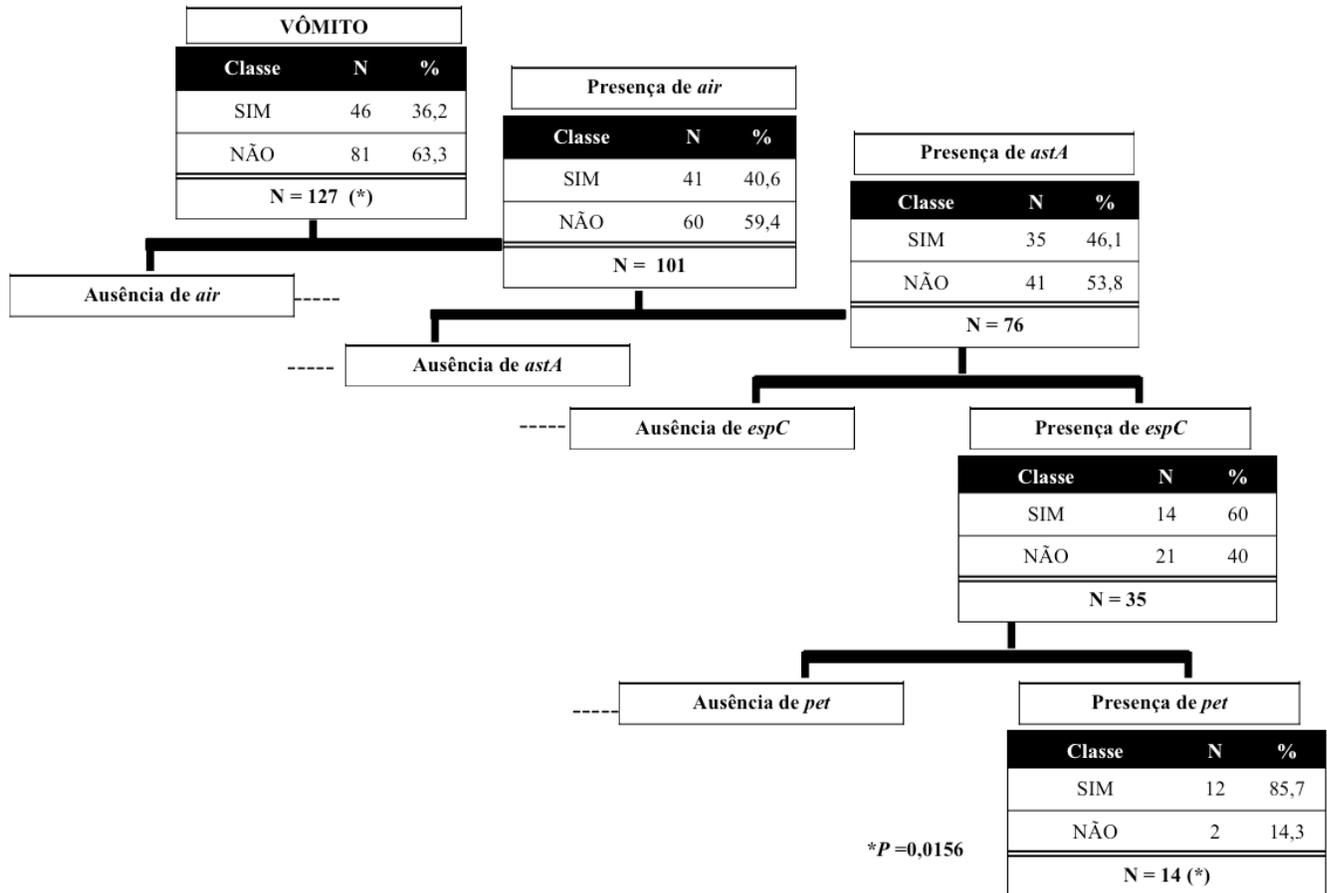
Fonte: Próprio autor. Legenda: A presença ou ausência de cada gene relacionado ao sintoma que pode surgir ou não é indicada de acordo com as áreas terminais (nodos) da árvore. Cada ramo da árvore termina em um nó terminal definido pela presença ou ausência dos genes de virulência em que a análise estatística foi realizada. Para análise estatística foi utilizado o teste Qui-Quadrado, teste exato de Fisher e *odds ratio* (OR) (**P*<0,05). Os ramos que terminaram em um nó terminal não estatístico não foram mostrados, mas representados por linhas tracejadas. No desfecho do algoritmo binário observou-se a associação significativa com o aglomerado dos seguintes genes do codificador da enterotoxina EspC – *espC*, toxina codificada por plasmídeo – *pet* e toxina termoestável A da EAEC – *astA* com a desidratação (*P* = 0,0114; OR=28,0; 95%IC= 1,987 – 394,7).

Figura 12 – Representação gráfica usando o método de classificação de árvore de decisão (CART analysis) que mostra a relação dos casos de febre com a presença ou ausência de genes de virulência da *Escherichia coli* enteroagregativa



Fonte: Próprio autor. Legenda: A presença ou ausência de cada gene relacionado ao sintoma que pode surgir ou não é indicada de acordo com as áreas terminais (nodos) da árvore. Cada ramo da árvore termina em um nó terminal definido pela presença ou ausência dos genes de virulência em que a análise estatística foi realizada. Para análise estatística foi utilizado o teste Qui-Quadrado, teste exato de Fisher e *odds ratio* (OR) ($*P < 0,05$). Os ramos que terminaram em um nó terminal não estatístico não foram mostrados, mas representados por linhas tracejadas. No desfecho do algoritmo binário observou-se a associação significativa com o aglomerado dos seguintes genes: subunidade da fímbria AAF/IV - *agg4A*, hemaglutinina sensível à temperatura - *tsh* e protease extracelular da *Shigella* - *sepA* com a febre ($P=0,0491$; $OR=11,25$; $95\%IC=1,192-106$).

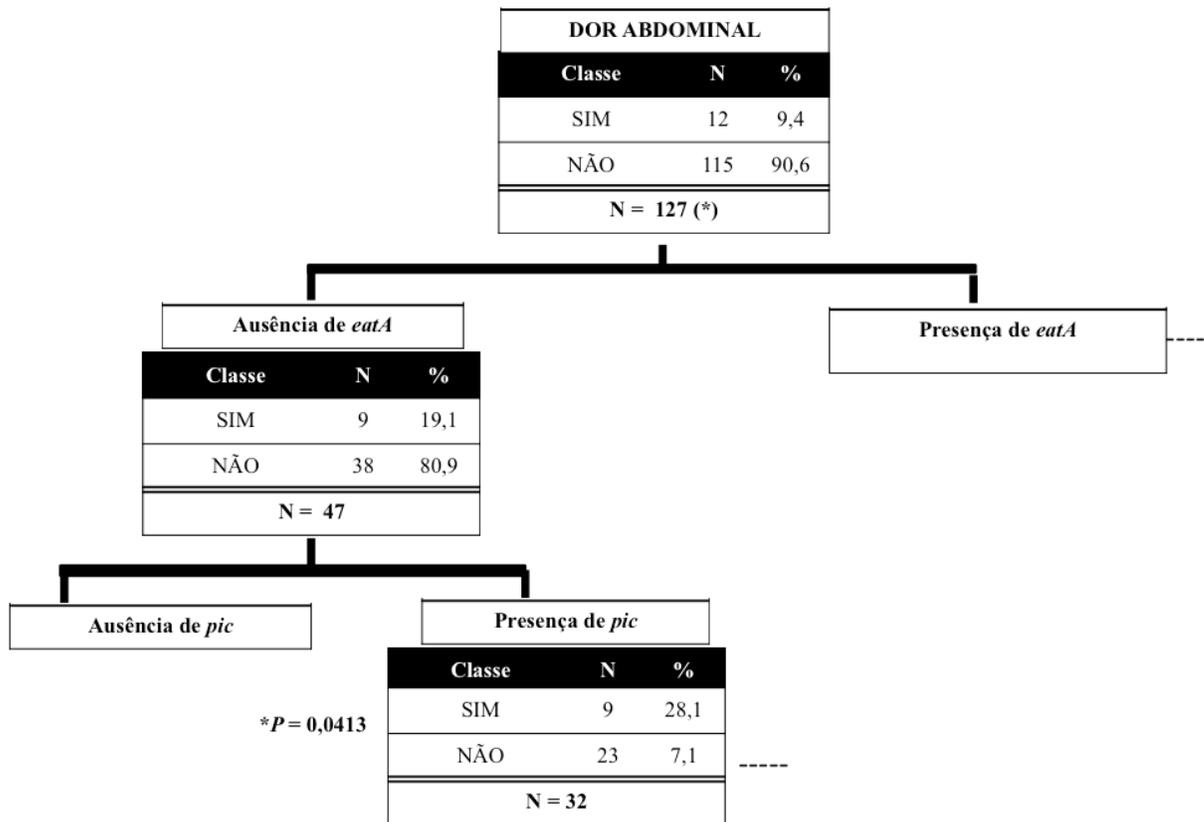
Figura 13 – Representação gráfica usando o método de classificação de árvore de decisão (CART analysis) que mostra a relação dos casos de vômito com a presença ou ausência de genes de virulência da *Escherichia coli* enteroagregativa



Fonte: Próprio autor. Legenda: A presença ou ausência de cada gene relacionado ao sintoma que pode surgir ou não é indicada de acordo com as áreas terminais (nodos) da árvore. Cada ramo da árvore termina em um nó terminal definido pela presença ou ausência dos genes de virulência em que a análise estatística foi realizada. Para análise estatística foi utilizado o teste Qui-Quadrado, teste exato de Fisher e *odds ratio* (OR) (*P<0,05). Os ramos que terminaram em um nó terminal não estatístico não foram mostrados, mas representados por linhas tracejadas. No desfecho do algoritmo binário observou-se a associação significativa com o aglomerado dos seguintes genes: a proteína repetida da imunoglobulina enteroagregativa – *air*, a toxina termoestável A da EAEC – *astA*, codificador da enterotoxina EspC – *espC* e a toxina codificada por plasmídeo – *pet* (P= 0,0156; OR=8; 95%IC= 1,42 – 45,8).

A investigação dos casos de dor abdominal mostrou associação significativa ao *clusters* constituído pela ausência do proteína autotransportadora de *E. coli* enterotoxigênica – *eatA* e a presença de proteína envolvida em colonização – *pic* (P=0,0413; OR=12,53; 95%IC=0,6786-23,14) (FIGURA 14).

Figura 14 - Representação gráfica usando o método de classificação de árvore de decisão (CART analysis) que mostra a relação dos casos de dor abdominal com a presença ou ausência de genes de virulência da *Escherichia coli* enteroagregativa

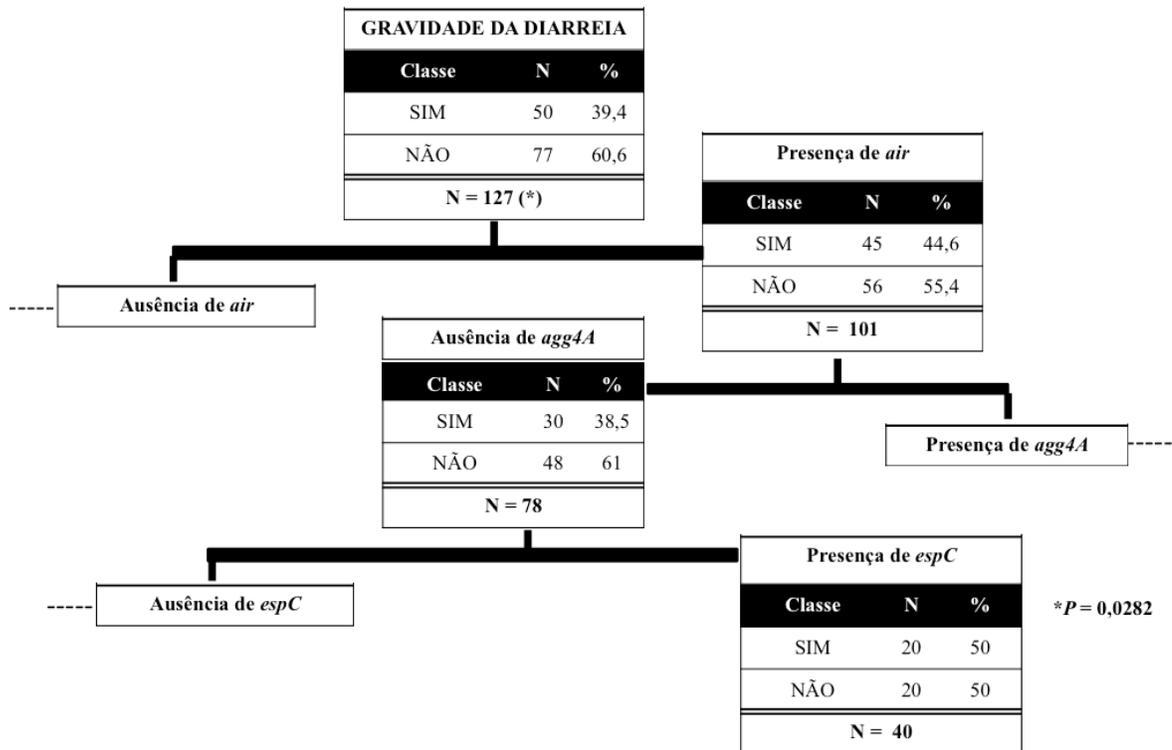


Fonte: Próprio autor. Legenda: A presença ou ausência de cada gene relacionado ao sintoma que pode surgir ou não é indicada de acordo com as áreas terminais (nodos) da árvore. Cada ramo da árvore termina em um nó terminal definido pela presença ou ausência dos genes de virulência em que a análise estatística foi realizada. Para análise estatística foi utilizado o teste Qui-Quadrado, teste exato de Fisher e *odds ratio* (OR) (* $P < 0,05$). Os ramos que terminaram em um nó terminal não estatístico não foram mostrados, mas representados por linhas tracejadas. No desfecho do algoritmo binário observou-se a associação significativa com o aglomerado e ausência dos seguintes genes: ausência do proteína autotransportadora de *E. coli* enterotoxigênica – *eatA* e a presença de proteína envolvida em colonização – *pic* ($P=0,0413$; $OR=12,53$; $95\%IC=0,6786 - 23,14$).

No desfecho do algoritmo binário observou-se a associação significativa do aumento da gravidade da doença com o aglomerado da presença e ausência dos seguintes genes: presença da proteína repetida da imunoglobulina enteroagregativa – *air*, ausência da subunidade da fímbria

AAF/IV - *agg4A* e a presença do gene da *Escherichia coli* secretora de proteína EspC – *espC* (P= 0,0282; OR=2,054; 95%IC= 1,085 – 3,889 (FIGURA 15).

Figura 15 - Representação gráfica usando o método de classificação de árvore de decisão (CART analysis) que mostra a relação da gravidade da doença nos casos com a presença ou ausência de genes de virulência da *Escherichia coli* enteroagregativa



Fonte: Próprio autor. Legenda: A presença ou ausência de cada gene relacionado ao sintoma que pode surgir ou não é indicada de acordo com as áreas terminais (nodos) da árvore. Cada ramo da árvore termina em um nó terminal definido pela presença ou ausência dos genes de virulência em que a análise estatística foi realizada. Para análise estatística foi utilizado o teste Qui-Quadrado, teste exato de Fisher e *odds ratio* (OR) (*P<0,05). Os ramos que terminaram em um nó terminal não estatístico não foram mostrados, mas representados por linhas tracejadas. No desfecho do algoritmo binário observou-se a associação significativa com o aglomerado dos seguintes genes: presença da proteína repetida da imunoglobulina enteroagregativa – *air*, ausência da subunidade da fímbria AAF/IV - *agg4A*, presença do codificador da enterotoxina EspC – *espC* (P= 0,0282; OR=2,054; 95%IC= 1,085 – 3,889)

5.5 Avaliação da distribuição das coinfeções relacionados à infecção pela *Escherichia coli* enteroagregativa diagnosticada em amostras fecais de crianças com e sem diarreia no Semiárido brasileiro

Neste tópico, abordaremos as informações das manifestações clínicas das crianças que apresentaram coinfeções e a variabilidade dos enteropatógenos presentes nas amostras fecais diagnosticadas com a EAEC que possuíam simultaneamente os dois alvos genéticos de diagnóstico: cromossômico – *aaiC* e do gene plasmidial – *aatA*. Dentre as 232 crianças estudadas, 179 (77,2%) apresentaram coinfeção com pelo menos um enteropatógeno, das quais 101 (43,5%) eram casos e 78 controles (33,6%).

Em geral, 77,2% das crianças apresentaram pelo menos uma coinfeção bacteriana, sendo 52% das coinfeções parasitárias e 33%, virais.

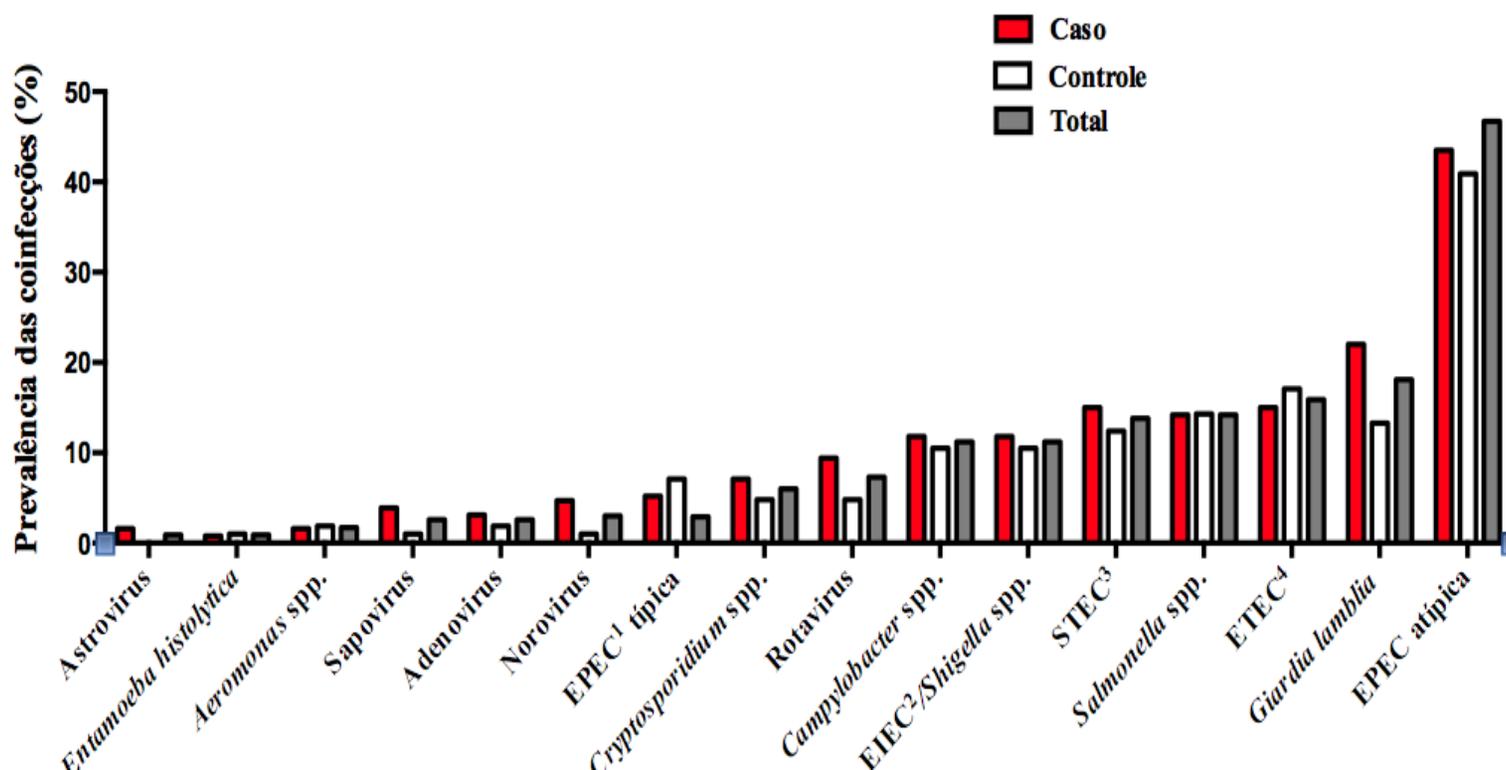
Em relação aos enteropatógenos analisados, observa-se na **Figura 16** que a *Escherichia coli* enteropatógena atípica (aEPEC) (43,5%; 101/232) apresentou a maior frequência das coinfeções, seguida pela *Giardia lamblia* (18,1%; 42/232), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) (15,9%; 37/232).

A avaliação pelo método árvore de decisão (*CART analysis*) mostrou a correlação da presença da *Giardia Lamblia* simultânea ausência de aEPEC ($P= 0,0495$; $OR=0,2588$; $95\%IC= 1,035 - 0,064$) com as crianças assintomáticas (controles), como visto na **Figura 17**.

Quanto aos dados clínicos (**TABELA 19**), a coinfeção por norovírus foi associado à febre ($P=0,041$; $OR=7,872$; $95\%IC=0,14 - 0,68$) nas análises bivariadas. Além disso, na avaliação multivariada, norovirus ($P=0,04372$; $OR= 11,109$; $95\%IC= 1,07 - 115,32$) foi novamente relacionado à febre, bem como a *Escherichia coli* enteroinvasiva/*Shigella* spp. ($P=0,04501$; $OR= 3,934$; $95\%IC=1,03- 15,01$) e o *Campylobacter* spp. ($P=0,0451$; $OR= 4,495$; $95\%IC= 1,03- 19,57$); ao contrário da coinfeção pela *Giardia lamblia* ($P=0,0322$; $OR= 0,278$; $95\%IC=0,08 - 0,89$) que foi associada à ausência do referido sintoma.

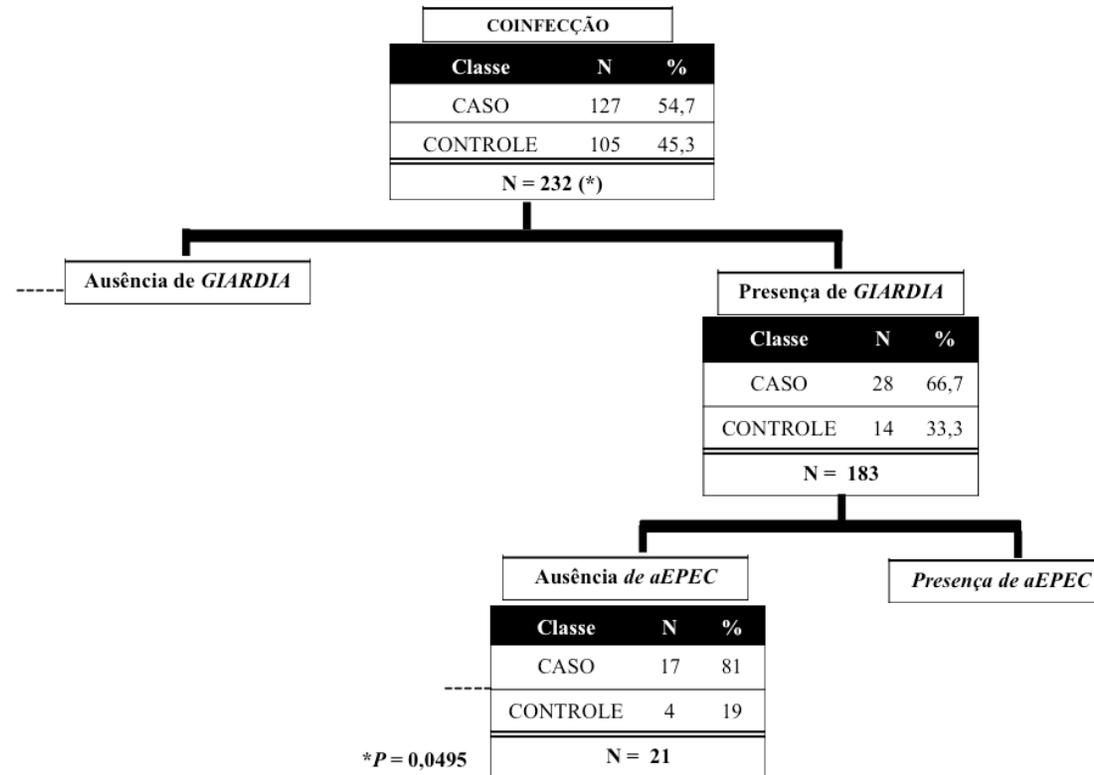
Outro importante fator avaliado foi o aumento da média do número de dias de diarreia associado a coinfeção com aEPEC ($[(Média \pm E.P.M) 4,769 \pm 0,19$ vs. $4,189 \pm 0,15$; $P=0,0198$) em avaliação bivariada. Ademais, o aumento dos escores do número de evacuações por dia foi correlacionado à copatogênese com o *Campylobacter* spp. ($P=0,033$; $OR=4,289$; $95\%IC= 1,11 - 16,45$) nas análises multivariada (**TABELA 19**).

Figura 16 – Frequência de cada enteropatógeno em crianças diagnosticadas com *Escherichia coli* enteroagregativa



Fonte: Próprio autor. Legenda: EPEC¹= *Escherichia coli* enteropatogênica; EIEC⁶= *Escherichia coli* enteroinvasiva; EIEC²= *Escherichia coli* enteroinvasiva; STEC³= *Escherichia coli* produtora de Shiga toxina; ETEC⁴= *Escherichia coli* enterotoxigênica;

Figura 17 - Representação gráfica usando o método de classificação de árvore de decisão (*CART analysis*) que mostra a relação entre crianças com a presença (casos) e a ausência (controles) de diarreia na copatogênese da *Escherichia coli* enteroagregativa



Fonte: Próprio autor. Legenda: A presença ou ausência de cada gene relacionado ao sintoma que pode surgir ou não é indicada de acordo com as áreas terminais (nodos) da árvore. Cada ramo da árvore termina em um nó terminal definido pela presença ou ausência dos genes de virulência em que a análise estatística foi realizada. Para análise estatística foi utilizado o teste Qui-Quadrado, teste exato de Fisher e *odds ratio* (OR) (*P<0,05). Os ramos que terminaram em um nó terminal não estatístico não foram mostrados, mas representados por linhas tracejadas. No desfecho do algoritmo binário observou-se a associação significativa com o aglomerado dos seguintes enteropatógenos: presença da *Giardia lamblia* e ausência de *Escherichia coli* enteropatógena atípica (aEPEC) (P= 0,0495; OR=0,2588; 95%IC= 1,035 – 0,064) com os controles.

Tabela 19 – Análise multivariada da presença ou ausência das manifestações clínicas da diarreia nas crianças na presença ou na ausência das coinfeções específicas com a *Escherichia coli* enteroagregativa

Coinfeções	Desidratação N= 60 (%)	Febre N= 52 (%)	Vômitos N=46 (%)	Dor Abdominal N=12 (%)	Escore de dias de diarreia ¹ N=54 (%)	Escore de evacuações por dia ¹ N=51 (%)	Escore de gravidade da doença ¹ N=91 (%)
Pelo menos um vírus entérico	9 (15)	11 (21,2)	10 (21,7)	1 (8,3)	9 (16,7)	8 (15,7)	18 (19,8)
Adenovírus	1 (1,7)	0	2 (4,3)	0	1 (1,9)	1 (2)	3 (3,3)
Astrovírus	1 (1,7)	2 (3,8)	1 (2,2)	0	1 (1,9)	1 (2)	2 (2,2)
Norovírus	4 (6,7)	5 (9,6)*	4 (8,7)	1 (8,3)	3 (5,6)	3 (5,9)	6 (6,6)
Rotavírus	3 (5)	4 (7,7)	3 (6,5)	0	5 (9,3)	4 (7,8)	8 (8,8)
Sapovírus	0	0	0	0	1 (1,9)	1 (2)	1 (1,1)
Pelo menos uma bactéria entérica	36 (60)	32 (61,5)	24 (46,2)	8 (66,7)	34 (63)	36 (70,6)	56 (61,5)
STEC ²	8 (13,3)	9 (17,3)	6 (13)	2 (16,7)	7 (13)	8 (15,7)	12 (13,2)
EPEC ³ atípica	26 (43,3)	19 (36,5)	23 (44,2)	2 (16,7)	26 (48,1)	25 (49)	39 (42,9)
EPEC típica	4 (6,7)	3 (5,8)	2 (3,8)	3 (25)	3 (5,6)	3 (5,9)	4 (4,4)
ETEC ⁴	6 (10)	4 (7,7)	3 (6,5)	2 (16,7)	7 (13)	11 (21,6)	13 (14,3)
EIEC ⁴ / <i>Shigella</i> spp	7 (11,7)	9 (17,3)*	5 (10,9)	1 (8,3)	5 (9,3)	4 (7,8)	11 (12,1)
<i>Salmonella</i> spp	9 (15)	6 (11,4)	6 (13)	2 (16,7)	6 (11,1)	4 (7,8)	11 (12,1)
<i>Campylobacter</i> spp	7 (11,7)	8 (15,4)*	7 (15,2)	1 (8,3)	8 (14,8)	9 (17,6)*	13 (14,3)
<i>Aeromonas</i> spp	2 (3,3)	2 (3,8)	2 (4,3)	0	1 (1,9)	1 (2)	2 (2,2)
Pelo menos um parasita entérico	14 (23,3)	10 (19,2)	11 (23,9)	3 (25)	12 (22,2)	13 (25,5)	24 (26,4)
<i>Entamoeba Histolytica</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cryptosporidium</i>	6 (10)	4 (7,7)	4 (8,7)	2 (16,7)	4 (7,4)	5 (9,8)	7 (7,7)
<i>Giardia</i>	11 (18,3)	8 (15,4)**	9 (19,6)	2 (16,7)	11 (20,4)	11 (21,6)	21 (23,1)
Pelo menos uma copatogênese	43 (71,7)	38 (73,1)	29 (55,8)	10 (83,3)	39 (72,2)	42 (82,4)	68 (74,7)

Fonte: Próprio autor. Legenda:¹Dados foram convertido em valor binário, indicando na tabela acima moderada-grave na pontuação de escore. STEC²= *E. coli* produtora de Shiga toxina; EPEC³= *E. coli* enteropatogênica; EIEC⁴= *E. coli* enteroinvasiva; ETEC³= *E. coli* enterotoxigênica; EIEC⁴= *E. coli* enteroinvasiva. Associações significantes dos genes codificadores de virulência de EAEC entre a presença ou ausência de sintomas, após os teste de regressão logística em conjunto todos os enteropatógenos (* $P < 0.05$), estão marcadas em negrito. * indica a associação significativa com aumento do percentual da manifestação clínica; ** indica a associação significativa com a redução do percentual da manifestação clínica.

6 DISCUSSÃO

As doenças diarreicas constituem um importante problema de saúde pública, afetando, principalmente, as crianças nos primeiros anos de vida que são críticos para o desenvolvimento físico e cognitivo (NIEHAUS et al., 2002; LIMA et al., 2000; MOORE et al., 2010). Segundo a UNICEF (2016), a implementação de medidas preventivas e sanitárias adotadas pelos governos dos países em desenvolvimento resultaram em drástica redução das taxas de mortalidade e morbidade infantil ao longo dos anos. Não obstante, tais enfermidades continuam como a segunda causa de óbito em crianças abaixo de cinco anos de idade.

A EAEC é um importante enteropatógeno capaz de induzir a diarreia persistente e aguda (BOISEN et al., 2012; JENSEN et al., 2016; LIMA et al., 2000; LIMA et al., 2013; LIMA et al. *Manuscrito em submissão*) e até mesmo a colonização subclínica (FRANÇA et al., 2013; HAVT et al., 2017; LIMA et al., 2000; 2017), podendo acarretar, a longo prazo, o déficit de crescimento infantil e a inflamação intestinal crônica (STEINER et al., 1998; ROGAWSKI et al., 2017). Apesar disso, poucos estudos dedicam a atenção para explicar as diferenças na heterogeneidade dos padrões genéticos dessa bactéria que culmina em diferentes desfechos da doença.

O propósito dessa pesquisa foi investigar a prevalência, os determinantes socioeconômicos, genéticos e as co-patogêneses que favorecem a infecção pela EAEC, em crianças com e sem diarreia, na idade de 2 a 36 meses, residentes nas diferentes localidades da região do Semiárido brasileiro entre os anos de 2009 e 2011.

O presente estudo, como parte do projeto RECODISA, apontou uma prevalência geral de 54,6% (650/1191) de EAEC nas amostras estudadas que se correlacionou com a casos de diarreia aguda infantil (LIMA et al. *Manuscrito em submissão*). Assim, corroborando com os nossos achados, vários estudos nacionais e internacionais também mostraram essa bactéria como um importante agente etiológico da diarreia (ARAÚJO et al., 2007; BUERIS et al., 2007; DIAS et al., 2016; GARCIA, SILVA, DINIZ, 2011; HUANG et al., 2006; MORENO et al., 2010; PEREIRA et al., 2007; PLATTS-MILLS et al., 2015; 2017; REGUA-MANGIA et al., 2004; RODRIGUES et al., 2002). Estudo realizado por nosso grupo, na região do Nordeste brasileiro, demonstrou elevadas taxas de detecção de EAEC (41%) em ambas as amostras, diarreicas e não-

diarreicas, provenientes de crianças da comunidade carente Gonçalves Dias, na cidade de Fortaleza, no Estado do Ceará (LIMA et al., 2013).

Além disso, em recente pesquisa, de caso-controle prospectivo de desnutrição infantil, desenvolvido na mesma cidade citada, detectou-se EAEC como um dos enteropatógenos mais prevalentes (21,2%) em crianças assintomáticas eutróficas e desnutridas (LIMA et al., 2017). Neste contexto, similar taxa de infecção subclínica foi observada em nosso trabalho (25,18%).

Os municípios com as maiores prevalências, em nosso trabalho, eram pertencentes ao Estado da Paraíba, o que inclui Patos (99%) e Sousa (83,9%). Contudo, apenas as cidades de Crato (Ceará) e de Ouricuri (Pernambuco) apresentaram correlação entre EAEC e a diarreia infantil. No Brasil, a avaliação geral dos Índices de Desenvolvimento Humano por Município (IDHM), mostra uma baixa evolução das regiões brasileiras, apontando uma taxa de crescimento inferior a 0,8% nos últimos anos (BRASIL, 2015a), o que indica a estagnação no desenvolvimento do país. Ademais, não foram encontrados estudos que estratifiquem as populações das cidades do Semiárido brasileiro referentes ao impacto das doenças diarreicas infantis correlacionando-as ao específico enteropatógeno.

Quanto ao diagnóstico, atualmente, pesquisas mostram que as cepas de EAEC têm apresentado uma grande versatilidade de aderência em células HEp-2 (considerado “padrão ouro” de identificação desta bactéria), o que dificulta sua caracterização (LIEBCHEN et al., 2011; RAJAN et al., 2018). Portanto, os ensaios moleculares com ampla detecção de fatores de virulência são técnicas rápidas que facilitam a detecção desse patotipo (ANDRADE, GOMES, ELIAS et al., 2002; SCHMIDT et al., 1995; TANIUCHI et al., 2013; ESTRADA-GARCIA, NAVARRO-GARCIA, 2012).

Em nosso estudo, os genes empregados para o diagnóstico foram o codificador da ilha de ativação de controle transcricional (*aaiC*) e a proteína transportadora anti-agregativa (*aatA*), os quais tem sido utilizados para a identificação da EAEC em estudos multicêntricos a nível mundial (MAL-ED e GEMS) (KOTLOFF et al., 2013; PLATTS-MILLS et al., 2015). Contudo, no atual estudo, a avaliação da combinação entre os alvos genéticos de diagnóstico não indicaram diferenças significantes nas análises de escores de gravidade e do processo inflamatório da doença diarreica. Assim, amostras identificadas com a EAEC na presença de ambos os genes foram escolhidas para a continuidade no presente trabalho. Rogawski et al.

(2017) descreve que ter obtido uma maior consistência nas análises dos dados quando utilizado ambos os genes para o diagnóstico da EAEC.

A caracterização dos distintos determinantes da diarreia é essencial para o entendimento do desfecho da doença, o que pode variar de acordo com a população estudada e a região geográfica (GEORGE et al., 2014). No detalhamento populacional do presente estudo, as crianças na primeira infância que estavam em aleitamento materno não-exclusivo e possuíam mães na faixa de etária de 14 a 25 anos indicaram uma maior vulnerabilidade para a ocorrência de diarreia.

Nesse contexto, um levantamento global sobre o aleitamento, após avaliar 194 nações, descobriu-se que apenas 40% das crianças são amamentadas exclusivamente durante os seis primeiros meses de vida, enquanto que a referida taxa no Brasil foi de 39% (UNICEF, 2018; OMS, 2017a). No Semiárido brasileiro, no presente estudo, verificou que apenas 29% das crianças na primeira infância estava em aleitamento materno exclusivo.

O primeiro ano de vida é o período crucial para o desenvolvimento físico, motor e cognitivo, indicando que crianças com o desenvolvimento integral saudável, demonstram um melhor desempenho escolar (BRASIL, 2009). Um importante agravante são crianças submetidas ao aleitamento materno não exclusivo ou não amamentadas que os tornam mais suscetíveis ao desenvolvimento de eventos diarreicos, provavelmente, devido à imaturidade do desenvolvimento do sistema imunológico (BRASIL, 2009).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que crianças amamentadas apresentam uma microbiota intestinal mais saudável, quando comparadas às crianças alimentadas com fórmulas industrializadas (WHARTON et al., 1994; TURIN, OCHOA, 2014). Logo, observa-se que a microbiota normal é estabelecida pela amamentação, consistindo numa proteção contra doenças diarreicas e contra outras doenças, bem como contribuindo para o desenvolvimento e a maturação do trato gastrointestinal infantil (SCHIFFRIN, BLUM, 2002; SOLIS et al., 2002).

A Organização Mundial de Saúde (2017a) preconiza que o aleitamento materno deve ser exclusivo, no mínimo, nos primeiros seis meses de idade, o que é indicado como uma das formas mais eficazes de proteger a criança contra infecções. Somente com o decurso desse período, poderia ocorrer a inclusão de alimentação complementar. Assim, sugere-se que a baixa taxa de amamentação em nossa pesquisa, pode estar vinculada ao fato das “jovens” mães apresentarem o trabalho como o motivo que as impossibilitaria de amamentar a criança,

tornando-se necessária a introdução de fórmulas industrializadas. Além disso, entre as crianças no terceiro ano de vida, o aleitamento não-exclusivo e a utilização de fontes de água não confiáveis (água para beber oriunda de açude, rio, carro-pipa, cisterna, cacimba, entre outros) apresentaram-se como determinantes relacionados ao desenvolvimento da infecção subclínica por EAEC.

Provavelmente, existe uma relação entre a escassez de água, devido à ausência de chuvas da região do Semiárido brasileiro, que geram a interrupção ou a intermitência no provimento de água à população. A utilização de água sem o tratamento adequado a torna o principal veículo para a infecção (BRASIL, 2015b). Neste contexto, as crianças assintomáticas podem estar expostas a infecções recorrentes, resultantes das precárias condições de saneamento ambiental, deficiência ou ausência do aleitamento materno, características da Disfunção Entérica Ambiental – DAE (CRANE, JONES, BERKLEY, 2015; HARPER et al, 2018).

A DAE consiste na persistência da frequência da exposição a patógenos entéricos, durante a contaminação fecal-oral ambiental o que produz inúmeras consequências como o aumento da permeabilidade intestinal, a redução da capacidade absorptiva intestinal, a disbiose, translocação bacteriana e a progressiva estimulação do sistema imune, provocando inflamação crônica e, mais recentemente, foram descritas alterações metabolômicas e epigenéticas (CRANE, JONES, BERKLEY, 2015; HARPER et al, 2018; MAYNERIS-PERXACHS et al., 2016). Tais fatos favorecem a colonização a longo prazo da bactéria no hospedeiro, o que pode ocasionar em déficit de crescimento infantil sem causar as manifestações da diarreia (ROGAWSKI, GUERRANT, 2017).

Além disso, a partir da análise de 9.581 amostras fecais oriundas de crianças desnutridas e nutridas, como parte do projeto MAL-ED, obteve-se uma incidência de 27,5% de EAEC e quando investigado pelo menos uma infecção nos dois primeiros anos de vida da criança indicou um aumento da frequência para 94,8%, além da correlação da EAEC com a redução do crescimento linear relacionado infantil (ROGAWSKI et al. 2017).

As crianças assintomáticas do semiárido brasileiro, no atual estudo, apresentaram redução do índice de peso-por-altura (WHZ) escore-z em comparação com as crianças com quadro clínico diarreico. Contudo, as crianças assintomáticas não atingiram os valores de <-2 escores-z (WHZ), um parâmetro que ajuda a revelar atraso no crescimento linear infantil (OMS,

2017b). Nessa avaliação, apenas 3,5% da população estudada apresentou desnutrição, enquanto 16,4% exibiu evidências de sobrepeso ou obesidade.

Corroborando com os nossos dados, pesquisa realizada com a participação de 860 crianças da cidade de Maribondo, município da região do semiárido nordestino, mais especificamente no estado de Alagoas, mostrou a consolidação do antagonismo de uma maior prevalência de sobrepeso (24%) em contraste com o *déficit* estatural (9%) (RAMIRES et al. 2014).

Outro fator importante que contribui para patogênese da EAEC é a sua capacidade de estimular a resposta inflamatória do hospedeiro. Steiner et al. (1998) demonstraram que as crianças portadoras de EAEC como único patotipo identificado na presença diarreia tiveram elevações das concentrações de IL-1 β e lactoferrina fecal em relação aos controles. Segundo Prata et al, 2016, esse último biomarcador apresenta relação direta com os níveis de MPO fecal. Assim, em nossos resultados, também foram obtidas elevadas concentrações de MPO fecal em crianças com diarreia, quando comparado com os assintomáticos.

Ademais, as crianças com infecção subclínica do semiárido brasileiro apresentaram moderados níveis de MPO fecal similares as crianças eutróficas, participantes do estudo caso-controle de desnutrição infantil na cidade de Fortaleza, CE (HAVT et al. 2017). Como medida de prevenção da infecção, a fim de inibir o impacto inicial ou crônico da exposição à EAEC, indutora do processo inflamatório, sugere-se o aumento da duração do aleitamento o qual poderia proteger o infante contra o primeiro contato com a referida bactéria (ROGAWSKI et al., 2017).

Após o breve detalhamento do fenótipo da infecção causada pela EAEC na população infantil do semiárido brasileiro, apresenta-se como principal abordagem do presente estudo transversal, o comportamento do desfecho da presença ou ausência da diarreia que podem ser influenciados pela interindividualidade moldada pelos fatores genéticos atrelados à patobiologia do microrganismo, ou em adição, a uma exposição contínua subjacente a múltiplos patógenos.

Diversos estudos em progresso têm sido desenvolvidos para determinar a patogênese da EAEC, o que inclui pesquisas *in vivo* na avaliação da ativação de fímbrias, regulando a resposta inflamatória do hospedeiro (BOLICK et al., 2014; BOLL et al., 2012, 2017); modelos *in vitro* também estão sendo utilizados para a identificação GRVs ativos, bem como investigar seus mecanismos a nível molecular (MEDEIROS et al., 2013; CARVALHO et al., 2012; PRIYA et al., 2017; JØNSSON et al., 2015; 2017a; 2017b), além de pesquisas que avaliam a capacidade de

substâncias com efeito protetor contra a indução de dano intestinal causado pela referida bactéria (CARVALHO et al., 2012; PRATA et al. 2018). Contudo, ainda há escassez de estudos clínicos que relatem a versatilidade de fatores genéticos da EAEC associada às várias manifestações da infecção no hospedeiro. No entanto, pode-se afirmar que esse é o primeiro estudo a investigar os GRVs envolvidos à patobiologia da EAEC na população infantil do semiárido brasileiro.

Nos dados gerados na presente pesquisa, o gene homólogo à hexosiltransferase - *capU* (89,7%) foi o mais prevalente. CapU apresenta a capacidade de codificar 50% de proteína idêntica ao produto da biossíntese de lipossacarídeo (LPS) gerado pelo gene *rfbU* da *E. coli* O157:H7, que exibe um padrão homólogo da hexosiltransferase. Outras atividades de *CapU* é a resistência a ácidos do organismo (CZECZULIN et al., 1999; BARUA et al., 2002).

Diversas pesquisas vêm corroborando com os dados do presente trabalho. Boisen et al. (2012), em estudo caso-controle de diarreia moderada a severa, mostraram uma prevalência similar de *capU* (81,8%) em crianças residentes na cidade de Bamako, Mali. Em pesquisa realizada por Lima et al. (2013) detectaram *capU* em 90,9% das amostras fecais identificadas com EAEC, apresentando-se como o gene mais detectado em estudo de caso-controle de diarreia infantil no município de Fortaleza, Ceará.

Entre os 27 genes detectados, o codificador de AAF/III (*agg3A*) apresentou a menor prevalência (8,2%) nesta pesquisa. Diversas pesquisas também mostram uma baixa prevalência do gene *agg3A* como 7% (JENSEN et al., 2017), 5% (BOISEN et al., 2012), 1,5% (LIMA et al. 2013). As fímbrias de aderência agregativa (AAFs) promovem o primeiro processo de adesão na mucosa intestinal do hospedeiro, o que facilita a formação de biofilme e invasão (BERRY et al., 2014; GARCIA et al., 2000; LEE, MATTHEWS, GARNETT, 2016).

Em acordo com nossos resultados, a alta frequência do codificador da unidade estrutural da AAF/III-IV -*agg3/4C* (62,1%) encontrada foi similar à detecção em outras pesquisas com foco na população infantil, indicando uma variação entre 76,8% e 36,1% (BOISEN et al., 2012; LIMA et al., 2013; JENSEN et al., 2017; HAVT et al., 2017).

O codificador fimbrial de maior prevalência foi o codificador de AAF/V (*agg5A*), porém devido a sua recente descoberta, há poucos estudos epidemiológicos que relatem a frequência da AAF/5 (JØNSSON et al., 2015). Jønsson et al. (2015) relataram uma frequência de 12% em pacientes com a doença da diarreia dos viajantes na Dinamarca. Ademais, em estudo comparativo de diarreia aguda e persistente indicou, respectivamente, frequências de 22% e 20%

do gene *agg5A* em cepas isoladas de crianças dinamarquesas coletadas entre os anos de 2011 a 2012 (JENSEN et al., 2017).

Nosso estudo encontrou diferentes padrões de GRVs, dentre os quais o gene codificado da fímbria AAF/IV (*agg4A*) foi associado às crianças assintomáticas, enquanto os genes da proteína envolvida na colonização (*pic*) e do codificador da enterotoxina EspC (*espC*) foram correlacionados às crianças com diarreia. Corroborando com o nossos achados, Lima et al. (2013) também identificou o referido gene com a ausência de diarreia infantil.

Entre as SPATEs estudadas, *Pic* foi a segunda SPATE a ser identificada e apresenta diversas funções como a atividade de protease mucolítica, resistência ao soro e hemaglutinação, o que facilita o processo de colonização do hospedeiro (GUTIERREZ-JIMENEZ, ARCINIEGA, NAVARRO-GARCIA, 2008; HENDERSON et al, 1999). Ademais, *pic* foi a SPATE mais detectada em nossa pesquisa, dados similares foram encontrados em estudo caso-controle de diarreia infantil na Mirzapur, Bangladesh (CHATTAWAY et al., 2017). Pesquisa realizada por Jensen et al. (2017) mostrou que a combinação de *pic* e toxina autotransportadora secretada (*sat*), na ausência de codificador da AAF/I (*aggA*) pode favorecer a manifestação da diarreia persistente, em comparação à forma aguda dessa doença em crianças da Dinamarca.

Outro gene capaz de promover a diarreia foi o *espC* associado às cepas de EPEC e EHEC (GUINGNOT, SEGURA, VAN NHIEU, 2015). Todavia, ainda não existem relatos epidemiológicos que determinem a presença desse gene em cepas isoladas de EAEC. Além disso, na avaliação dos *clusters* genéticos, observa-se a relação entre a ausência de *agg4A*, com a presença de *espC* associada à indução da doença diarreica aguda nas crianças do Semiárido brasileiro.

Diversas pesquisas mostram diferentes sinergismos de *cluster* genéticos associados à presença ou ausência de doenças como a diarreia e desnutrição infantil. Lima et al. (2013) constatou o sinergismo no agrupamento da presença do codificador de fímbria *agg3/4C* e da ilha de ativação de controle transcricional (*aaiC*), diante da ausência dos genes *agg4A* e o regulador negativo de *aggR* (*aar*) correlacionado à diarreia infantil. Havt et al. (2017) mostrou o aglomerado dos genes *aar*, *pic*, *aag4A* e *capU* relacionados às crianças nutridas em estudo caso-controle de desnutrição infantil.

Tendo em vista estudos anteriores que visaram apenas a avaliação dos marcadores genéticos, em análises binárias, apenas entre a presença de diarreia e assintomáticos (BOISEN et

al., 2012; LIMA et al., 2013; HAVT et al., 2017; IKUMAPAY et al., 2017). Poucos estudos sugeriram a específica marcação dos GRVs na análise das manifestações clínicas e da avaliação da gravidade da diarreia (JENSEN et al., 2017). Considerando, assim, a escassez desses estudos clínicos, buscamos abordar tal objetivo neste trabalho mostrando a avaliação da dimensão do envolvimento individual e dos agrupamentos dos GRVs com a sintomatologia da infecção pela EAEC.

Descrevendo nossos achados de acordo com o grau de importância dos genes relacionados ao desenvolvimento da indução dos sintomas da diarreia, o gene *espC* apresentou-se como o principal preditor para a desidratação, aumento dos dias de diarreia, de evacuações por dia e da gravidade da doença, além da participação no *cluster* genético correlacionado ao vômito (*air+astA+espC+pet*). A atividade da EspC, proteína serina protease citotóxica, é reconhecido por favorecer o aparecimento de diarreia infantil (CLEMENTS et al., 2012).

EspC cliva a alfa-fodrina, proteína associada à actina no citoesqueleto e as proteínas de adesão, o que induz morte celular por necrose e através da via apoptótica mitocondrial, causando a redução dos níveis de expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e aumento da proteína pró-apoptótica Bax no citosol para a mitocôndria, o que conduz a liberação do citocromo c para o citoplasma e perda de potencial de membrana mitocondrial com a ativação de caspase-9 e -3 e por fim, a fragmentação e aumento da subpopulação G1 celular (SERAPIO-PALACIOS, NAVARRO-GARCIA, 2016; STEIN et al., 1996). Sugere-se que a morte celular pelo *espC* poderia favorecer um maior número de episódios de diarreia, conseqüentemente maior perda de eletrólitos e água ocasionado a desidratação e assim agravando a doença, como visto em nossos resultados.

O gene *pic* correlacionou-se aos sintomas de febre e dor abdominal (*-eatA+pic*) no presente estudo. Pic é uma protease que pode ser secretada por *Shigella flexneri*, EAEC e UPEC (DAUTIN et al., 2010). Além disso, Pic está envolvido no processo de hipersecreção e atividade mucolítica que é responsável pela diarreia mucoide (NAVARRO-GARCIA, 2014). Normalmente, esse gene não é associado a diarreia em estudos clínicos (BOISEN et al., 2012; LIMA et al., 2013; HAVT et al., 2017; IKUMAPAY et al., 2017). Contudo, em estudo coorte, em cepas de EAEC isoladas de crianças com e sem diarreia em comunidades carentes peruanas, mostrou, nas análises após a exclusão das coinfeções, *pic* como o único gene associado com a diarreia (DURAND et al., 2016). Recente pesquisa de perfil etiológico, caracterizaram 200 cepas

de EAEC isoladas de amostras fecais de crianças com e sem diarreia na Tailândia, onde identificou o gene *pic* como um preditor da doença (SERICHANTALERGS et al., 2017).

O papel do gene *astA*, conhecido como o codificador toxina termoestável A da EAEC - EAST-1 (SAVARINO et al., 1991), foi descrito anteriormente por sua capacidade de ativar adenilato ciclase, aumentando os níveis intracelular de monofosfato cíclico de guanosina (GMPC) nos enterócitos gerando uma resposta secretora (SAVARINO et al., 1991; 1993). Em nosso estudo, *astA* associou-se à aglomerados genéticos determinantes do desenvolvimento da desidratação (*+espC+pet+astA*) e vômito (*astA* sozinho ou *+air+astA+espC+pet*). Pesquisa realizada por Ikumapay et al. (2017) em caso-controle de diarreia infantil moderada a severa na zona rural de Gambia – África, demonstrou o mesmo gene associado a doença, principalmente, em crianças com a idade de 12 a 23 meses.

Certos fatores são independentes do controle do regulador transcricional (*aggR*), o que incluem toxina termoestável A da EAEC - EAST-1 (codificada por *astA*), as proteínas serina proteases (SPATES) e adesina air (BOISEN et al., 2012). Sugere-se que tal fato pode contribuir para a ativação dos genes na promoção dos sintomas. No presente estudo, identificou-se o gene *air* como um preditor da dor abdominal (*+air+astA+espC+pet*) e do aumento da gravidade da doença (*+air-agg4A+espC*) em combinação genética. Em acordo com nossos resultados, Nüesch-Inderbinen et al. (2013) apresentaram *air* associado a diarreia em adultos em estudo caso-controle na Suíça.

Uma importante SPATE encontrada foi *pet* que envolveu-se em *clusters* genéticos relacionados à indução de desidratação (*+espC+pet+astA*) e de vômito (*+air+astA+espC+pet*). Vários estudos caso-controle de diarreia em crianças e adultos revelaram o gene *pet* relacionados ao desenvolvimento da doença (BAFANDEH, HAGHI, ZEIGHAMI, 2015; LIMA et al., 2013; IKUMAPAY et al., 2017). De forma interessante, Pet apresenta mecanismos similares a EspC, atuando na alteração do citoesqueleto celular pela proteólise da alfa-fodrina o que produz efeitos citostáticos e enterotóxicos. Contudo, essas SPATEs apresentam padrões distintos na célula do hospedeiro. Pet entra na célula por endocitose mediada por um receptor e cliva a alfa-fodrina em uma única região. Já EspC é capturado no meio e injetado na célula pelo sistema de secreção tipo III, causando a ativação de mecanismos pró-apoptóticos e a clivagem da alfa-fodrina em duas diferentes regiões do alvo de Pet (NAVARRO-GARCIA; SONNESTED; TETER, 2010). Sugere-se, em nosso estudo, que essas duas toxinas combinadas apresentem efeito cumulativo na célula,

acarretando em morte celular que, por sua vez, resulta no processo diarreico e suas manifestações clínicas.

O gene *sepA* codifica uma protease imunomoduladora que apresenta, como função, a invasão celular e a indução de inflamação (DAUTIN, 2010; FAHERTY et al., 2012). Em vista dos dados do atual estudo, observa-se em diversas pesquisas que o referido gene foi correlacionado à diarreia infantil em infecções pela EAEC e a dor abdominal em casos de shigelose (BOISEN et al., 2012; IKUMAPAY et al., 2017; MEDEIROS et al., 2018; SERICHANTALERGS et al., 2017).

SigA é uma proteína que apresenta efeito citotóxico *in vitro*, causando alterações como o arredondamento e o desprendimento celular, além de clivagem de alfa-fodrina *in situ*. (DAUTIN, 2010). Nossos resultados mostrara a relação do gene *sigA* associado com a febre. Em busca na literatura, não foi encontrado relatos vinculados a diarreia infantil que associem esse gene na EAEC. Contudo, *sigA* foi identificado como um dos componentes da patobiologia da *E. coli* O104:H4 que causou um surto alimentar na Europa em 2011 (NAVARRO-GARCIA, 2014).

Entre as fímbrias relacionadas à diarreia, encontramos os genes codificadores de AAF/I (*aggA*) e AAF/II (*aafC*). Neste estudo, o gene *aggA* associou-se com a febre e, de modo paradoxal, com a redução dos dias de diarreia e de evacuações por dia, enquanto *aafC* foi relacionado aos casos de vômito. Ambas as AAF/I e AAF/II são altamente carregados positivamente, em pH fisiológico, onde ocorre a ligação destas duas variantes de AAF com a fibronectina, com base em interações eletrostáticas (BERRY et al., 2014)

Além disso, essas fímbrias podem contribuir para o processo inflamatório (BOLL et al., 2017). Especificamente AAF/II pode causar hemaglutinação dependente de temperatura em eritrócitos humanos tipo A (CZECZULIN et al., 1997). Estudos, caso-controle infantil, indicaram associação de *aggA* com diarreia (IKUMAPAY et al., 2017; SERICHANTALERGS et al., 2017) e de *aafC* com desnutrição (HAVT et al., 2017).

Os efeitos contraditórios da AAF/I podem estar vinculados aos relatos de Hinthong et al. (2015) que mostraram que o gene *aggA* apresenta maiores densidades de formações de biofilme quando a temperatura encontrava-se acima de 38°C. Abaixo de 37° C, esse gene não desenvolvia o biofilme, apresentando uma baixa densidade em cultura celular. Sugere-se que o gene *aggA* possa apresentar um efeito protetor; contudo, durante a manifestação da febre, o gene poderia ser ativado levando à produção de biofilme, o que favoreceria a colonização da bactéria.

As subunidade AAF/III (*agg3A*) correlacionou-se com o aumento de dias de diarreia. Ao contrário do estudo epidemiológico de diarreia em adultos, após a caracterização dos GRVs da EAEC, Nüesch-Inderbinen et al. (2013) relataram a região do *usher* da AAF/3 (*agg3C*) associado aos assintomáticos. Tais relatos poderiam contribuir para os mecanismo de virulência pertencente a EAEC, porém ainda são necessárias mais pesquisas para o entendimento de efeitos do maquinário genético no estímulo das manifestações clínicas.

A mudança do conteúdo plasmidial, como a deleção e alterações nos mecanismos bacterianos, como as modulações negativas podem atuar como estratégias para reduzir a virulência e permanecer ao longo prazo, colonizando o hospedeiro sem indução “aparente” de sintomas (NÜESCH-INDERBINEN et al., 2013).

Em nossos achados observamos uma diversidade de genes que desempenharam efeito protetor no portador. Entre esses, encontra-se o gene codificador da fímbria IV (*agg4A*), como citado previamente, sendo associado à ausência de diarreia infantil (LIMA et al., 2013); contudo os seus mecanismos de proteção ainda são desconhecidos. De forma similar ao dados encontrados no presente trabalho, estudos mostram o gene regulador negativo do controlado transcricional (*aar*) está relacionado à crianças assintomáticas, em avaliação de caso-controle de diarreia (BOISEN et al., 2012; LIMA et al., 2013).

EatA é uma SPATE que indicou efeitos citotóxicos similares identificados em EAST1, indicado pela capacidade de estimular adenilato ciclase adenosina (AMPc) causando aumento de secreção líquida nas alças intestinais de coelhos durante a infecção com o protótipo de ETEC H10407 (PATEL et al., 2004). Ademais, EatA apresenta uma homologia estrutural superior a 80% com SepA. Contudo, em nossos achados, observou-se associação do codificador dessa proteína com a não perpetuação de dor abdominal. Provavelmente, essa modulação pode estar relacionada com mecanismos desconhecidos de regulação negativa.

O *tsh* foi inicialmente identificado como um gene da cepa patogênica de *E. coli* aviária (APEC). Em geral, tal gene apresenta propriedades de hemaglutinação e também se liga ao colágeno IV e à fibronectina, sugerindo que pode atuar como uma adesina (DAUTIN, 2010). Recente estudo de diarreia aguda em crianças entre 12 a 59 meses atendidas na emergência de um hospital público de São Paulo, caracterizaram 193 isolados de EAEC das quais 0,5% das cepas apresentavam o referido gene (ANDRADE et al., 2017). No entanto, ainda é necessário mais pesquisas para definir os mecanismos competentes ao Tsh.

Além disso, EilA participa da formação de biofilme, o que contribui para colonização (SHEIKH et al., 2006). No presente trabalho, esse gene foi relacionado à ausência de febre. Tal fato, pode estar relacionado com a pesquisa desenvolvida por Hüttener et al. (2014) que mostrou reguladores negativos que ditam os níveis de EilA, causando a redução da formação do biofilme, por conseguinte, favorece a ausência de sintomas.

Atualmente, o conceito da presença e ausência do regulador transcricional (*aggR*) vem sendo amplamente utilizado para designar, respectivamente, a EAEC típica e atípica (HARRINGTON, DUDLEY, NATARO, 2006; ANDRADE, GOMES, ELIAS, 2014; ANDRADE et al., 2017). Diversos estudos mostram uma maior prevalência de EAEC típica, quando comparada com a atípica em estudos de diarreia infantil (TOKUDA et al., 2010; ANDRADE et al., 2017).

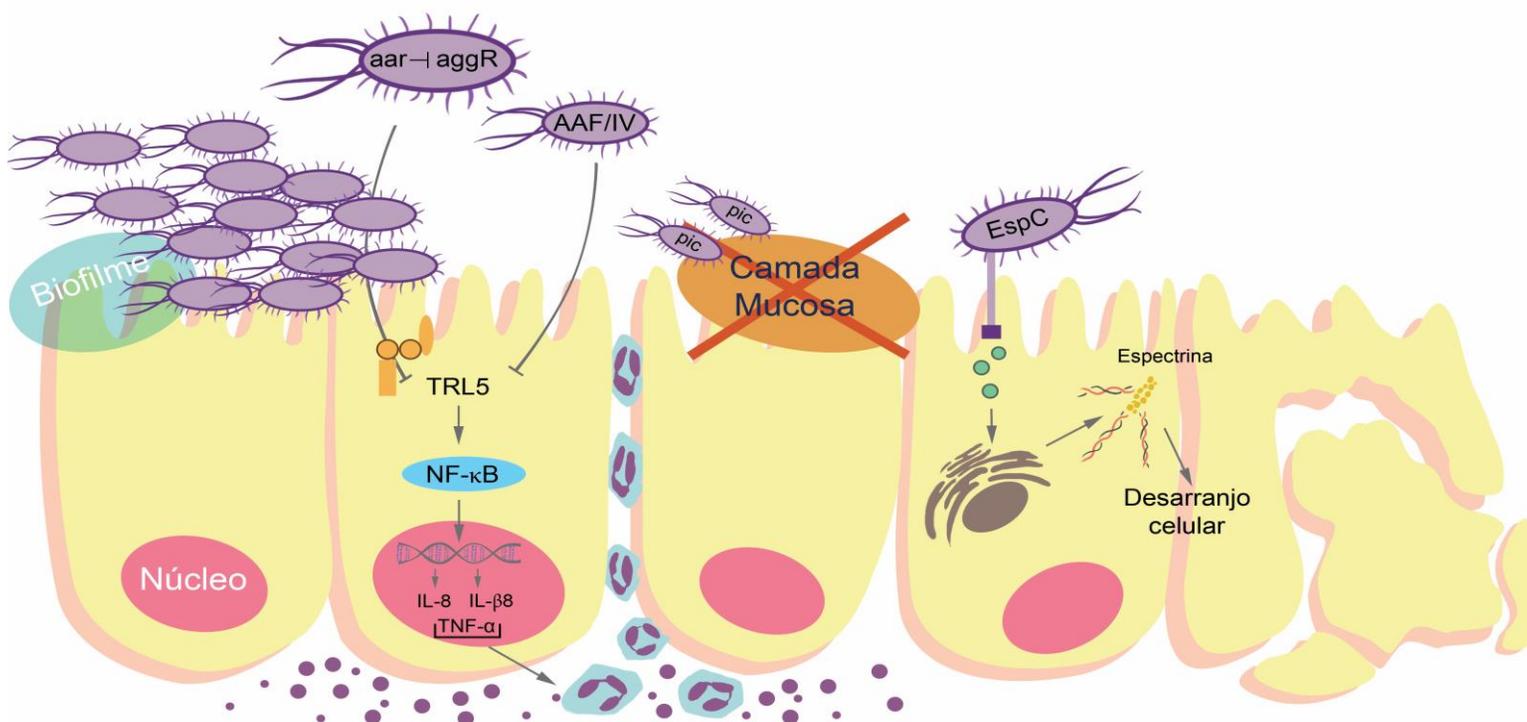
Os resultados aqui presentes também identificaram uma maior detecção de EAEC típica (81,9%) em comparação com a atípica (18,1%). Similar aos nossos dados, estimam-se ainda elevadas prevalências do gene *aggR*, variando de 88% a 59,2%, em pesquisas com diferentes desfechos clínicos como a diarreia e a desnutrição infantil (BOISEN et al., 2012; JENSEN et al., 2017; HAVT et al., 2017; LIMA et al., 2013). Ainda, no presente trabalho, mostrou-se a presença de *aggR* como um fator de proteção contra a febre. Em oposição aos resultados do nosso estudo, Sarantuya et. (2004), em estudo transversal de diarreia infantil na Mongólia, identificaram EAEC típica associada com a doença.

Como principais mecanismos encontrados em nossa pesquisa, destaca-se o codificador da fimbria *aggA4* e *aar* atuando como gerenciadores da modulação negativa de virulência, inibindo, provavelmente, o processo inflamatório durante o processo diarreico (LIMA et al., 2013; SANTIAGO et al., 2014; LIMA, MEDEIROS, HAVT, 2018). Além dos genes *espC* e *pic* causando, respectivamente, a destruição do citoesqueleto celular e a proteólise da camada mucolítica do epitélio intestinal, facilitando o processo de morte celular e colonização (SERAPIO-PALACIOS, NAVARRO-GARCIA, 2016; STEIN et al., 1996), como visto na

Figura

18.

Figura 18 – Modelo de patobiologia da infecção pela *Escherichia coli* enteroagregativa destacando os fatores associados a desfecho clínico observado no presente estudo



Fonte: Próprio autor. Legenda: Estudos sugerem que o controlador negativo do regulador transcricional (*aar*) e o codificador da subunidade AAF/IV (*agg4A*) modulam negativo o receptor de *Toll-like* 5 (TRL5), assim evitando a ativação do NF-κB, e por conseguinte, bloqueando o processo de expressão de citocinas com a interleucinas (IL-8; IL-1β) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α) o qual ativa o processo de migração neutrofílica (LIMA et al., 2013; LIMA, MEDEIROS, HAVT, 2018 ;SANTIAGO et al., 2014). Os genes do secretor da enterotoxina EspC (*espC*) e da proteína envolvida em colonização (*pic*) atuam como principais moduladores positivos de virulência. Pic apresenta atividade mucolítica o que facilita a invasão e colonização. EspC apresenta atividade citotóxica cliva a alfa-fodrina, proteína associada à actina no citoesqueleto e as proteínas de adesão, o que induz morte celular por necrose e através da via apoptótica mitocondrial, causando a redução dos níveis de expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e aumento da proteína pró-apoptótica Bax no citosol para a mitocôndria, o que conduz a liberação do citocromo c para o citoplasma e perda de potencial de membrana mitocondrial com a ativação de caspase-9 e -3 e por fim, a fragmentação e aumento da subpopulação G1 celular (SERAPIO-PALACIOS, NAVARRO-GARCIA, 2016; STEIN et al., 1996).

Inúmeros estudos mostram EAEC, especificamente, envolvida com as doenças diarreicas e desnutrição (BOISEN et al., 2012; LIMA et al., 2013; NÜESCH-INDERBINEN et al., 2013), contudo poucas pesquisas apresentam a importância do perfil das conjunções de múltiplos microrganismos durante o processo infeccioso, o que pode causar a persistência ou não da infecção, que dificulta o tratamento dessas doenças e acarreta em prejuízos no desenvolvimento infantil a longo prazo (KOSEK et al., 2014; LIMA et al., 2018).

Em geral, 77,2% das crianças estudadas apresentava pelo menos um enteropatógeno em interação com a EAEC, sendo as coinfeções mais prevalentes com a *E. coli* enteropatogênica atípica – aEPEC (43,5%), seguido de *Giardia lamblia* (18,1%) e *E. coli* enterotoxigênica – ETEC (15,9%). Corroborando com os nossos dados, na pesquisa internacional (MAL-ED) realizada na população infantil no Nordeste brasileiro, durante os anos de 2009 e 2012, apresentou *Campylobacter* spp., ETEC, *Cryptosporidium* spp. e EPEC atípica, como as mais frequentes copatogêneses, em crianças com infecções subclínicas da EAEC (LIMA et al., 2018).

Nessa avaliação citada, em sinergismo com a bactéria em estudo, quando avaliado a sua detecção em adição a dois ou mais enteropatógenos, resultou, principalmente, em déficit do crescimento linear no período da primeira infância (LIMA et al., 2018). Ainda no âmbito do estudo das coinfeções da EAEC na diarreia e desnutrição, os agentes mais detectados foram Norovirus GII (MOYO et al., 2017), Rotavirus (4,8%) (TOBIAS et al., 2015), *Dientamoeba fragilis* (60%) (JENSEN et al., 2016) e *Campylobacter* spp. (ROGAWSKI et al., 2017).

Considerando as crianças assintomáticas do nosso estudo, associou-se a EAEC com a detecção de *Giardia Lamblia* e a ausência da EPEC atípica. Em consonância como os achados do presente estudo, a pesquisa realizada por Bartelt et al. (2017) mostrou que a colonização simultânea de *Giardia Lamblia* e EAEC, em animais com dieta em deficiência proteica, contribui para redução do crescimento do hospedeiro. Além disso, essa interação causa uma modulação negativa do processo inflamatório, alterando o microbioma e os metabólicos do hospedeiro, o que poderia conduzir a uma infecção subclínica (BARTELT et al., 2017; ROGAWSKI; GUERRANT, 2017). Em análise multivariada dos sintomas da diarreia na coinfeção do nosso estudo, observa-se a redução da febre associada à *Giardia Lamblia*.

Norovírus, *E. coli* enteroinvasiva/Shigella spp., *Campylobacter* spp. foram correlacionados ao aumento do percentual de crianças com febre. Considerado o último agente que também apresentou relação direta com a elevação de evacuações por dia.

Em estudo de vigilância epidemiológica realizado na Inglaterra com amostras dos anos de 1993-1996 e 2008-2009, Chattaway et al. (2013) mostraram Norovírus e *Campylobacter* spp. como as coinfeções mais prevalentes com a EAEC e foram associados aos casos diarreicos. Pesquisa prospectiva de desnutrição infantil realizada na cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil, Lima et al. (2018) mostrou *Campylobacter* spp. como a coinfeção mais detectada com EAEC em adição a outros patógenos. Ademais, Tobias et al. (2015) mostram 0,5% de prevalência da copatogenese de *Shigella* spp. com a EAEC, após a avaliação 307 crianças com diarreia em três hospitais em Israel. Contudo, poucos estudos relataram a ocorrência das coinfeções e seus específicos sintomas na diarreia o que dificulta as análises, portanto enfatiza-se a necessidade de se desenvolver novas pesquisas nessa área.

As possíveis razões para os resultados obtidos das elevadas infecções e coinfeções subclínicas da EAEC são: (1) a excreção prolongada de alguns patógenos nas fezes durante a recuperação clínica (PLATTS-MILLS et al., 2015); (2) relação dos fatores de suscetibilidade do hospedeiro à infecção como a baixa responsividade do sistema imune o que pode ocorrer durante a desnutrição (3) transporte assintomático pode resultar em imunidade obtida após a continua ou prévia exposição aos mesmos patógenos devido as más condições de saneamento básico (MOYO et al., 2017).

Nosso estudo apresentou algumas limitações, quanto ao diferente tempo de coleta das amostras nos municípios, o que impede avaliar a sazonalidade. A análise da completude das amostras para os genes de virulência e as coinfeções poderia favorecer uma melhor compreensão do maquinário genético da infecção causada pela EAEC e suas copatogêneses ativas no desenvolvimento e na ausência da doença. Ademais, um estudo coorte de diarreia infantil no semiárido brasileiro poderia favorecer um melhor entendimento sobre fatores relacionados ao hospedeiro como os detalhes do crescimento infantil linear, além de uma investigação profunda sobre os fatores de evolução genética da bactéria ao longo dos anos.

7 CONCLUSÕES

- Este estudo demonstrou a EAEC como um importante enteropatógeno, correlacionado com a diarreia infantil no Semiárido brasileiro, com a detecção 53,8% das crianças com a diarreia e 46,1%, em assintomáticos.
- O entendimento sobre os determinantes epidemiológicos das infecções clínicas e subclínicas pode contribuir para o desenvolvimento de medidas preventivas da doença. Em nossa pesquisa, sugere-se que a exposição da EAEC nos seis primeiros meses de vida, o aleitamento materno não exclusivo e mães adolescentes e adultas jovens (idade de 14 a 25 anos) favorecem o aparecimento da diarreia inicial. Com a gradativa exposição poderia gerar infecções subclínicas que se associou a crianças no terceiro ano de vida, aleitamento materno não exclusivo e mães adultas, ainda a água não tratada mostrou-se como um potencial veículo da doença.
- A diversidade genética dos fatores de virulência microbianos tende a modular a progressão ou término da doença. O amplo painel de genes de virulência estudado indicou o gene codificador da enterotoxina EspC (*espC*) como um possível biomarcador de gravidade da doença diarreica na infecção causada pela EAEC. Em contrapartida, o gene regulador negativo do *aggR* (*aar*) poderia reduzir o efeito da perpetuação da diarreia. Fatos que podem contribuir para futuros estudos específicos como alvos terapêuticos de interesse da doença.
- Os dados sugerem que a influência das combinações genéticas pode alterar o comportamento individual, induzindo o sinergismo que propicia o desenvolvimento das manifestações clínicas como o gene codificador da fímbria IV (*agg4A*) correlacionado individualmente ao grupo controle, mas em associação com a hemaglutinina sensível à temperatura (*tsh*) e protease extracelular da *Shigella* (*sepA*) poderia induzir a febre.
- EAEC e *Giardia lamblia* apontam com um possível fator que influencia declínio do crescimento infantil (diminuição do z-escores WHZ) nas coinfeções subclínicas (ou assintomáticas). Mais estudos sobre o mecanismo dessa co-patogênese ainda são necessários.

REFERÊNCIAS

AHN, J. Y. et al. Clinical Characteristics and Etiology of Traveler's Diarrhea among Korean Travelers Visiting South-East Asia. **Journal Of Korean Medical Science**, v. 26, n. 2, p.196-12, 2011.

AL-HASANI, K. et al. The *sigA* gene, which is borne on the she pathogenicity island of *Shigella flexneri* 2a encodes an exported cytopathic protease involved in intestinal fluid accumulation. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 2457-2463, 2000.

ALVARES, A . A. et al. Koppen´s climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, . v22, n.6, p.711-28, 2014

AMARAL, M. S. M. Infecções por *Escherichia coli* Enteroagregativa: Prevalência e Genes de Virulência no Brasil. **Em Submissão**. Autor Correspondente: Marília Silveira Maia Gurgel do Amaral. E-mail: marilia_bruno@hotmail.com; Telefones: 55 085 3366 8440

ANDERSON, R. The Credit Scoring Toolkit: Theory and Praticce for Retail Credit Risk Management and Decision Automation. **Oxford: Oxford University Press**, 2007.

ANDRADE, J. A. B.; FREYMÜLLER, E.; FAGUNDES-NETO, U. Adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to the ileal and colonic mucosa: an in vitro study utilizing the scanning electron microscopy. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 3, n. 48, p.199-204, set. 2011.

ANDRADE, J. A. B.; HAAPALAINEN, E. F.; FAGUNDES-NETO, U. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a cause of persistent diarrhea: an experimental model using light microscopy. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 29, n. 1, 2011.

ANDRADE, F. B. et al. Distribution of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae in typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 50, p.83-86, 2017.

ANDRADE, F. B; GOMES, T. A. T; ELIAS, W. P. A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Microbiology Methods**, v. 106, p. 16-8, 2014.

ARAÚJO, J. M. et al. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3396-9, 2007.

BAFANDEH, S.; HAGHI, F.; ZEIGHAMI, H. Prevalence and virulence characteristics of enteroaggregative *Escherichia coli* in a case-control study among patients from Iran. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 519-524, mai. 2015.

- BARTELT, L. A. et al. Cross-modulation of pathogen-specific pathways enhances malnutrition during enteric co-infection with *Giardia lamblia* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Plos Pathogens**, v. 13, n. 7, p.1-1, 27 jul. 2017.
- BARUA, S. et al. Involvement of surface polysaccharides in the organic acid resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. **Molecular Microbiology**, v. 43, p. 629–640, 2002.
- BAUDRY, B. et al. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 161, n. 6, p. 1249-1251, 1990.
- BERRY, A. et al. Structural Insight into Host Recognition by Aggregative Adherence Fimbriae of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Plos Pathogens**, v. 10, n. 9, 18 set. 2014.
- BIELASZEWSKA, M. et al. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 9, p.671-676, set. 2011.
- BLOUNT, Z. D. The unexhausted potential of E. coli. **Elife**, v. 4, 25 mar. 2015
- BOISEN, N. et al. Genomic Characterization of Enteroaggregative *Escherichia coli* From Children in Mali. **Journal Of Infectious Diseases**, Inglaterra, v. 205, n. 3, p.431-444, 19 dez. 2012
- BOLICK, D. T et al. Zinc deficiency alters host response and pathogen virulence in a mouse model of enteroaggregative *Escherichia coli*-induced diarrhea. **Gut Microbes**, v. 5, p. 618-627, 2014.
- BOLL, E. J. et al. The Fimbriae of Enteroaggregative *Escherichia coli* Induce Epithelial Inflammation In Vitro and in a Human Intestinal Xenograft Model. **The Journal Of Infectious Diseases**, v. 206, n. 5, p.714-722, 21 jun. 2012.
- BOLL, E. J. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* Adherence Fimbriae Drive Inflammatory Cell Recruitment via Interactions with Epithelial MUC1. **Mbio**, v. 8, n. 3, p.e00717-17, 6 jun. 2017.
- BOLL, E. J.; MCCORMICK B. A. A new understanding of enteroaggregative *Escherichia coli* as an inflammatory pathogen. **Cell Adhesion & Migration**, v. 6, n. 5, p.413-418, 20 set. 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. SAÚDE DA CRIANÇA: **Nutrição Infantil, Aleitamento Materno e Alimentação Complementar**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. . Disponível em: < http://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/pdfs/Aleitamento_Complementar_MS.pdf>. Acesso em: 1 abr 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Orientações para coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde: norma técnica do sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional - SISVAN. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <http://dab.saude.gov.br/portaldab/biblioteca.php?conteudo=publicacoes/orientacoes_coleta_analis_e_dados_antropometricos> Acesso em: 1 abr. 2018.

BRASIL. Análise de Resultados para Brasil - 2011 a 2015- RADAR. ATLAS DE DESENVOLVIMENTO HUMANO NO BRASIL. 2015a Disponível em: <<http://atlasbrasil.org.br/2013/pt/radar-idhm/>>. Acesso em: 23 maio 2017.

BRASIL. **Saúde Brasil 2014: uma análise da situação de saúde e das causas externas.** Ministério da saúde 2015b Disponível em: <<http://tabnet2.datasus.gov.br/cgi/idb2013/matriz.htm>>. Acesso em: 23 maio 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Datasus: informações de saúde.** Departamento de Informática do SUS. DATASUS, 2015c Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>> Acesso em: 1 abr. 2018.

BRASIL. Delimitação do semiárido. **Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste (SUDENE).** 2017. Disponível em: <http://sudene.gov.br/planejamento-regional/delimitacao-do-semiarido>>. Acesso em: 10 maio 2018.

BRUNDER, W.; SCHMIDT, H.; KARCH, H. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. **Molecular Microbiology**, v. 24, p. 767–778, 1997.

BUERIS, V. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 839-44, 2007.

CAMARA, N. O. S. Luminex 200™ – BIOPLEX 200. 2014. Disponível em: <http://www.icb.usp.br/~imunoicb/?page_id=1245>. Acesso em: 23 maio 2017.

CARVALHO, B. et al. Goat milk with and without increased concentrations of lysozyme improves repair of intestinal cell damage induced by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Bmc Gastroenterology**, v. 12, n. 1, p.106, 11 ago. 2012.

CENNIMO, D. et al. The prevalence and virulence characteristics of enteroaggregative *Escherichia coli* at an urgent-care clinic in the USA: a case-control study. **Journal Of Medical Microbiology**, v. 58, n. 4, p.403-407, 1 abr. 2009.

CHATTAWAY, M. A. et al. Investigating the link between the presence of enteroaggregative *Escherichia coli* and infectious intestinal disease in the United Kingdom, 1993 to 1996 and 2008 to 2009. **Euro surveillance**, v.18, n.37, 12 set. 2013.

- CHATTAWAY, M. A. et al. Clonality, virulence and antimicrobial resistance of enteroaggregative *Escherichia coli* from Mirzapur, Bangladesh. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 1429-1435, Out 2017.
- CHAUDHURI, R. R. et al. Complete Genome Sequence and Comparative Metabolic Profiling of the Prototypical Enteroaggregative *Escherichia coli* Strain 042. **Plos One**, Estados Unidos, v. 5, n. 1, p.e8801-19, 20 jan. 2010.
- 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.
- CLERMONT, et al. *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**. v.5, n.1, p.58–65, 2013.
- COBELJIC, M. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhea in a neonatal nursery ward. **Epidemiology and Infection**. v. 117, n. 1, p. 11-16, 1996.
- CONNOR, B. A. Perspectives: Antibiotics in Travelers' Diarrhea - Balancing the Risks & Benefits. **Center for Disease Control and Prevention – CDC, 2017**. Acesso: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/the-pre-travel-consultation/travelers-diarrhea>. Disponivel em: 6 de abril de 2018.
- CRANE, R. J.; JONES, K. D. J.; BERKLEY, J. A. Environmental Enteric Dysfunction: An Overview. **Food And Nutrition Bulletin**, v. 36, n. 11, p.76-87, mar. 2015.
- CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 26-38, 2010.
- CROXEN, M. A. et al. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p.822-880, 1 out. 2013
- CZECZULIN, J. R. et al. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 4135–4145, 1997.
- CZECZULIN, J. R. et al. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 6, p. 2692-9, Jun 1999.
- DALLMAN, T. J. et al. An Investigation of the Diversity of Strains of Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolated from Cases Associated with a Large Multi-Pathogen Foodborne Outbreak in the UK. **Plos One**, v. 9, n. 5, p.e98103, 20 maio 2014.
- DAUTIN, N. Serine protease autotransporters of enterobacteriaceae (SPATEs): biogenesis and function. **Toxins (Basel)**, v. 2, n. 6, p. 1179-206, 06 2010.

DIAS, R.C. B. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brasil. **APMIS Journal of Pathology, Microbiology and Immunology**. v. 124, n. 4, p. 299-308, 2016.

DOBRINDT, U. et al. Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*. **Medical Microbiology And Immunology**, v. 199, n. 3, p.145-154, 6 maio 2010.

DUDLEY, E. G. et al. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a pheU pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 5, p.1267-1282, set. 2006a.

DUDLEY, E. G. et al. An IncII Plasmid Contributes to the Adherence of the Atypical Enteroaggregative *Escherichia coli* Strain C1096 to Cultured Cells and Abiotic Surfaces. **Infection And Immunity**, v. 74, n. 4, p.2102-2114, 21 mar. 2006b.

DURAND, D. et al. Pic gene of enteroaggregative *Escherichia coli* and its association with diarrhea in Peruvian children. **Pathogens And Disease**, v. 74, n. 6, p. ftw054, 14 jun. 2016.

ELIAS, W. P. et al. Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhea. **Epidemiology & Infection**, Inglaterra, v. 1, n. 129, p.49-55, ago. 2002.

ELIAS, W. P.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). **Escherichia coli In The Americas**, p.27-57, 2016.

ESLAVA, C. et al. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**. v. 66, p. 3155-3163, 1998.

ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 66, n. 3, p.281-298, dez. 2012.

FAHERTY, C. et al. Chromosomal and Plasmid-Encoded Factors of *Shigella flexneri* Induce Secretogenic Activity *Ex Vivo*. **Plos One**, v. 7, n. 11, p. e49980, 16 nov. 2012.

FARFAN, M. J.; INMAN, K. G.; NATARO, J. P. The Major Pilin Subunit of the AAF/II Fimbriae from Enteroaggregative *Escherichia coli* Mediates Binding to Extracellular Matrix Proteins. **Infection And Immunity**, v. 76, n. 10, p.4378-4384, 30 jun. 2008.

FOSTER, M. A. et al. Enteropathogenic and enteroaggregative *E. coli* in stools of children with acute gastroenteritis in Davidson County, Tennessee. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, v. 83, n. 3, p.319-324, nov. 2015.

FRANÇA, F. L. S. et al. Genotypic and Phenotypic Characterisation of Enteroaggregative *Escherichia coli* from Children in Rio de Janeiro, Brazil. **Plos One**, v. 8, n. 7, p.69971-69979, 30 jul. 2013.

FRANK, C. et al. Epidemic Profile of Shiga-Toxin–Producing *Escherichia coli* O104: H4 Outbreak in Germany. **New England Journal Of Medicine**, v. 365, n. 19, p. 1771-1780, 10 nov. 2011.

FRANZOLIN, M. R. et al. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p.359-363, jul. 2005.

FRATAMICO, P. M. et al. Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*. **Frontiers In Microbiology**, v. 7, 3 mai. 2016.

FUJIYAMA, R. et al. The *shf* Gene of a *Shigella flexneri* Homologue on the Virulent Plasmid pAA2 of Enteroaggregative *Escherichia coli* 042 Is Required for Firm Biofilm Formation. **Current Microbiology**, v. 56, n. 5, p.474-480, 22 fev. 2008

FUNDO DA NAÇÕES UNIDAS PARA INFÂNCIA (UNICEF). **Situação Mundial da Infância 2011. Adolescência: uma fase de oportunidades. Relatório Brasil**, 2011. Disponível em: <https://www.unicef.org/brazil/pt/br_sowcr11web.pdf>. Acesso em: 23 mai. 2017.

FUNDO DA NAÇÕES UNIDAS PARA INFÂNCIA (UNICEF). **One is too many**, 2016. Disponível em: <<https://data.unicef.org/wp-content/uploads/2016/11/UNICEF-Pneumonia-Diarrhoea-report2016-web-version.pdf>>. Acesso em: 23 mai. 2017.

FUNDO DA NAÇÕES UNIDAS PARA INFÂNCIA (UNICEF). **Aleitamento Materno Global**. 2018. Disponível em: <<https://www.unicef.org/breastfeeding/>>. Acesso em: 1 abr. 2018.

GARCIA, M. I. et al. Characterization of the AfaD-like family of invasions encoded by pathogenic *Escherichia coli* associated with intestinal and extra-intestinal infections. **FEBS Letters**, v. 479, n. 3, p. 111-117, ago. 2000.

GARCIA, P. G.; SILVA, V. L.; DINIZ, C. G... Occurrence and antimicrobial drug susceptibility patterns of commensal and diarrheagenic *Escherichia coli* in fecal microbiota from children with and without acute diarrhea. **The Journal Of Microbiology**, v. 49, n. 1, p.46-52, fev. 2011.

GEORGE, C. et al. Risk Factors for Diarrhea in Children Under Five Years of Age Residing in Peri-urban Communities in Cochabamba, Bolivia. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 91, n. 6, p.1190-1196, 3 dez. 2014

GOMES, A.t. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 47, p.3-30, dez. 2016.

GREENBERG, D. E. et al. Markers of Inflammation in Bacterial Diarrhea among Travelers, with a Focus on Enteroaggregative *Escherichia coli* Pathogenicity. **The Journal Of Infectious Diseases**, v. 185, n. 7, p. 944-949, abr. 2002.

GUERRANT et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. **Clinical infectious diseases**. v. 23, n. 3, p.331-351, 2001.

GUIGNOT, J. SEGURA, A.; VAN NHIEU, G. T.. The Serine Protease EspC from Enteropathogenic *Escherichia coli* Regulates Pore Formation and Cytotoxicity Mediated by the Type III Secretion System. **Plos Pathogens**, v. 11, n. 7, p.e1005013, 1 jul. 2015.

GUPTA, D. et al. Virulence determinants in enteroaggregative *Escherichia coli* from North India and their interaction in *in vitro* organ culture system. **Fems Microbiology Letters**, v. 363, n. 17 3 ago. 2016

GUTIERREZ-JIMENEZ, J.; ARCINIEGA, I.; NAVARRO-GARCIA, F. The serine protease motif of Pic mediates a dose-dependent mucolytic activity after binding to sugar constituents of the mucin substrate. **Microbial Pathogenesis**, v. 45, p. 115-23, 2008.

GUYER, D. M. et al. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**. v. 38, p. 53–66, 2000.

HACKER, J.; HENTSCHEL, U.; DOBRINDT, U. Prokaryotic chromosomes and disease. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 790-793, 2003.

HARADA, T. A food poisoning diarrhea outbreak caused by enteroaggregative *Escherichia coli* serogroup O126:H27 in Shizuoka, Japan. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 60, p. 154-155, 2007.

HARPER, K. M. et al. Environmental enteric dysfunction pathways and child stunting: A systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, 2018.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiology Letters**, v.254, p. 12-18, 2006.

HAVT, et al. Prevalence and virulence gene profiling of enteroaggregative *Escherichia coli* in malnourished and nourished Brazilian children. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, v. 89, n. 2, p.98-105, out. 2017.

HENDERSON, I. R et al. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 5587-5596, 1999.

HICKS, S.; CANDY, D. C.; PHILLIPS, A. D. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa *in vitro*. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 4751-4760, 1996.

HINTHONG, W. et al. Effect of Temperature on Fimbrial Gene Expression and Adherence of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, v. 12, n. 8, p.8631-8643, 23 jul. 2015.

HOUPY, E. et al. Microbiologic methods utilized in the MAL-ED cohort study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, p.S225, 2014.

HUANG, D. B. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 556-6, 2006.

HÜTTENER, M. et al. HilA-like regulators in *Escherichia coli* pathotypes: the YgeH protein from the enteroaggregative strain 042. **Bmc Microbiology**, v. 14, n. 1, 25 out. 2014.

IKUMAPAYI, U. N. et al. Identification of Subsets of Enteroaggregative *Escherichia coli* Associated with Diarrheal Disease among Under 5 Years of Age Children from Rural Gambia. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 97, n. 4, p.997-1004, 11 out. 2017.

INGERSOLL, M. A. et al. The ShiA protein encoded by the *Shigella flexneri* SHI-2 pathogenicity island attenuates inflammation. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 797-807, nov. 2003.

INGERSOLL, M. A.; ZYCHLINSKY, A. ShiA Abrogates the Innate T-Cell Response to *Shigella flexneri* Infection. **Infection And Immunity**, v. 74, n. 4, p. 2317-2327, 21 mar. 2006.

ITOH, Y. et al. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. **Journal Clinical Microbiology**. v. 35, p. 2546–50, 1997.

JENSEN, B. H. et al. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, p. 614-630, 2014.

JENSEN, B. H. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* in Daycare—A 1-Year Dynamic Cohort Study. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, v. 6, 13 jul. 2016.

JENSEN, B. H. et al. Genetic Virulence Profile of Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains Isolated from Danish Children with Either Acute or Persistent Diarrhea. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, v. 7, 30 mai. 2017.

JIANG, Z. D. et al. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 4185-4190, 2002.

JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 4, p. 750-774, 2009.

JØNSSON, R. et al. Novel aggregative adherence fimbria variant of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 83, p. 1396-405, 2015.

JØNSSON, R. et al. A Novel pAA Virulence Plasmid Encoding Toxins and Two Distinct Variants of the Fimbriae of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Frontiers In Microbiology**, v. 8, 22 fev. 2017a.

- JØNSSON, R. et al. Structural and functional studies of *Escherichia coli* aggregative adherence fimbriae (AAF/V) reveal a deficiency in extracellular matrix binding. **BBA Proteins and Proteomics**, v. 1865, n. 3, p. 304-311, mar. 2017b.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 123-140, 2004.
- KHAN, K. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* infection induces IL-8 production via activation of mitogen-activated protein kinases and the transcription factors NF- κ B and AP-1 in INT-407 cells. **Molecular And Cellular Biochemistry**, v. 337, n. 1-2, p. 17-24, 24 out. 2010.
- KHAN, M. A. S.; KANG, J.; STEINER, S. Enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin-induced interleukin-8 secretion requires Toll-like receptor 5-dependent p38 MAP kinase activation. **Immunology**, v. 112, n. 4, p.651-660, ago. 2004.
- KEUSCH, G. T. et al. Environmental Enteric Dysfunction: Pathogenesis, Diagnosis, and Clinical Consequences. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 4, p.207-212, 1 nov. 2014.
- KOTLOFF, K. L. et al. Burden and aetiology of diarrheal disease in infants and young children in developing countries (the global enteric multicenter study, GEMS): a prospective, case-control study. **The Lancet**, v. 382, p. 209-22, 2013.
- KOSEK, M. et al. Assessment of Environmental Enteropathy in the MAL-ED Cohort Study: Theoretical and Analytic Framework. **Clinical Infectious Diseases** v.59, n. 4, p. S239-47, 2014.
- LÄÄVERI, T. et al. A prospective study of traveller's diarrhea: analysis of pathogen findings by destination in various (sub) tropical regions. **Clinical Microbiology And Infection**, nov. 2017.
- LEE, G. O. et al. A Comparison of Diarrheal Severity Scores in the MAL-ED Multisite Community-Based Cohort Study. **Journal Of Pediatric Gastroenterology And Nutrition**, v. 63, n. 5, p.466-473, nov. 2016.
- LEE, W.; MATTHEWS, S.; GARNETT, J. A. Crystal structure and analysis of HdaB: The enteroaggregative *Escherichia coli* AAF/IV pilus tip protein. **Protein Science**, v. 25, n. 10, p. 1898-1905, 1 ago. 2016.
- LEIMBACH, A.; HACKER, J.; DOBRINDT, U. *E. coli* as an All-Rounder: The Thin Line Between Commensalism and Pathogenicity. **Between Pathogenicity And Commensalism**, p. 3-32, 2013.
- LIEBCHEN, A. et al. Characterization of *Escherichia coli* Strains Isolated from Patients with Diarrhea in São Paulo, Brazil: Identification of Intermediate Virulence Factor Profiles by Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 2274-2278, 2011.
- LIMA, A. A. M. et al. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Paediatrica**, v. 381, p. 39-44, 1992.

LIMA, A. A. M. et al. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. **The Journal of infectious diseases**, v. 181, n. 5, p.1643-1651, 2000.

LIMA, A. A. M. et al. Determinant Variables, Enteric Pathogen Burden, Gut Function and Immune-related Inflammatory Biomarkers Associated With Childhood Malnutrition: A Prospective Case-Control Study in Northeastern Brazil. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 36, n. 12, p. 1177-1185, 2017.

LIMA, A. A. M. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* Subclinical Infection and Coinfections and Impaired Child Growth in the MAL-ED Cohort Study. **Journal Of Pediatric Gastroenterology And Nutrition**, v. 66, n. 2, p. 325-333, fev. 2018.

LIMA, A. A. M. et al. Etiology, clinical severity and environmental factors associated with diarrheal diseases in infants at semiarid region in Brazil: a case-control study. Em Submissão. Autor Correspondente: Aldo AM Lima, PhD, E-Mail: alima@ufc.br; Telefones: 55 085 3366 8445 ou -8437.

LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea in children: epidemiology, risk factors, pathophysiology, nutritional impact, and management. **Epidemiologic Reviews**, v. 14, p. 222–242. 1992.

LIMA, A. A. M.; MEDEIROS, P. H. Q. S.; HAVT, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* subclinical and clinical infections. **Current Opinion In Infectious Diseases**, v. 31, n. 5, p. 433 – 439, jul. 2018.

LIMA, I. F. N. et al. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. **Journal Of Medical Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 683-693, 21 fev. 2013.

LIU, J. et al. Multiplex reverse transcription PCR Luminex assay for detection and quantitation of viral agents of gastroenteritis. **Journal of Clinical Virology**, v. 50, n. 4, p. 308-313, 2011.

LIU, J. et al. Simultaneous detection of six diarrhea-causing bacterial pathogens with an in-house PCR-luminex assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 1, p. 98-103, 2012.

MARQUES, C. S. Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanitizantes químicos. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MATHEWSON, J. J. et al. A newly recognized cause of traveler's diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 151, n. 3, p. 471-475, 1985.

MAYER, H. B.; WANKE, C. A. Enteroaggregative *Escherichia coli* As a Possible Cause of Diarrhea in an HIV-Infected Patient. **New England Journal Of Medicine**, v. 332, n. 4, p. 273-274, 26 jan. 1995.

- MAYNERIS-PERXACHS, J. et al. Urinary N-methylnicotinamide and β -aminoisobutyric acid predict catch-up growth in undernourished Brazilian children. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 27 jan. 2016.
- MEDEIROS, P. H. Q. S. et al. The micronutrient zinc inhibits EAEC strain 042 adherence, biofilm formation, virulence gene expression, and epithelial cytokine responses benefiting the infected host. **Virulence**, v. 4, n. 7, p.624-633, out. 2013.
- MEDEIROS, P. H. Q. S. et al. Molecular characterization of virulence and antimicrobial resistance profile of *Shigella* species isolated from children with moderate to severe diarrhea in northeastern Brazil. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, v. 90, n. 3, p.198-205, mar. 2018.
- MEDINA, A. M. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* in Human Immunodeficiency Virus (HIV) Pediatric Patients in Lima, Perú. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 83, n. 1, p.158-163, 1 jul. 2010.
- MOORE, S. R. et al. Prolonged Episodes of Acute Diarrhea Reduce Growth and Increase Risk of Persistent Diarrhea in Children. **Gastroenterology**, v. 139, n. 4, p.1156-1164, out. 2010.
- MORENO, A. C. R. et al. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, 00, v. 66, n. 1, p.50-57, jan. 2010.
- MORIN, N. et al. Characterization of the AggR regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 81, p. 122-132, 2013.
- MOYO, S. J. et al. Comprehensive Analysis of Prevalence, Epidemiologic Characteristics, and Clinical Characteristics of Monoinfection and Coinfection in Diarrheal Diseases in Children in Tanzania. **American journal of epidemiology**. v.186, n.9, p. 1074-1083, 2017.
- NATARO, J. P et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 6, n. 9, p. 829-831, 1987.
- NATARO, J. P. et al. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 171, n. 2, p. 465-468, 1995.
- NATARO, J. P. et al. T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 11, p. 4761-8, nov. 1996.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.
- NATARO, J. P.; STEINER, T.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Disease**, v. 4, n. 2, p. 251-261, 1998.
- NAVARRO-GARCIA, F. *Escherichia coli* O104: H4 Pathogenesis. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 6, 10 dez. 2014.

NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. **Gut Microbes**, v. 2, n. 1, p. 13-24, jan. 2011.

NAVARRO-GARCIA, F.; SONNESTED, M.; TETER, K. Host-Toxin Interactions Involving EspC and Pet, Two Serine Protease Autotransporters of the Enterobacteriaceae. **Toxins**, v. 2, n. 5, p.1134-1147, 14 mai. 2010.

NEZARIEH, R. et al. Distribution of Virulence Genes, Enterotoxin and Biofilm Formation Among Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) Strains Isolated From Stools of Children With Diarrhea in South East Iran. **Archives Of Pediatric Infectious Diseases**, v. 3, n. 3, 20 jul. 2015.

NIEHAUS, M. D. et al. Early childhood diarrhea is associated with diminished cognitive function 4 to 7 years later in children in a northeast Brazilian shantytown. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 66, p. 590–593, 2002.

NÜESCH-INDERBINEN, M. T. et al. Characteristics of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from healthy carriers and from patients with diarrhoea. **Journal Of Medical Microbiology**, v. 62, n. 12, p.1828-1834, 5 set. 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Child Grow Standards - WHO Anthro (version 3.2.2)**, 2011. Disponível em: < <http://www.who.int/childgrowth/software/en/>>. Acesso em: 23 maio 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **WHO Babies and mothers worldwide failed by lack of investment in breastfeeding**. 2017a. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/lack-investment-breastfeeding/en/> >. Acesso em: 1 abr 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **WHO - Global Database on Child Growth and Malnutrition**. 2017b. Disponível em: <<http://www.who.int/nutgrowthdb/about/introduction/en/index3.html>>. Acesso em: 23 maio 2017.

PATEL, S. K. et al. Identification and Molecular Characterization of EatA, an Autotransporter Protein of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infection And Immunity**, v. 72, n. 3, p.1786-1794, 20 fev. 2004.

PAVLINAC, P. B. et al. High-risk enteric pathogens associated with HIV infection and HIV exposure in Kenyan children with acute diarrhea. **Aids**, v. 28, n. 15, p.2287-2296, set. 2014.

PEREIRA, A. L.; FERRAZ, L. R.; SILVA, R. S.; GIUGLIANO, L. G. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence markers: positive association with distinct clinical characteristics and segregation into 3 enteropathogenic *E. coli* sero- groups. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, p. 366-374, 2007.

- PINTO, F. A. et al. Symbiotic interactions between *Escherichia coli* and humans: the instability of a relationship. **HCPA**, v.31, n.4, p. 451-455, 2011.
- PLATTS-MILLS, J. A. et al. Pathogen-specific burdens of community diarrhea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). **The Lancet Global Health**, v. 3, n. 9, p. 564-575, set. 2015.
- PLATTS-MILLS, J. A. et al. Association between enteropathogens and malnutrition in children aged 6–23 mo in Bangladesh: a case-control study. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, v. 105, n. 5, p. 1132-1138, 5 abr. 2017.
- PRATA, M. M. G. et al. Comparisons between myeloperoxidase, lactoferrin, calprotectin and lipocalin-2, as fecal biomarkers of intestinal inflammation in malnourished children. **Journal of Translational Science**, v. 2, n. 2, p. 134-139, 2016.
- PRATA, M. M. G. et al. Alanyl-Glutamine protects against damage induced by enteroaggregative *Escherichia coli* strains in intestinal cells. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, p 1-10, set. 2018.
- PRIYA, A. et al. Cell cycle arrest and apoptosis induced by enteroaggregative *Escherichia coli* in cultured human intestinal epithelial cells. **Journal Of Medical Microbiology**, v. 66, n. 2, p.217-225, 1 fev. 2017
- PROVENCE, D. L.; CURTISS R. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 1369-1380, 1994.
- RAJAN et al. Novel Segment- and Host-Specific Patterns of Enteroaggregative *Escherichia coli* Adherence to Human Intestinal Enteroids. **mBio**. v. 9, n.1, p. e02419-17, 2018.
- RAMIRES, E. K. N. M. et al. Estado nutricional de crianças e adolescentes de um município do semiárido do Nordeste brasileiro. **Revista Paulista de Pediatria**, v.32, n.3, p.200-207, 2014.
- REGUA-MANGIA, A. H. et al. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhea in Rio de Janeiro, Brazil. **The Journal of infection**, v. 48, n. 2, p.161-167, fev. 2004.
- REGUA-MANGIA, A. H. et al. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC): filotipagem e resistência a antimicrobianos em um enteropatógeno emergente. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 1, n. 38, p. 27-34, jan. 2009.
- RICKARD, A. H. et al. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 11, p. 94-100, 2003.
- RODRIGUES, V. C. et al. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* and rotavirus among children from Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n.11, p. 1311-1318, nov. 2002.

ROGAWSKI, E. T. et al. Epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* infections and associated outcomes in the MAL-ED birth cohort. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1-1, 24 jul. 2017.

ROGAWSKI, E. T.; GUERRANT, R. L. The Burden of Enteropathy and “Subclinical” Infections. **Pediatric Clinics Of North America**, v. 64, n. 4, p.815-836, ago. 2017.

RUIZ-PEREZ, F.; NATARO, J.P. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 71, p. 745-70, 2014.

SALVADORI, M. R. et al. Vacuolating cytotoxin produced by avian pathogenic *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 45, p. 43–51, 2001.

SAMIE, A. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* in Venda, South Africa: distribution of virulence-related genes by multiplex polymerase chain reaction in stool samples of human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative individuals and primary school children. **The American Journal of tropical medicine and hygiene**. v. 77, n. 1, p. 142-150. 2007.

SANDT, C. H.; HILL, C. W. Four different genes responsible for nonimmune immunoglobulin-binding activities within a single strain of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 2205–2214, 2000.

SANTIAGO, A. E. et al. A Large Family of Antivirulence Regulators Modulates the Effects of Transcriptional Activators in Gram-negative Pathogenic Bacteria. **Plos Pathogens**, v. 10, n. 5, p. e1004153, 2014.

SARANTUYA et al. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 1, p.133-139, jan. 2004.

SAVARINO, S. J. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an *in vitro* rabbit intestinal model. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 87, n. 4, p. 1450–1455 , 1991.

SAVARINO, S. J. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 7, p. 3093-7, 1993.

SCAVIA, G. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with a foodborne outbreak of gastroenteritis. **Journal Of Medical Microbiology**, v. 57, n. 9, p. 1141-1146, 1 set. 2008.

SCHEUTZ, F. et al. Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. **Eurosurveillance**, Europa, v. 24, n. 16, p.1-6, jun. 2011.

SCHIFFRIN, E J; BLUM, S. Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, Suppl 3, p. S60-S64, 2002.

SCHMIDT, H. et al. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, p. 701–705, 1995.

SCHMIDT, H et al. Identification and characterization of a novel genomic island integrated at *selC* in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 6863–6873, 2001.

SERAPIO-PALACIOS, A. NAVARRO-GARCIA, F. EspC, an Autotransporter Protein Secreted by Enteropathogenic *Escherichia coli*, Causes Apoptosis and Necrosis through Caspase and Calpain Activation, Including Direct Procaspase-3 Cleavage. **Mbio**, v. 7, n. 3, p.e00479-16, 21 jun. 2016.

SERICHANTALERGS, O. et al. Distribution and Molecular Characterization of Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolated from Children in A Case-control Study of Acute Diarrhea in Thailand. **Clinical Microbiology: Open Access**, v. 06, n. 05, 2017.

SHEIKH, J. et al. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 983-97, Sep 2001

SHEIKH, J. et al. EilA, a *HilA-like* regulator in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 338-350, jul. 2006.

SHIN, J. et al. An Outbreak of Foodborne Illness Caused by Enteroaggregative *Escherichia coli* in a High School in South Korea. **Japanese Journal Of Infectious Diseases**, v. 68, n. 6, p.514-519, 2015.

SHULMAN, S. T.; FRIEDMANN, H. C.; SIMS, R. H. Theodor Escherichia: The First Pediatric Infectious Diseases Physician?. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 8, p. 1025-1029, 15 out. 2007.

SMITH, H. R.; CHEASTY, T.; ROWE, B. Enteroaggregative *Escherichia coli* and outbreaks of gastroenteritis in UK. **Lancet**, v. 350, p. 814-815, 1997.

SOLIS, B. et al. Probiotics as a help in children suffering from malnutrition and diarrhea. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, n.3, p. S57-S59, 2002.

STEIN, M.; KENNY, B.; STEIN, M.A.; FINLAY, B.B. Characterization of EspC, a 110-kilodalton protein secreted by enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 5920–5927, 1996.

STEINER, T. S.; LIMA, A. A. M.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 1, p. 88-96, 1998.

STRAUMAN, M. C. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* Disrupts Epithelial Cell Tight Junctions. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 11, p. 4958-4964, 7 set. 2010.

TANIUCHI, M. et al. High throughput multiplex PCR and probe-based detection with Luminex beads for seven intestinal parasites. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 84, n. 2, p. 332-337, 2011.

TANIUCHI, M. et al. Etiology of Diarrhea in Bangladeshi Infants in the First Year of Life Analyzed Using Molecular Methods. **Journal Of Infectious Diseases**, v. 208, n. 11, p.1794-1802, 16 set. 2013.

THERMO-SCIENTIFIC. Boletim Técnico: **Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios**, 2012. Disponível em: < <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf> >. Acesso em: 23 maio 2017.

TOBIAS, J. et al. Involvement of main diarrheagenic *Escherichia coli*, with emphasis on enteroaggregative *E. coli*, in severe non-epidemic pediatric diarrhea in a high-income country. **Bmc Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, 21 fev. 2015.

TOKUDA, K. et al. Characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: biofilm formation and acid resistance. **Microbiology and Immunology**, v. 54, p. 320-329, 2010.

TURIN, C. G. ; OCHOA, T. J. The Role of Maternal Breast Milk in Preventing Infantile Diarrhea in the Developing World. **Current Tropical Medicine Reports**, v.1, p. 97-105, 2014.

VASUDEVAN, P. et al. *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v. 92, p. 179-185, 2003.

VIAL, P. A. et al. Characterization of Enteroadherent-Aggregative *Escherichia coli*, a Putative Agent of Diarrheal Disease. **Journal Of Infectious Diseases**, v. 158, n. 1, p. 70-79, 1 jul. 1988.

VILLASECA, J. M. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* an emergent pathogen with different virulence properties. **Revista latinoamericana de microbiología** , v. 47, p. 140–159, 2005.

ZHANG, R. et al. Comparative genetic characterization of Enteroaggregative *Escherichia coli* strains recovered from clinical and non-clinical settings. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 11 abr. 2016

WANKE, C. A. et al. Potential role of adherence traits of *Escherichia coli* in persistent diarrhea in an urban Brazilian slum. **The pediatric Infectious Disease Journal**, v. 10, p. 746-751, 1991.
WHARTON, B. A.; BALMER, S. E.; SCOTT, P. H. Faecal flora in the newborn. Effect of lactoferrin and related nutrients. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 357, p. 91- 98, 1994.

WILSON, A, et al. Characterisation of strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated during the infectious intestinal disease study in England. **European Journal Epidemiology**, v. 17, p. 1125–1130, 2001.

YATSUYANAGI, J. et al. Characteristics of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *E. coli* harboring enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin-1 (EAST-1) gene isolated from a water-borne outbreak. **Kansenshogaku Zasshi**, v. 70, n. 3, p. 215-23, Mar 1996.

YATSUYANAGI, J. et al. Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 294-297, 2002.

Cont. Parecer CONEP Nº 760/2008

possível indução ao sujeito da pesquisa, infringindo a sua autonomia, uma vez que não se caracteriza realmente como benefício para os sujeitos, já que o acesso a tratamento deve ser garantido a todos. Tal frase poderia ser colocada, por exemplo, num item denominado "custos".

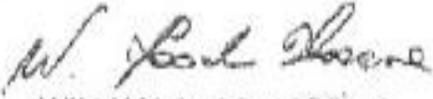
7. No TCLE específico para a pesquisa genética não cabe referências a administração do medicamento em estudo, mencionada em alguns itens. Rever.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96 manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, com a seguinte recomendação a ser acompanhada pelo CEP que informará a CONEP:

- Que sejam atendidas as questões acima, antes do início do estudo.

Situação: Protocolo aprovado com recomendação

Brasília, 14 de julho de 2008.


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador de CONEP/CNS/MS

ANEXO B – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFC

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.Sª. 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,

Mirian Parente Monteiro.

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

ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

*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 gastrintestinais 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 gastrintestinais ou impedimento do crescimento e desenvolvimento.

O objetivo deste estudo é aprender sobre a tendência para infecções gastrintestinais 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 higiênic-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. Mirian Parente Monteiro
 Coordenadora Adjunta do Comitê
 de Ética em Pesquisa
 COMEPE/UFC

Página 1 de 2

ANEXO D – FICHA EPIDEMIOLÓGICA

FORMULÁRIO			
ETIOLOGIA DE DIARREIA DO SEMI-ÁRIDO			
Caso não exista resposta para alguma pergunta, escreva ND como resposta.			
#	Questão	Código	Resposta
01	Data da Aplicação do Questionário	(dd/mmm/aa)	<input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/>
Informações sobre a criança:			
02	Data de nascimento	(dd/mmm/aa)	<input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/>
03	Sexo	1-masculino; 2-feminino	<input type="checkbox"/>
04	Alimentação da criança	1-amamentação exclusiva; 2-amamentação não-exclusiva; 3-não amamenta mais; 4-nunca foi amamentada; 9-não sabe	<input type="checkbox"/>
05	Se a resposta anterior for 3 (não amamenta mais), por quanto tempo a criança foi amamentada?	meses	<input type="text"/> <input type="text"/>
Antropometria:			
06	Peso	kg	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
07	Altura	cm	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
08	Circunferência da cabeça	cm	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Informações sobre o responsável:			
09	Grau de parentesco com a criança	1-mãe; 2-pai; 3-avô (ô); 4-vizinha(o); 5-tia (o), 6-outro	<input type="checkbox"/>
10	Caso a resposta à questão anterior seja 6 (outro parentesco), favor especificar.		_____

11	Idade da mãe da criança	anos	<input type="text"/> <input type="text"/>
12	Grau de escolaridade da mãe	1- não estudou; 2-primário Incompleto; 3-primário completo; 4-secundário Incompleto; 5-secundário completo, 6-superior Incompleto; 7-superior completo; 9-não sabe	<input type="text"/>
13	Idade da primeira gestação	anos	<input type="text"/> <input type="text"/>
Condições sócio-econômicas e higiênico-sanitárias da família da criança:			
14	Qual o tipo de casa em que a criança vive?	1-talpa; 2-alvenaria; 3-mista; 4-outra; 9-não sabe	<input type="text"/>
15	Caso a resposta à questão anterior seja 4 (outro tipo de habitação), favor especificar.		_____
16	Número total de cômodos/compartimentos da casa		<input type="text"/> <input type="text"/>
17	Número total de habitantes da casa (crianças e adultos)		<input type="text"/> <input type="text"/>
18	Número de habitantes da casa menores de 5 anos		<input type="text"/> <input type="text"/>
19	Renda familiar (em salários mínimos)	1- < ½; 2- ½ a 1; 3-1 a 2; 4-2 a 3; 5-3 a 5; 6- >5; 9-não sabe	<input type="text"/>
20	A água de beber da casa é proveniente de	1- água encanada; 2-poço profundo; 3-casimba; 4-carroça; 5-rio/açude; 6-sistema; 7-carro pipa; 8-água mineral; 9-não sabe; 10-outra fonte	<input type="text"/>
21	Caso a resposta à questão anterior seja 10 (outra fonte de água), favor especificar.		_____

22	O que faz antes de utilizar a água para beber?	1= ferve; 2=usa filtro; 3=usa solução de cloro; 4=nenhuma ação; 5=outra; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>
23	Caso a resposta à questão anterior seja 5 (outra ação), favor especificar.		_____
24	Tipo de esgotamento sanitário da casa	1=fossa; 2=rede/esgoto público (sanear); 3=sem sistema de esgoto	<input type="checkbox"/>
25	Há sanitário dentro da casa?	1=sim; 2=não	<input type="checkbox"/>
26	Existe água corrente e sabão para lavar as mãos perto do sanitário?	1=sim; 2=não	<input type="checkbox"/>
27	Com qual frequência água corrente e sabão são utilizados para lavar as mãos?	1=sempre; 2=frequentemente; 3=poucas vezes; 4=raramente; 5=nunca; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>
28	Crianças menores de 5 anos defecam no chão da casa/quintal?	1=sempre; 2=frequentemente; 3=poucas vezes; 4=não ou raramente; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>
29	Animais costumam ficar dentro de casa ou ao redor (no quintal)?	1=sim; 2=não; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>
30	Caso a resposta à questão anterior seja 1 (sim), favor especificar qual(is) animal(is).		_____
Condições clínicas da criança			
31	Sua criança apresentou 3 ou mais fezes líquidas nas últimas 24 horas? (CASO A RESPOSTA SEJA NÃO, VÁ PARA A QUESTÃO 38)	1=sim; 2=não	<input type="checkbox"/>

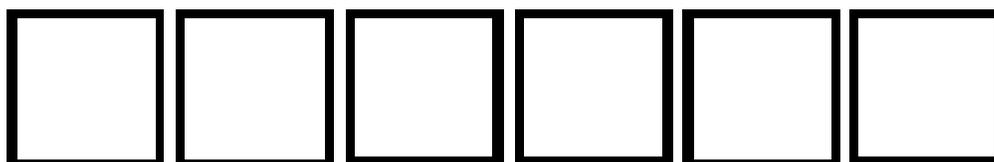
32	Caso a resposta à questão anterior seja 1 (sim), favor especificar a quantos dias a criança vem apresentando diarreia.		<input type="text"/> <input type="text"/>
33	Quantas evacuações em 24 horas? (Maior número recordado)		<input type="text"/> <input type="text"/>
34	Sinais/sintomas observados pelo guardião ou reportados pela criança:		
34.1	Dor abdominal	1=sim; 2=não; 9=não sabe	<input type="text"/>
34.2	Vômito		<input type="text"/>
34.3	Muco nas fezes		<input type="text"/>
34.4	Sangue nas fezes		<input type="text"/>
34.5	Fraqueza		<input type="text"/>
34.6	Inquietação		<input type="text"/>
34.7	Tosse ou sintomas respiratórios		<input type="text"/>
34.8	Desidratação (Entrevistador, favor se reportar à tabela 1, em anexo, para classificação de desidratação ao final do questionário)	1=moderada; 2=grave; 7=grau não identificado; 8=não está desidratada; 9=não sabe	<input type="text"/>
34.9	Febre	1=sim; 2=não; 9=não sabe	<input type="text"/>
34.9.1	Caso tenha realizado medida com termômetro, informe a maior medida recordada.	Medida em °C (ou ND)	<input type="text"/> <input type="text"/> , <input type="text"/>
34.10	Outros sintomas ou doenças concomitantes	1=sim; 2=não; 9=não sabe	<input type="text"/>
35	Caso a resposta à questão 34.10 seja 1 (sim), favor especificar.		<hr/> <hr/> <hr/>

36	A criança recebeu algum tratamento durante a diarreia?	1= sim; 2=não; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>			
37	Caso a resposta à questão 36 seja 1 (sim), favor especificar.		<hr/> <hr/> <hr/> <hr/>			
38	Sua criança apresentou diarreia nos últimos 14 dias?	1= sim; 2=não; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>			
Situação vacinal da criança						
39. A criança recebeu as seguintes vacinas? 1= sim; 2=não; 9=não sabe						
39.1	BCG <i>(ao nascer, contra formas graves de tuberculose)</i>		<input type="checkbox"/> ao nascer			
39.2	SRC <i>(sarampo, rubéola, caxumba, 12 meses)</i>		<input type="checkbox"/> 12 meses			
39.3	Hepatite B <i>(ao nascer, reforços em 1 e 6 meses)</i>	<input type="checkbox"/> 1 mês	<input type="checkbox"/> 6 meses			
39.4	VORH <i>(vacina oral contra rotavírus humano; 2 e 4 meses)</i>	<input type="checkbox"/> 2 meses	<input type="checkbox"/> 4 meses			
39.5	Hib <i>(meningite e outras infecções causadas pelo <u>Haemophilus influenzae</u> tipo B; 2, 4 e 6 meses)</i>	<input type="checkbox"/> 2 meses	<input type="checkbox"/> 4 meses	<input type="checkbox"/> 6 meses		
39.6	DPT: "Tríplice" <i>(difteria, tétano, coqueluche; 2, 4, 6 e 15 meses)</i>	<input type="checkbox"/> 2 meses	<input type="checkbox"/> 4 meses	<input type="checkbox"/> 6 meses	<input type="checkbox"/> 15 meses	
39.7	VOP: "Gotinha" <i>(vacina oral contra pólio; 2, 4, 6 e 15 meses)</i>	<input type="checkbox"/> 2 meses	<input type="checkbox"/> 4 meses	<input type="checkbox"/> 6 meses	<input type="checkbox"/> 15 meses	

Questões para o entrevistador			
40	Foi coletada amostra de fezes?	1- sim; 2-não	<input type="checkbox"/>
41	Foi coletada amostra de saliva?	1- sim; 2-não	<input type="checkbox"/>
42	A criança foi classificada como caso ou controle?	1- caso; 2-controle	<input type="checkbox"/>

Entrevistador: _____

Assinatura: _____



ANEXO

Tabela 1: Classificação dos graus de desidratação

PERGUNTAS	RESPOSTAS*					
	A		B		C	
Diarréias	Até 4 dejeções líquidas/dia	<input type="checkbox"/>	De 4 a 10 dejeções líquidas/dia	<input type="checkbox"/>	+ de 10 dejeções líquidas/dia	<input type="checkbox"/>
Vômitos	Ausente	<input type="checkbox"/>	Pouca quantidade	<input type="checkbox"/>	Muito frequente	<input type="checkbox"/>
Sede	Normal	<input type="checkbox"/>	Aumentada	<input type="checkbox"/>	Não pode beber	<input type="checkbox"/>
Urina	Normal	<input type="checkbox"/>	Pouca, escura	<input type="checkbox"/>	Nenhuma em 6h	<input type="checkbox"/>
Olhos	Normais	<input type="checkbox"/>	Fundos	<input type="checkbox"/>	Muito fundos	<input type="checkbox"/>
Boca e Língua	Molhadas	<input type="checkbox"/>	Secas	<input type="checkbox"/>	Ressecadas	<input type="checkbox"/>
Pele	Pressionada, volta ao normal	<input type="checkbox"/>	Pressionada, volta lentamente	<input type="checkbox"/>	Pressionada, volta muito lentamente	<input type="checkbox"/>
Desidratação	Caso apresente estes sintomas:		Caso apresente dois ou mais destes sintomas		Caso apresente dois ou mais destes sintomas	
	NÃO		SIM, MODERADA		SIM, GRAVE	

*As respostas A, B e C correspondem a Intensidades crescentes dos sinais e sintomas de desidratação.

ANEXO E – PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS E RESUMOS EM CONGRESSO

PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS DURANTE DOUTORADO

1. LIMA, ALDO AM; LEITE, ÁLVARO M.; DI MOURA, ALESSANDRA; LIMA, NOÉLIA L.; SOARES, ALBERTO M.; ABREU, CLÁUDIA B.; FILHO, JOSÉ QUIRINO; MOTA, ROSA MS; LIMA, ILA FN; ALEXANDRE; MEDEIROS, PEDRO HQS; **PRATA, MARA MG**; GUEDES, MARJORIE M. ; CAVALCANTE, PALOMA A. ; VERAS, HERLICE N. ; SANTOS, ANA KS ; MOORE, SEAN R. ; PINKERTON, RELANA C. ; HOUP, ERIC R. ; GUERRANT, RICHARD L. . Determinant Variables, Enteric Pathogen Burden, Gut Function, and Immune-Related Inflammatory Biomarkers Associated with Childhood Malnutrition. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. one, p. 1-36, 2017.
2. ALEXANDRE; LIMA, ILA FN; MEDEIROS, PEDRO HQS; CLEMENTINO, MARCO AF; SANTOS, ANA KS; AMARAL, MARÍLIA SMG; VERAS, HERLICE N; **PRATA, MARA MG**; LIMA, NOÉLIA L.; DI MOURA, ALESSANDRA; LEITE, ÁLVARO M; SOARES, ALBERTO M; FILHO, JOSÉ Q; HOUP, ERIC R; NATARO, JAMES P.; GUERRANT, RICHARD L.; LIMA, ALDO AM. Prevalence and virulence gene profiling of enteroaggregative *Escherichia coli* in malnourished and nourished Brazilian children. *DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASE*, v. 1, p. 1-29, 2017.
3. LIMA, ALDO A.M. SOARES, ALBERTO M. FILHO, JOSÉ Q.S. HAVT, ALEXANDRE LIMA, ILA F.N. LIMA, NOÉLIA L. ABREU, CLÁUDIA B. JUNIOR, FRANCISCO S. MOTA, ROSA M.S. PAN, WILLIAM K.-Y. TROEGER, CHRISTOPHER MEDEIROS, PEDRO H.Q.S. VERA, HERLICE N. **PRATA, MARA M.G.** MCCORMICK, BEN MCGRATH, MONICA ROGAWSKI, ELIZABETH HOUP, ERIC PLATTS-MILLS, JAMES GRATZ, JEAN SAMIE, AMIDOU BESSONG, PASCAL BABJI, SUDHIR KANG, GANGADEEP SHAHIDA, QURESHI , et al. ; Enteroaggregative *E. coli* Subclinical Infection and co-Infections and Impaired Child Growth in the MAL-ED Cohort Study. *JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY AND NUTRITION*, v. 2017, p. 1, 2018.
4. PONTE, P. R. L; MEDEIROS, P. H. Q. S.; HAVT A.; CAETANO, J. A.; CID, D. A. C.; **de Moura Gondim Prata M**; SOARES, A. M.; GUERRANT, R. L.; MYCHALECKYJ, J.; M. Clinical evaluation, biochemistry and genetic polymorphism analysis for the diagnosis of lactose intolerance in a population from northeastern Brazil. *Clinics*, v. 70, p.

82-89, 2016.

5. **Mara MG Prata**; HAVT A.; BOLICK, D. T.; PINKERTON R; LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L. Comparisons between myeloperoxidase, lactoferrin, calprotectin and lipocalin-2, as fecal biomarkers of intestinal inflammation in malnourished children. *Journal of Translational Science*, v. 2, p. 134-139, 2016.
6. GUERRANT, RL LEITE, A. M. PINKERTON R MEDEIROS, P. H. Q. S. CAVALCANTE, P. A. DEBOER, M. KOSEK, M. DUGGAN, C. GEWIRTZ, A. KAGAN, J. C. GAUTHIER, A. E. SWANN, J. MAYNERIS-PERXACHS, J. BOLICK, D. T. MAIER, E. A. GUEDES, M. M. MOORE, S. R. PETRI, W. A. HAVT A. Lima, I. F. N. **Prata, M. M. G.** MICHALECKYJ, J. C. SCHARF, R. J. STURGEON, C. FASANO, A. , et al. ; Biomarkers of Environmental Enteropathy, Inflammation, Stunting, and Impaired Growth in Children in Northeast Brazil. *Plos One*, v. 11, p. e0158772, 2016.
7. SAMPAIO, I. C.; MEDEIROS, P. H. Q. S.; P.; A.; RIBEIRO, S. A.; OLIVEIRA. J. S. ; **PRATA, M. M. G.** ; COSTA, D. V. S. ; FONSECA, S. G. C. ; GUEDES, M. M. ; SOARES, A. M. ; BRITO, G. A. C. ; HAVT A. ; MOORE, S. R. ; LIMA, A. A. M. . Impact of acute undernutrition on growth, ileal morphology and nutrient transport in a murine model. *Brazilian journal of medical and biological research*, v. 49, p. e5340, 2016.
8. RODRIGUES, F. A. P. ; **Prata, M. M. G.** ; OLIVEIRA, I. C. M. ; ALVES, N. T. Q. ; FREITAS, R. E. M. ; MONTEIRO, H. S. A. ; SILVA, J. A. ; VIEIRA, P. C. ; VIANA, D. A. ; LIBORIO, A. B. ; Havt, A. . Gingerol Fraction from *Zingiber officinale* Protects Against Gentamicin-Induced Nephrotoxicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Print)*, v. 58, p. 2, 2014.

CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO DURANTE DOUTORADO

1. Rodrigues, Francisco Adelvane de Paulo; Medeiros, Pedro Henrique Quintela Soares de; Prata, Mara de Moura Gondim; Lima, Aldo Ângelo Moreira. *Fisiologia da Barreira Epitelial Intestinal. Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica*. 1ed.: Editora Blucher, 2016, v., p. 441-478.

RESUMOS EM CONGRESSO DURANTE O DOUTORADO

- 1 **PRATA, MARA MG**; HAVT A.; BOLICK, D. T.; PINKERTON R; LIMA, A. A. M.; GUERRANT, RL. Correlação dos biomarcadores mieloperoxidase, calprotectina e lipocalina-2 na inflamação gastrointestinal em crianças desnutridas em Fortaleza, Ceará. In: XX Tropical Medicine Research Center Meeting, 2016, Fortaleza. XX Tropical Medicine Research Center Meeting: Advanced Topics in Biomedicine, 2016. p. 21-21.

- 2 GONDIM, R. N. D. G.; PANKOV, R. C.; **PRATA, M. M. G.**; A.; VERAS, H. N.; SANTOS, A. K. S.; FREITAS, T. M.; BESSA, C. C.; HAVT A.; LIU, J.; HOUPTE ER; FUMINAN, T. M.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P. ; Lima, A. A. M. . Prevalência de norovírus em crianças de um estudo caso-controle de diarreia no semiárido brasileiro. In: XX Tropical Medicine Research Center Meeting, 2016, Fortaleza. XX Tropical Medicine Research Center Meeting: Advanced Topics in Biomedicine. Fortaleza: XX Tropical Medicine Research Center Meeting: Advanced Topics in Biomedicine, 2016. p. 22-22.

- 3 PANKOV, R. C.; GONDIM, R. N. D. G.; **PRATA, M. M. G.**; A.; VERAS, H. N.; FREITAS, T. M.; BESSA, C. C.; HAVT, A.; LIU, J.; HOUPTE ER; FUMINAN, T. M.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LIMA, A. A. M. Rotavírus: um estudo caso-controle de diarreia em crianças no semiárido brasileiro. In: XX Tropical Medicine Research Center Meeting, 2016, Fortaleza. XX Tropical Medicine Research Center Meeting: Advanced Topics in Biomedicine. Fortaleza: XX Tropical Medicine Research Center Meeting: Advanced Topics in Biomedicine, 2016. p. 23-23.

- 4 A.; **PRATA, M. M. G.**; RODRIGUES, T. S.; SILVA, A. V. A.; MEDEIROS, P. H. Q. S.; HAVT A.; LIMA, A. A. M. Infecção por cepas de Escherichia coli enteropatogênica na migração de células intestinais. In: XX Tropical Medicine Research Center Meeting, 2016, Fortaleza. XX Tropical Medicine Research Center Meeting: Advanced Topics in Biomedicine. Fortaleza: XX Tropical Medicine Research Center Meeting: Advanced Topics in Biomedicine, 2016. p. 29-29.

- 5 P.; MEDEIROS, P. H. Q. S.; CÂNDIDO, P. M. S. O; **PRATA, M. M. G.**; PEREIRA, J. M.; A.; HAVT A. Modulatory effects of compounds [6]- and [10]-gingerol on acute renal

- failure Induced by polymicrobial sepsis. In: XX Tropical Medicine Research Center Meeting, 2016, Fortaleza. XX Tropical Medicine Research Center Meeting: Advanced Topics in Biomedicine. Fortaleza: XX Tropical Medicine Research Center Meeting: Advanced Topics in Biomedicine, 2016. p. 40-40.
- 6 GUERRANT, R. L. ; HAVT A. ; SWANN, J. R. ; MAYNERIS-PERXACHS, J. ; LEITE, A. M. ; BOLICK, D. T. ; PINKERTON R ; **PRATA, M. M. G.** ; MEDEIROS, P. H. Q. S. ; MOORE, S. R. ; LIMA, A. A. M. . Biomarkers of environmental enteropathy, inflammation, stunting, and impaired growth. In: XX Tropical Medicine Research Center Meeting, 2016, Fortaleza. XX Tropical Medicine Research Center Meeting: Advanced Topics in Biomedicine. Fortaleza: XX Tropical Medicine Research Center Meeting: Advanced Topics in Biomedicine, 2016. p. 42-42.
 - 7 **PRATA, M. M. G.**; BOLICK, D. T. ; KOLLING, G. L. ; ZAENKER, E. I. ; HAVT A. ; GUERRANT, RL ; LIMA, A. A. M. . Host response of miRNA profile to enteroaggregative Escherichia coli infected mice fed with zinc deficient diet. In: 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics and the 21st Latin American Congress of Pharmacology (SBFTE), 2016, Foz do Iguaçu. 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics and the 21st Latin American Congress of Pharmacology (SBFTE). Foz do Iguaçu: 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics and the 21st Latin American Co, 2016.
 - 8 SANTOS, A. K. S.; MEDEIROS, P. H. Q. S.; **Prata, M. M. G.**; A.; AMARAL, M. S. M. G.; HAVT A.; LIMA, A. A. M. Prevalência e identificação dos fatores de virulência da Escherichia coli enteropatogênica no semiárido brasileiro. In: XX Tropical Medicine Research Center Meeting, 2016, Fortaleza. XX Tropical Medicine Research Center Meeting: Advanced Topics in Biomedicine. Fortaleza: XX Tropical Medicine Research Center Meeting: Advanced Topics in Biomedicine, 2016. p. 24-24.
 - 9 P.; SAMPAIO, I. C.; GUEDES, M. M.; Medeiros, P. H. Q. S.; SOARES, A. M.; **PRATA, M. M. G.**; FONSECA, SGC; HAVT A.; M. Malnutrition from Regional Basic Diet (RBD) modifies the transport proteins in mice. In: XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), 2015, São Paulo. XXX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE). São Paulo: Fesbe, 2015.

- 10 SILVA, A. V. A.; A.; **PRATA, M. M. G.**; QUETZ, J. da S.; LIMA I.F.N.; HAVT A.; M. Evaluation of pro-inflammatory response caused by enteroaggregative Escherichia coli in intestinal cells: modulation with alanyl-glutamine. In: 28 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015, Florianópolis. 28 Congresso Brasileiro de Microbiologia. Florianópolis: 28 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015.
- 11 **Prata, M. M. G.**; SANTOS, A. K. S. ; Antonio Vinicios ; CAVALCANTE, P. A. ; Quetz, J. d. S. ; MEDEIROS, P. H. Q. S. ; RODRIGUES, F. A. P. ; VERAS, H. N. ; LIMA, A. A. M. ; Havt, A. . Death and viability response of intestinal epithelial cells challenged with pathogenic and commensal Escherichia coli?. In: 51 Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - MEDTROP, 2015, Fortaleza. 51 Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - MEDTROP. Fortaleza: 51 Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - MEDTROP, 2015.
- 12 COSTA, P. H. S.; P.; ALVES, N. T. Q.; MEDEIROS, P. H. Q. S; SANTANA, A. P. M.; SILVA, P. L. B.; SILVEIRA, J. A. M.; **PRATA, M. M. G.**; XIMENES, R. M.; HAVT A.; MONTEIRO, H. S. A. Modulação intra-renal do ANP e seus receptores pelo enalapril na doença crônica experimental. In: X Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), 2015, Salvador. X Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE). Salvador: FeSBE, 2015.
- 13 UCHOA, P. N.; FONTELES, A. C.; NASCIMENTO, N. R. F.; HAVT A.; FARIAS, V. X.; **PRATA, MARA MG**; SANTOS, C. F. Expressão proteica do co-transportador hidrogênio- mioinositol (HMIT) em tecido nervoso durante o desenvolvimento do diabetes experimental. In: XIX Semana Universitária da UECE, 2015, Fortaleza. XIX Semana Universitária da UECE. Fortaleza: UECE, 2015.
- 14 CAVALCANTE, PALOMA A.; PANKOV, R. C.; **PRATA, M. M. G.**; Antonio Vinicios; AMARAL, M. S. M. G.; Havt, A.; LIMA, A. A. M. ALANYL-GLUTAMINE INCREASES INTESTINAL CELLS PROLIFERATION AFTER INFECTION WITH ENTEROPATHOGENIC ESCHERICHIA COLI STRAINS THROUGH THE INDUCTION OF C-JUN AND C-FOS GENES TRANSCRIPTION. In: 51° Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2015, Fortaleza. 51° Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Fortaleza, 2015.

- 15 P.; MEDEIROS, P. H. Q. S; **PRATA, M. M. G.**; Pereira, J.M; OLIVEIRA, D. M. N; Coelho, Y.P.; Cândido, P.M.S.O.; HAVT A. Proteinúria associada a retenção de compostos nitrogenados durante a disfunção renal induzida pelo modelo polimicrobiano de sepse em ratos. In: XI Fórum Internacional de Sepse, 2014, São Paulo. XI Fórum Internacional de Sepse, 2014. v. 0. p. 1-1.
- 16 Bona, M. D.; P.; Coelho, Y.P.; **PRATA, M. M. G.**; OLIVEIRA, D. M. N; Pereira, J.M; COSTA, P. H. S; SILVA, P. L. B; MONTEIRO, Helena Serra Azul; HAVT A. Electrolyte Disorder in the Acute Renal Failure Induced by Gentamicin in Rats. In: XLVI Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2014, Fortaleza. XLVI Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2014. v. 0. p. 1-1.
- 17 Coelho, Y.P.; P.; **PRATA, M. M. G.**; ALVES, N. T. Q; OLIVEIRA, D. M. N; Pereira, J.M; SILVA, P. L. B; COSTA, P. H. S; MONTEIRO, Helena Serra Azul; HAVT A. Reverseability of oxidative and glomerular damage in an experimental model of renal injury by gentamicin. In: XLVI Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2014, Fortaleza. XLVI Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2014. v. 0. p. 1-1.
- 18 CAVALCANTE, P. A. ; **PRATA, M. M. G.** ; SILVA, A. V. A. ; Quetz, J. d. S. ; HAVT A. ; Lima, I. F. N. ; CARVALHO, E. B. ; MEDEIROS, P. H. Q. S ; RODRIGUES, T. S. ; GONZALEZ, R. H ; FREIRE, R. S. ; MOORE, S. R. ; NATARO, J. P. ; Richard L. Guerrant ; Lima, A. A. M. . Regulation of small RHO GTPases in reducing intestinal cells migration induced by strains of enteropathogenic Escherichia coli. In: LXIII Annual Meeting of The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2014, New Orleans. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2014. v. 91. p. 504-504.
- 19 SILVA, A. V. A.; **PRATA, M. M. G.**; A.; S.; FREIRE, R. S.; MEDEIROS, P. H. Q. S; LIMA I.F.N.; Lima, A. A. M. ; Havt, A. . The role of alanyl-glutamine supplementation against in vitro intestinal barrier function damage promoted by enteroaggregative Escherichia coli. In: 17th Tropical Medicine Research Center Meeting/ 5th Annual Meeting INCT - Biomedicine, 2013, Fortaleza. 17th Tropical Medicine Research Center Meeting & 5th Annual Meeting INCT - Biomedicine. Universidade Federal do Ceará: Universidade Federal do Ceará, 2013.

- 20 S.; LIMA I.F.N.; Havt, A.; MEDEIROS, P. H. Q. S; **PRATA, M. M. G.**; A.; CARVALHO, E. B.; Mota, R. M. S.; Weigl B.; LIMA, N. L.; Soares, A.M.; Guerrant, R. L.; M. Diarrheal disease and Campylobacter jejuni infections associated with reduced growth in Brazilian children: virulence genes and molecular diagnosis approach. In: 17th Tropical Medicine Research Center Meeting & 5th Annual Meeting INCT - Biomedicine, 2013, Fortaleza. 17th Tropical Medicine Research Center Meeting & 5th Annual Meeting INCT - Biomedicine. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2013. p. 24-24.
- 21 SILVA, A. V. A.; A; **PRATA, M. M. G.**; MEDEIROS, P. H. Q. S; S.; N.; Havt, A.; LIMA, A. A. M. Prevalence of virulence genes of enteropathogenic Escherichia coli isolated from a case-control study in children from Fortaleza, Ceará. In: XIII Curso internacional de epidemiologia em doenças infecciosas e parasitárias emergentes, 2013, Salvador. XIII Curso internacional de epidemiologia em doenças infecciosas e parasitárias emergentes. Salvador: Fiocruz, 2013. p. 38-38.
- 22 LIMA I.F.N.; Medeiros, P. H. Q. S.; Havt, A.; **PRATA, M. M. G.**; RODRIGUES, T. S.; ROQUE, C. R.; GUEDES, M. M.; Rey, L. C.; LIMA, A. A. M. Virulence characterization and serological distribution of shigella isolates from northeastern Brazil. In: XIII Curso internacional de epidemiologia em doenças infecciosas e parasitárias emergentes, 2013, Salvador. XIII Curso internacional de epidemiologia em doenças infecciosas e parasitárias emergentes. Salvador: Fiocruz, 2013. p. 70-70.
- 23 SANTOS, A. K. S. ; **PRATA, M. M. G.** ; MEDEIROS, P. H. Q. S ; Antonio Vinicios ; CAVALCANTE, P. A. ; FREITAS, REM ; RODRIGUES, T. S. ; ROQUE, C. R. ; Lima, I. F. N. ; Quetz, J. d. S. ; LIMA, A. A. M ; Havt, A. . Alanyl-glutamine effects on intestinal cell proliferation after acute infection with enteroaggregative Escherichia coli. In: 11th World Congress on Inflammation/ XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2013, Natal. 11th World Congress on Inflammation/ XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology. Natal: 11th World Congress on Inflammation/ XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2013.
- 24 MEDEIROS, P. H. Q. S ; **PRATA, M. M. G.** ; Antonio Vinicios ; CAVALCANTE, P. A. ; FREITAS, REM ; Quetz, J. d. S. ; LIMA I.F.N. ; SANTOS, A. K. S. ; RODRIGUES, F. A. P. ; BARROS, R. S. ; LIMA, A. A. M ; Havt, A. . TLR-5, NF-KB and IL-8

- responses and viability of intestinal epithelial cells challenged with pathogenic and commensal *Escherichia coli*?. In: 11th World Congress on Inflammation/ XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2013, Natal. 11th World Congress on Inflammation/ XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology. Natal: 11th World Congress on Inflammation/ XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2013.
- 25 RODRIGUES, T. S. ; **PRATA, M. M. G.** ; MEDEIROS, P. H. Q. S ; SILVA, A. V. A. ; CAVALCANTE, P. A. ; FREITAS, REM ; Quetz, J. d. S. ; Lima, I. F. N. ; ROQUE, C. R. ; SANTOS, A. K. S. ; Lima, A. A. M. ; Havt, A. . Effects of alanyl-glutamine on NF-KB and IL-8 responses of intestinal epithelial cells. In: 11th World Congress on Inflammation/ XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2013, Natal. 11th World Congress on Inflammation/ XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology. Natal: 11th World Congress on Inflammation/ XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2013.
- 26 ROQUE, C. R.; **PRATA, M. M. G.**; MEDEIROS, P. H. Q. S; SILVA, A. V. A.; A.; FREITAS, REM; RODRIGUES, T. S.; SANTOS, A. K. S.; QUETZ, J. da S.; LIMA I.F.N.; LIMA, A. A. M; Havt, A. Effects of beta-carotene on NF-KB and IL-8 response of intestinal epithelial cells. In: 11th World Congress on Inflammation/ XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2013, Natal. 11th World Congress on Inflammation/ XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology. Natal: 11th World Congress on Inflammation/ XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2013.
- 27 RODRIGUES, F. A. P. ; OLIVEIRA, I. C. M. ; VIANA, D. A. ; **PRATA, M. M. G.** ; MEDEIROS, P. H. Q. S ; FREITAS, REM ; ALVES, N. T. Q. ; COSTA, P. H. S. ; SILVA, J. A. ; MONTEIRO, H. S. A. ; Havt, A. . Preventive effects of gingerols enriched solution (*Zingiber officinale*) against renal injury caused by gentamicin. In: 11th World Congress on Inflammation/ XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2013, Natal. 11th World Congress on Inflammation/ XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology. Natal: 11th World Congress on Inflammation/ XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2013.
- 28 PRIMO, V. D.; P.; M.; **PRATA, M. M. G.**; HAVT A. Análise do efeito da fração zoeb4 extraído do zingiber officinale sobre a transcrição gênica de mediadores pró-anti-

inflamatórios durante a lesão renal por gentamicina em ratos. In: Encontros Universitários 2013, 2013, Fortaleza. Encontros Universitários 2013. Universidade Federal do Ceará: Universidade Federal do Ceará, 2013.

- 29 UCHOA, P. N.; FONTELES, M. C.; NASCIMENTO, N. R. F.; HAVT A.; FARIAS, V. X.; **PRATA, M. M. G.**; SANTOS, C. F. Expressão gênica de co-transportadores de mioinositol em tecido nervoso durante o desenvolvimento do diabetes experimental. In: XVIII Semana Universitária, 2013, Fortaleza. XVIII Semana Universitária. Universidade Estadual do Ceará: Universidade Estadual do Ceará, 2013.

ANEXO F – ARTIGOS CIENTÍFICOS EM PREPARAÇÃO

- Genetic Virulence Profile of enteroaggregative *Escherichia coli* correlated with clinical manifestations of diarrhea and asymptomatic children
- Prevalence, characterization and clinical manifestations of multiple enteroaggregative *Escherichia coli* coinfections in children from Northeast, Brazil