



**Universidade Federal do Ceará**  
**Faculdade de Medicina**  
**Departamento de Patologia e Medicina Legal**  
**Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica**

**MARÍLIA SILVEIRA MAIA GURGEL DO AMARAL**

**GENES RELACIONADOS À VIRULÊNCIA, RESISTÊNCIA AOS  
ANTIMICROBIANOS, FILOGRUPOS GENÉTICOS E RESPOSTA  
IMUNOINFLAMATÓRIA ASSOCIADAS COM CEPAS DE *Escherichia coli*  
ENTEROAGREGATIVA ISOLADAS DE CRIANÇAS NUTRIDAS E DESNUTRIDAS  
EM FORTALEZA-CE, BRASIL**

**FORTALEZA**

**2018**



**MARÍLIA SILVEIRA MAIA GURGEL DO AMARAL**

**GENES RELACIONADOS À VIRULÊNCIA, RESISTÊNCIA AOS  
ANTIMICROBIANOS, FILOGRUPOS GENÉTICOS E RESPOSTA  
IMUNOINFLAMATÓRIA ASSOCIADAS COM CEPAS DE *Escherichia coli*  
ENTEROAGREGATIVA ISOLADAS DE CRIANÇAS NUTRIDAS E DESNUTRIDAS  
EM FORTALEZA-CE, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

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)

---

- A515g    Amaral, Marília.  
          GENES RELACIONADOS À VIRULÊNCIA, RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS,  
          FILOGRUPOS GENÉTICOS E RESPOSTA IMUNOINFLAMATÓRIA ASSOCIADAS COM CEPAS DE  
          Escherichia coli ENTEROAGREGATIVA ISOLADAS DE CRIANÇAS NUTRIDAS E DESNUTRIDAS  
          EM FORTALEZA-CE, BRASIL / Marília Amaral. – 2018.  
          98 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

1. Escherichia coli. 2. desnutrição. I. Título.

CDD 616.9

---



**MARÍLIA SILVEIRA MAIA GURGEL DO AMARAL**

**GENES RELACIONADOS À VIRULÊNCIA, RESISTÊNCIA AOS  
ANTIMICROBIANOS, FILOGRUPOS GENÉTICOS E RESPOSTA  
IMUNOINFLAMATÓRIA ASSOCIADAS COM CEPAS DE *Escherichia coli*  
ENTEROAGREGATIVA ISOLADAS DE CRIANÇAS NUTRIDAS E DESNUTRIDAS  
EM FORTALEZA-CE, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Aprovada em: 25/07/2018.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Danielle Malta Lima  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Dr<sup>a</sup>. Cecília Leite Costa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)



ADEUS, por me conceder o dom da vida.

Aos meus pais Tadeu e Neuma,  
por todo amor e dedicação.

Aomeu esposo Bruno,  
pela paciência e compreensão.

E as minhas filhas Nicolle e Giovanna,  
pois sem elas eu nada seria.



## **AGRADECIMENTOS**

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

Ao Prof. Dr. Alexandre Havt, pelos momentos em que se dedicou a esclarecer minhas dúvidas e a me auxiliar durante a execução dessa pesquisa.

À Dr<sup>a</sup>. Ila Fernanda Nunes Lima e à Dra. Marjorie Moreira Guedes por todos os ensinamentos transmitidos e auxílio na área da microbiologia no início da minha jornada acadêmica.

À Prof<sup>a</sup>. Dr. Débora Castelo Branco, pessoa que tenho bastante admiração, muito obrigada por toda receptividade em seu laboratório, transmissão de conhecimento e ajuda nos momentos em que precisei.

Ao meu amigo Bruno Rocha, por toda disponibilidade, ajuda e parceria nos experimentos, muito obrigada.

Aos meus amigos de Laboratório Ana Karolina, Herlice Veras, Pedro Henrique Quintela, Samilly Ribeiro, Mariana Bona e Mara Prata, muito obrigada por toda ajuda na execução dos experimentos e realização desse trabalho, vocês foram fundamentais.

A toda família do Laboratório de Doenças Infecciosas e Laboratório de Toxinologia Molecular Geovana Mesquita, Adelvane Rodrigues, Júlio Werner, Rafaela Pankov, Ivna Viana, Natália Fernandes, Cléber Ferreira e Thiago Miranda por todo apoio, incentivo e auxílio de maneira direta e indireta na realização desse trabalho.

Aos participantes que integraram a banca de defesa, a Profa. Dr<sup>a</sup>. Danielle Malta Lima e a Dr<sup>a</sup>. Cecília Leite Costa por terem aceitado o convite.

Aos professores do programa em Microbiologia Médica pela dedicação, transmissão de todo conhecimento que contribuiu para a minha evolução acadêmica e científica, muito obrigada.

Aos colegas da turma de mestrado em Microbiologia Médica, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

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

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



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

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

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

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



“A ciência nunca resolve um problema sem  
criar pelo menos outros dez.”

(George Bernard Shaw)



## RESUMO

Desnutrição infantil é uma das causas de maior morbidade e mortalidade que acometem crianças em países em desenvolvimento. Infecções por *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), independentes de sintomatologia, têm sido associadas a um retardo do crescimento dessas crianças. O objetivo desse estudo foi investigar os genes relacionados à virulência, a resistência aos antimicrobianos, filogrupos genéticos e resposta imunoinflamatória associadas com cepas de EAEC isoladas de crianças nutridas e desnutridas em Fortaleza, Ceará, Brasil. Este estudo caso-controle fez parte de um estudo multicêntrico intitulado “Etiologia, Fatores de Risco e Interações de Infecções Entéricas e Desnutrição e as Consequências para a Saúde Infantil”, ou estudo MAL-ED, que ocorreu no período de agosto de 2010 a setembro de 2013, obtendo aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (COMEPE nº. 246/09). Foram analisadas 402 crianças com idades entre 6 a 24 meses, sendo determinadas 201 crianças casos e 201 crianças controles, onde os casos foram definidos como crianças desnutridas através de WAZ < -2 e os controles foram definidos como crianças nutridas com WAZ  $\geq$  -1. Foi realizada extração de DNA de colônias de *Escherichia coli* oriundas de amostras fecais das 402 crianças. Através de PCR múltiplos foram detectados os cinco patótipos de *E. coli*, o diagnóstico do patótipo EAEC foi por meio da detecção dos genes alvo *aaiC* e *aatA*. A detecção dos genes relacionados à virulência de EAEC foi realizada utilizando cinco painéis de PCR múltiplos, totalizando 20 genes. A investigação dos filogrupos A, B1, B2 e D foi realizada através da pesquisa dos genes *chuA*, *yjaA* e *TspE4C2*. A determinação da formação de biofilme dessas cepas foi realizada através da coloração por cristal violeta. Para avaliar a sensibilidade antimicrobiana foi utilizado o CLSI (2017) como parâmetro. A análise de biomarcadores de inflamação foi empregada através de ensaio imunoenzimático. Foram diagnosticadas 24.1% (97/402) amostras positivas para EAEC, onde 56.7% (55/97) foram definidos como casos e 43.3% (42/97) foram controles. Os genes relacionados à virulência mais presente em todas as amostras foram o *orf3* e o *agg3/4C* com 81.9% (68/83), seguido de *aggR* com 79.5% (66/83). Os de menor prevalência foram *aafA* 28.9% (24/83), seguido de *aafC* 15.6% (13/83) e por fim o *agg3A* com 6% (5/83). Nenhum dos genes foi correlacionado com o grupo caso ou controle. Na distribuição dos filogrupos, o filogrupo B2 foi o mais prevalente com 54.2% (51/94), seguido do filogrupo D com 38.3% (36/94) e o filogrupo A com 7.4% (7/94). Na detecção da formação de biofilme o grupo caso obteve uma maior formação em relação ao grupo controle (45.7% vs 32.9%) e quando relacionados com os genes relacionados à virulência, o gene *aar* foi associado com a formação de biofilme ( $P = 0.0466$ ). Na determinação da resistência antimicrobiana a ampicilina foi o que apresentou maior taxa de resistência com 58.5% (55/94), seguido trimetoprima/sulfametoxazol com 55.3% (52/94) e azitromicina com 23.5% (23/94). As maiores taxas de sensibilidade antimicrobiana foram apresentadas pela ceftazidime com 100% (94/94), seguida de cefoxitina, ertapenem e ciprofloxacina com 98.9% (91/94). Os biomarcadores de inflamação sistêmica FABP-I ( $P = 0.0127$ ), IgA anti-LPS ( $P = 0.0353$ ), IgG anti-LPS ( $P = 0.0192$ ) foram associados com os casos de desnutrição. E os biomarcadores de inflamação MPO ( $P = 0.0169$ ), calprotectina ( $P = 0.0096$ ), CD14s ( $P < 0.0001$ ), SAA ( $P < 0.0001$ ) apresentaram associação com os controles. Conclui-se que a heterogeneidade da EAEC pode influenciar sua relação com o hospedeiro, causando sua persistência durante a colonização, além da alta prevalência da circulação de cepas resistentes a diversos antimicrobianos o que dificulta o tratamento da infecção.

**Palavras-chaves:** Desnutrição; *Escherichia coli* enteroagregativa; Perfil de virulência



## ABSTRACT

Child malnutrition is one of the causes of increased morbidity and mortality among children in developing countries. Infections with enteroaggregative *Escherichia coli*, independent of symptomatology, have been associated with a growth deficit of these children. The objective of this study was to investigate the genes related to virulence, antimicrobial resistance, genetic phylogroups and immunoinflammatory response associated with strains of EAEC isolated from nourished and malnourished children in Fortaleza, Ceará, Brazil. This case-control study was part of a multicenter study entitled "Etiology, Risk Factors and Interactions of Enteric Infections and Malnutrition and the Consequences for Children's Health," or MAL-ED study, which occurred from August 2010 to September of 2013, obtaining approval by the Committee of Ethics in Research of the Federal University of Ceará (COMEPE nº. 246/09). A total of 402 children between the ages of 6 and 24 months were analyzed, with 201 cases children and 201 controls, where the cases were defined as malnourished children through WAZ < -2 and controls were defined as nourished children with WAZ ≥ -1. DNA extractions were performed of *Escherichia coli* colonies derived from faecal samples from 402 children. Through multiplex PCR five pathotypes of *E. coli* were detected, diagnostic of the EAEC pathotype was by detection of target genes *aatA* and *aaiC*. Detection of genes related to the virulence of EAEC was performed using five multiplex PCR panels, totaling 20 genes. The investigation of the phylogroup A, B1, B2 and D was performed through the search of the genes *chuA*, *yjaA* and *TspE4C2*. The determination of the biofilm formation of these strains was performed through violet crystal staining. To evaluate the antimicrobial susceptibility, CLSI (2017) was used as a parameter. Biomarkers analysis of inflammation were performed using an enzyme-linked immunosorbent assay. Were diagnosed 24.1% (97/402) samples positive for EAEC, where 56.7% (55/97) were defined as cases and 43.3% (42/97) were controls. The most prevalent genes related to virulence in all samples were *orf3* and *agg3/4C* with 81.9% (68/83), followed by *aggR* with 79.5% (66/83). Those with the lowest prevalence were *aafA* 28.9% (24/83), followed by *aafC* 15.6% (13/83) and finally the *agg3A* with 6% (5/83). None of the genes were correlated with the case or control group. In the distribution of the phylogroups, the phylogroup B2 was the most prevalent with 54.2% (51/94), followed by the phylogroup D with 38.3% (36/94) and the phylogroup A with 7.4% (7/94). In the detection of biofilm formation, the case group obtained a higher formation compared to the control group (45.7% vs 32.9%) and when correlated with the genes related to virulence, the *aar* gene was associated with biofilm formation ( $P = 0.0466$ ). In the determination of antimicrobial resistance, ampicillin presented the highest resistance rate with 58.5% (55/94), followed by trimethoprim/sulfamethoxazole with 55.3% (52/94) and azithromycin with 23.5% (23/94). The highest antimicrobial susceptibility rates were presented by ceftazidime with 100% (94/94), followed by cefoxitin, ertapenem and ciprofloxacin with 98.9% (91/94). The biomarkers of systemic inflammation FABP-I ( $P = 0.0127$ ), IgA anti-LPS ( $P = 0.0353$ ), IgG anti-LPS ( $P = 0.0192$ ) were associated with cases of malnutrition. And the biomarkers of inflammation MPO ( $P = 0.0169$ ), calprotectin ( $P = 0.0096$ ), CD14s ( $P < 0.0001$ ), SAA ( $P < 0.0001$ ) were associated with the controls. It is concluded that the heterogeneity of EAEC can influence its relation with the host, causing its persistence during colonization, besides the high prevalence of the circulation of strains resistant to several antimicrobials, which makes difficult the treatment of the infection.

**Keywords:** Malnutrition; Enteroaggregative *Escherichia coli*; virulence profile



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Árvore filogenética de <i>E. coli</i> intestinal patogênica-----	25
<b>Figura 2</b>	Patobiologia da EAEC e os principais genes relacionados à virulência com relevância clínica-----	29
<b>Figura 3</b>	Fotomicrografias ilustrando os padrões de aderência agregativa em células HEP-2-----	32
<b>Figura 4</b>	Fluxograma do estudo-----	39
<b>Figura 5</b>	Prevalência de coinfeção em crianças com EAEC nos grupos caso e controle-----	56
<b>Figura 6</b>	Representação do percentual de resistência entre os isolados de EAEC entre os grupos caso e controle-----	62
<b>Figura 7</b>	Concentrações dos marcadores inflamatórios FABP-I (A), LPS- IgA (B) e LPS-IgG (C) em crianças dos grupos caso e controle	63
<b>Figura 8</b>	Concentrações dos marcadores inflamatórios MPO (A), calprotectina (B), CD14s (C) e SAA (D) em crianças dos grupos caso e controle-----	64



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Classificação para avaliar a gravidade da desnutrição-----	20
<b>Tabela 2</b>	Descrição dos genes relacionados à virulência utilizados no estudo-----	43
<b>Tabela 3</b>	Controles positivos e seus respectivos genes de virulência utilizados no estudo-----	46
<b>Tabela 4</b>	Descrição dos iniciadores utilizados no estudo para detecção dos filogrupos-----	47
<b>Tabela 5</b>	Esquema para a identificação dos grupos filogenéticos-----	47
<b>Tabela 6</b>	Fórmula para calcular a biomassa de biofilme-----	48
<b>Tabela 7</b>	Pontos de corte do diâmetro do halo formado pelos antimicrobianos utilizados no estudo baseados no <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i> (CLSI) (2017)-----	50
<b>Tabela 8</b>	Pontos de corte do diâmetro do halo formado pelos antimicrobianos utilizados para triagem de ESBL no estudo baseados no CLSI (2017)-----	51
<b>Tabela 9</b>	Descrição dos parâmetros analisados sobre a caracterização da população estudada-----	54
<b>Tabela 10</b>	Descrição dos parâmetros avaliados sobre a presença de doença-----	55
<b>Tabela 11</b>	Percentual de positividade dos genes relacionados à virulência isolados entre amostras positivas para EAEC dos grupos caso e controle-----	57
<b>Tabela 12</b>	Distribuição dos grupos filogenéticos entre as cepas de EAEC isoladas de crianças casos e controle-----	58
<b>Tabela 13</b>	Descrição da correlação entre formação de biofilme e os genes relacionado à virulência por grupo de funções detectado-----	60
<b>Tabela 14</b>	Descrição das taxas de prevalência da resistência entre os isolados de EAEC-----	61



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aderência Agregativa
AAF-I	Fímbria de aderência agregativa I
AAF-II	Fímbria de aderência agregativa II
AAF-III	Fímbria de aderência agregativa III
AAF-IV	Fímbria de aderência agregativa IV
AAF-V	Fímbria de aderência agregativa V
<i>aagR</i>	Gene regulador transcricional
Aai	Responsável pelo sistema de secreção do tipo VI
<i>aaiC</i>	Gene codificador da ilha de ativação do <i>aggR</i>
aap	Proteína antiagregação de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
<i>aar</i>	Gene regulador negativo do <i>aagR</i>
<i>aatA</i>	Gene codificador do transportador da dispesina
AD	Aderência Difusa
ALA	Alpha - I- antitripsina
<i>bla</i>	Genes de beta-lactamases
<i>blaKPC</i>	Gene codificador de <i>Klebsiellapneumoniae</i> produtora de carbapenemase
<i>blaOXA</i>	Gene codificador de beta-lactamase oxacilina
<i>blaSHV</i>	Gene codificador de beta-lactamase sulfidrila
<i>blaTEM</i>	Gene codificador de beta-lactamase temoneira
CALPRO	Calprotectina
CD14s	Forma CD14 solúvel
CLSI	Instituto de padronização clínica e laboratorial - do inglês, <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COMEPE	Comitê de ética e pesquisa da Universidade Federal do Ceará
DEA	Disfunção entérica ambiental



EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAST-1	Enterotoxina termostável 1 de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
ECD	<i>Escherichia coli</i> diarreiogênica
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimático – do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ESBL	Beta-lactamase de espectro estendido
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
<i>fliC</i>	Gene codificador da flagelina
GEMS	Estudo Multicêntrico Entérico Global– do inglês, <i>Global Enteric Multicenter Study</i>
GRVs	Genes relacionados à virulência
HAZ	Escore z altura por idade
HEp-2	Linhagem celular derivada de carcinoma laríngeo humano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
ICE	Elementos integrativos e conjugativos
I - FABP	Proteína de ligação aos ácidos graxos –do inglês, <i>Intestinal Fatty Acid-Binding Protein</i>
IL- 8	Interleucina -8
IL - 1 $\beta$	Interleucina - 1 $\beta$
LAL	Padrão de aderência lateral localizada
LB	Luria bertani
LDI	Laboratório de doenças infecciosas
LPS	Lipopolissacarídeo
MAL-ED	<i>Malnutrition - Enteric Diseases</i>



MLST	Tipagem de sequência multilocus – do inglês, <i>MultilocusSequenceTyping</i>
MPO	Mieloperoxidase
NEO	Neopterina
NFKB	Fator Nuclearkappa B
pAA	Plasmídeo de aderência agregativa
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pet	Toxina codificada por plasmídeo
PFGE	Eletroforeses em gel de campo pulsado
Pic	Proteína envolvida na colonização
PMN	Polimorfonucleares
REG1B	Gene regenerador 1 $\beta$
SAA	Amiloide sérica tipo A
SepA	Proteína extracelular de <i>Shigella</i>
SPATE	Serino proteases autotransportadora de <i>Enterobacteriaceae</i>
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina <i>shiga</i>
Ta	Temperatura de anelamento
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<i>Toll-like 5</i>	Receptor de <i>Toll-like 5</i>
TSA	Teste de sensibilidade antimicrobiana
TSA	Ágar triptona de soja
TSB	Caldo triptona de soja
TSPE4.C2	Fragmento de DNA TSPE4.C2
UFC	Universidade Federal do Ceará
UNICEF	Fundo das Nações Unidas
UPC	Unidade de Pesquisa Clínica
WAZ	Escore z peso-por-idade – do inglês, weight-for-age
WHZ	Escore z peso- por- altura – do inglês, weight-for-height



## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
AMU	Unidade de mediana de IgA
$\beta$	Beta
°C	Graus Celsius
GMU	Unidade de mediana de IgG
mL	Mililitro
Ng	Nanogramas
Pb	Pares de bases
Pg	Picogramas
$\mu$ l	Microlitro
UFC	Unidade formadora de colônia
®	Marca registrada



## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.</b>	<b>Desnutrição infantil.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.</b>	<b><i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.</b>	<b><i>Escherichia coli</i> enteroagregativa.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.1.</b>	<b><i>Aspectos históricos e epidemiológicos</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>2.4.</b>	<b>Filogenética de EAEC.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5.</b>	<b>Patobiologia de EAEC.....</b>	<b>26</b>
<b>2.6.</b>	<b>Fatores de virulência.....</b>	<b>27</b>
<b>2.6.1.</b>	<b><i>Adesinas</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>2.6.2.</b>	<b><i>Dispersinas</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>2.6.3.</b>	<b><i>Formação de biofilme</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>2.6.4.</b>	<b><i>Produção de toxinas</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>2.6.5.</b>	<b><i>Genes regulatórios</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>2.7.</b>	<b>Resposta imunoinflamatória associada à EAEC.....</b>	<b>30</b>
<b>2.8.</b>	<b>Manifestações clínicas.....</b>	<b>31</b>
<b>2.9.</b>	<b>Diagnóstico de EAEC.....</b>	<b>31</b>
<b>2.10.</b>	<b>Resistência antimicrobiana em <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1.</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>37</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
<b>4.1.</b>	<b>Descrição do estudo e Considerações éticas.....</b>	<b>38</b>
<b>4.2.</b>	<b>Obtenção de dados e Coleta das amostras.....</b>	<b>39</b>
<b>4.3.</b>	<b>Isolamento das cepas bacterianas de <i>E. coli</i> em fezes.....</b>	<b>40</b>



4.4.	Extração do DNA bacteriana de <i>E. coli</i> .....	40
4.5.	Quantificação/Qualidade do DNA extraído.....	41
4.6.	Diagnóstico molecular de <i>E. coli</i> .....	41
4.7.	Pesquisa de co-infecção.....	41
4.8.	Deteccção dos genes relacionados à virulência.....	42
4.9.	Triagem das cepas bacterianas de EAEC.....	46
4.10.	Deteccção de Filogrupos.....	46
4.11.	Formação de Biofilme.....	47
4.12.	Teste de sensibilidade antimicrobiana.....	49
4.13.	<i>Screening</i> e teste confirmatório para detecção de beta-lactamases de espectro estendido(ESBL).....	51
4.14.	Deteccção de biomarcadores de inflamação.....	51
4.15.	Análise estatística.....	52
5.	RESULTADOS.....	54
5.1.	Caracterização da população e prevalência de EAEC do estudo..	54
5.2.	Análise de Coinfecções.....	55
5.3.	Deteccção dos genes de virulência de EAEC.....	56
5.4.	Deteccção dos Filogrupos de EAEC.....	58
5.5.	Formação de biofilme de EAEC.....	58
5.6.	Deteccção de resistência antimicrobiana entre os isolados de EAEC.....	61
5.7.	Análise de biomarcadores de inflamação intestinal.....	63
6.	DISCUSSÃO.....	65
7.	CONCLUSÃO.....	72
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
9.	ANEXO A.....	87
10.	ANEXO B.....	90
11.	ANEXO C.....	96



## 1. INTRODUÇÃO

Desnutrição infantil continua sendo um problema que acomete principalmente países em desenvolvimento (BLACK et al., 2013). Um dos patótipos de *Escherichia coli*, a *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), tem sido considerada um importante patógeno associado a infecções entéricas em crianças e adultos (LIMA et al., 2000; MOORE et al., 2010; MORENO et al., 2010; TANIUCHI et al., 2013) e também a um déficit de crescimento infantil em crianças de países em desenvolvimento (HAVT et al., 2017; PLATTS-MILLS et al., 2017). Além disso, o referido microrganismo é associado a infecções entéricas em viajantes que retornaram de países em desenvolvimento (LAAVERI et al., 2017).

A patobiologia de EAEC é complexa e ainda permanece incerta devido à alta heterogeneidade das cepas, no qual muitos indivíduos desenvolvem quadros clínicos característicos enquanto outros apresentam infecção assintomática (LIMA et al., 2013). A presença desse patógeno nos primeiros anos de vida, independente da sua relação com a sintomatologia, está relacionado a um déficit de crescimento infantil (ROGAWSKI et al., 2017). Muitos genes de virulência têm sido descritos em trabalhos realizados em vários países, para tentar compreender os mecanismos que estão envolvidos na virulência bacteriana (BOISEN et al., 2012; ALI et al., 2014; HAVT et al., 2017).

A detecção de uma alta prevalência de infecções por enteropatógenos em pessoas assintomáticas levou a um crescente aumento nos estudos sobre disfunção entérica ambiental (DEA), no qual os dados mostram associação entre infecções assintomáticas e esse quadro patológico (GUERRANT et al., 2016; MAL-ED, 2017). Além das morbidades associadas a esse tipo de infecção, pesquisas têm demonstrado altas taxas de resistência antimicrobiana adquirida por EAEC, principalmente a beta-lactâmicos (ALI et al., 2014; BANFADEH; HAGHI; ZEIGHAMI, 2015).

Tendo em vista a importância epidemiológica de infecções por EAEC, se faz necessário estudos que promovam uma melhor caracterização das cepas circulantes em crianças para o entendimento da patobiologia dessas infecções. Nesse sentido, o presente trabalho se propõe investigar os genes relacionados à virulência, perfil de sensibilidade antimicrobiana, bem como a formação de biofilme e resposta imuno-inflamatória relacionada a cepas de EAEC isoladas de crianças nutridas e desnutridas.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Desnutrição infantil

De acordo com o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), desnutrição é uma deficiência energético-proteica que está associada a diversos fatores como déficit de alimentação e infecções persistentes que, particularmente, acometem populações em ambientes menos desenvolvidos (UNICEF, 2013).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) indica três sistemas diferentes pelos quais uma criança ou um grupo de crianças podem ser comparados à população de referência para a classificação de desnutrição: escores Z (escores de desvio padrão), percentil e porcentagem de mediana. Entretanto, para uma avaliação de base populacional, incluindo pesquisas e vigilância nutricional, o escore Z é amplamente reconhecido como o melhor sistema para análise e apresentação de dados antropométricos (WHO, 1997).

Os índices ou escores Z antropométricos utilizados para avaliar o estado nutricional são (WHO, 2006):

- escore Z peso por altura (WHZ, do inglês *weight-for-height Z score*);
- escore Z altura por idade (HAZ, do inglês *height-for-age Z score*);
- escore Z peso por idade (WAZ, do inglês *weight-for-age Z score*).

Os índices antropométricos também são usados para definir os diferentes tipos de desnutrição. A desnutrição aguda ou baixo peso (do inglês, *wasting*) é definido como índice de baixo peso para altura (WHZ) e é, na maioria dos casos, um indicativo de um processo recente de perda de peso. Entretanto, a desnutrição crônica ou nanismo (do inglês, *stunting*) é definida pelo índice de baixa altura para a idade (HAZ), resultante de uma condição subótima de saúde e/ou nutrição. Em contrapartida, a subnutrição é caracterizada pelo índice de baixo peso para idade (WAZ), ou seja, é influenciado tanto pelo índice WHZ, como pelo índice HAZ, culminando numa interpretação complexa (ACF, 2010; WHO, 2017).

A OMS (2017) classifica a desnutrição de acordo com a gravidade, definida clinicamente por um valor de escore Z, conforme descrito na **Tabela 1**.



**Tabela 1** Classificação para avaliar a gravidade da desnutrição.

<b>Classificação</b>	<b>Escore Z</b>
Normal	escore $Z \geq -1,0$ DP*
Leve	$-2,0 \leq \text{escore } Z < -1,0$ DP
Moderada	$-3,0 \leq \text{escore } Z < -2,0$ DP
Grave	escore $Z < -3,0$ DP

Fonte: Adaptado de WHO (2017).

Nota: \*DP - Desvio padrão de referência segundo a OMS (2006).

A desnutrição infantil é um problema de dimensões alarmantes em grande parte do mundo, associada à pobreza e à desigualdade. A desnutrição é uma expressiva causa de mortalidade de crianças nos países em desenvolvimento, apesar dos índices terem diminuído nas últimas décadas (BLACK et al., 2013; WHO, 2017). Desse modo, a diminuição do estado nutricional causa uma consequência patológica, bem como um fator de risco para doenças e desnutrição exacerbada, podendo aumentar o risco de morbidade e mortalidade. Embora raramente seja a causa direta da morte (exceto em situações extremas, como a fome), a desnutrição infantil foi associada a 54% das mortes infantis (10,8 milhões de crianças) nos países em desenvolvimento em 2001 (WHO, 2005).

No Brasil não existe um retrato abrangente e atualizado da desnutrição na primeira infância. Os últimos dados de prevalência apontam que houve uma redução das taxas nacionais, na qual a prevalência de desnutrição aguda foi de apenas 1,5% e de desnutrição crônica foi de 7% em 2006/2007 (VICTORA et al., 2011). As taxas de mortalidade também indicaram queda, permitindo o país alcançar a meta do milênio, estipulada no quarto objetivo de desenvolvimento do milênio, reduzindo a mortalidade de 219 mil do ano 2000 a 52 mil em 2015 (UNICEF; WHO; WB; UNPD, 2015).

A desnutrição compõe um ciclo vicioso que inclui infecção entérica, com ou sem diarreia, e ambas as patologias permanecem interligadas de tal forma que uma contribui para a presença e permanência da outra. Este ciclo infecção entérica-desnutrição, com ou sem sintomatologia, pode prejudicar a capacidade absorptiva intestinal, comprometendo os



mecanismos imunológicos e acarretando na progressão da doença (GUERRANT et al., 2013). Portanto, a ausência de sintomatologia em uma infecção não deve ser negligenciada e nos últimos anos tem havido grande empenho da comunidade científica para demonstrar a importância clínica, bem como a sua relação com a DEA (GUERRANT et al., 2016; WATANABI, PETRI, 2016; HARPER et al., 2018).

DEA é um termo utilizado para designar um conjunto de alterações no intestino delgado, funcionais e morfológicas, sem manifestações clínicas evidentes, que afetam crianças provenientes de famílias com baixo nível socioeconômico e que vivem em situação de risco, com elevada taxa de contaminação ambiental, ausência de saneamento básico, ingestão alimentar deficiente e desmame precoce (HARPER et al., 2018).

No contexto da DEA, é hipotetizado que os patógenos entéricos ou seus produtos passem do lúmen intestinal em direção à lâmina própria, promovendo a infiltração linfocitária na mucosa, podendo causar danos nas vilosidades, obtendo redução da superfície da área absorptiva e ruptura da barreira intestinal, o que caracteriza o impacto do ciclo infecção-desnutrição no hospedeiro (CRANE, JONES, BERKLEY, 2015; SYED, ALI, DUGGAR, 2016).

Estudos apontam que os patógenos mais comuns envolvidos na desnutrição infantil na DEA sejam as *Escherichia coli* diarreio gênicas (ECD) (GUERRANT et al., 2016; HAVT et al., 2017; MAL-ED, 2017).

## **2.2. *Escherichia coli***

*Escherichia coli* é uma espécie de bactéria comumente comensal do trato gastrointestinal de mamíferos/aves. São bacilos, Gram negativos, móveis, positivos para produção de indol, oxidase negativo, pertencentes à família Enterobacteriaceae, gênero *Escherichia*. Este agente é anaeróbio facultativo, portanto capaz de crescer em aerobiose e anaerobiose, preferencialmente a 37°C. É geralmente isolado a partir de amostras fecais por plaqueamento em meios seletivos e diferenciais, como, por exemplo, o ágar MacConkey, onde a espécie cresce como colônias de coloração rosa, indicando fermentação da lactose (CROXEN et al., 2013).

Devido à ocorrência de mutações genéticas com o ganho ou perda de genes, a *E. coli* tornou-se um patógeno altamente diverso e adaptado, podendo causar uma ampla gama de doenças humanas que se estendem do trato gastrointestinal, ocasionados pelas ECDs, a locais extraintestinais, tais como o trato urinário, a corrente sanguínea e o sistema nervoso central (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).



As ECDs apresentam-se como um dos principais agentes infecciosos nos casos de diarreia e desnutrição infantil (TANIUCHE et al., 2013; ALI et al., 2014; ROGAWSKI et al., 2017) e são classificadas em seis patotipos: *E. colienteropatogênica* (EPEC); *E. colienterohemorrágica* (EHEC) ou *E. coli* produtora de toxina shiga (STEC); *E. colienteroagregativa* (EAEC); *E. colienteroinvasiva* (EIEC); *E. colienterotoxigênica* (ETEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (NATARO; KAPPER, 1998; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

O patotipo EAEC foi descrito pela primeira vez por pesquisadores ao analisar o padrão de aderência de cepas isoladas de crianças com diarreia, em 1987. Desde então, EAEC tem sido considerada um patógeno associado à diarreia aguda ou persistente em crianças ou adultos, pacientes com imunodeficiência adquirida e crianças com déficit de crescimento em países em desenvolvimento (NATARO et al., 1987; LIMA et al., 2000; SAMIE et al., 2007; ANDRADE; HAAPALAINEN; FAGUNDES-NETO, 2011; ALI et al., 2014; GUTIERREZ et al., 2014; HAVT et al., 2017).

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

### **2.3.1. Aspectos históricos e epidemiológicos**

EAEC foi descoberta, no ano de 1987, em um estudo que teve como objetivo analisar o padrão de aderência de 516 cepas de *Escherichia coli* isoladas a partir de fezes de 154 crianças com diarreia e 66 crianças saudáveis, provenientes do Chile. Ao analisar as cepas de *E. coli*, foram observados dois padrões de aderência distintos dos descritos anteriormente em células de carcinoma laríngeo humano (HEp-2) (NATARO et al., 1987).

O primeiro padrão de aderência observado foi uma aderência difusa (AD), identificada em toda a monocamada celular, com pouca agregação e pouca aderência à lâmina de vidro; no segundo padrão, observou-se uma aderência agregativa (AA) de células bacterianas semelhante a tijolos empilhados (*stacked-brick*), tanto na superfície da monocamada das células HEp-2 quanto na superfície de vidro utilizada como suporte para crescimento dessas células. Este último padrão característico foi base para a nomenclatura destas cepas, chamando-se *Escherichia coli* enteroagregativa. Este foi o primeiro estudo a propor que a EAEC seria um microrganismo patogênico, pois apresentou uma maior frequência no grupo dos casos em comparação ao grupo controle (NATARO et al., 1987).

Em 1995, o mesmo grupo de pesquisadores realizou um estudo com voluntários que investigou a virulência de quatro cepas de EAEC por meio de desafio em humanos. Quatro protótipos de EAEC foram testadas: cepa de EAEC 042, isolada de uma criança com



diarreia em Lima, Peru; cepa de EAEC 17-2, isolada de uma criança com diarreia no Chile; cepa de EAEC 34b, isolada de uma criança com diarreia persistente na Índia e a cepa JM221, isolada de um adulto com diarreia no México. Os pesquisadores observaram nesse estudo que a cepa 042 foi causadora de doença diarreica em alguns voluntários e as demais cepas não ocasionaram qualquer sintoma, indicando assim a heterogeneidade deste grupo de bactérias (NATARO et al, 1995). Desde então, esse patógeno tem sido descrito em diversos estudos, tendo uma alta prevalência em vários países, principalmente aqueles em desenvolvimento (KOTLOFF et al., 2013; LIMA et al, 2013; PLATTS-MILLS et al., 2015).

A EAEC é também considerada um patógeno oportunista associada com diarreia em pacientes com imunodeficiência adquirida e em crianças desnutridas em países em desenvolvimento (SAMIE et al., 2007; HAVT et al., 2017). Além disso, estudos anteriores demonstraram associação do patógeno com diarreia do viajante e surtos de diarreia que ocorreram na Europa e na Ásia (ITOH et al., 1997; PASCHKE et al, 2010; JENSEN et al, 2014). Um surto em larga escala, que ocorreu em 2011, ocasionou diarreia e síndrome hemolítica urêmica em aproximadamente 4.000 pessoas, resultando em 54 mortes. Esse surto foi causado por uma EAEC produtora de toxina shigatorotipo O104:H4 com um conjunto distinto de fatores de virulência (FRANK et al, 2011; BERRY et al, 2014; BOISENet al, 2015).

Um estudo caso-controle multicêntrico prospectivo de diarreia infantil, intitulado de “Estudo Multicêntrico Entérico Global” (GEMS - *The Global Enteric Multicenter Study*) avaliou crianças com idade entre 2 e 54 meses, com diarreia moderada a grave, em países da África e Ásia e encontrou uma alta prevalência de infecções por EAEC nessa população, embora sem associação com a doença (KOTLOFF et al., 2013). O mesmo achado foi encontrado em um estudo coorte multicêntrico intitulado “Etiologia, Fatores de Risco e Interações de Infecções Entéricas e Desnutrição e as Consequências para a Saúde Infantil”, ou estudo MAL-ED, que foi desenvolvido em países da América do Sul, Ásia e África, e avaliou crianças nos primeiros dois anos de vida, constatando que infecção por EAEC foi a segunda e a terceira mais prevalente no primeiro e segundo ano de vida dessas crianças, respectivamente. No entanto, EAEC não foi associado a casos de diarreia (PLATTS-MILLS et al., 2015). Esses estudos mostraram o amplo espectro clínico de EAEC, sendo este associado tanto a condições clínicas como a condições subclínicas (FANG et al., 1995; LIMA et al., 2000; MORENO et al., 2010).

No Brasil, altas taxas de infecções por EAEC já foram demonstradas em diferentes regiões, tanto em crianças como em adultos, sendo associada a casos de diarreia



aguda, diarreia persistente e condições assintomáticas(STEINER et al., 1998; LIMA et al., 2000; ZAMBONI et al., 2004;BUERIS et al., 2007;MORENO et al., 2010;LIMA et al., 2013; LOZER et al., 2013;). As maiores taxas encontram-se nas regiões sudeste e nordeste, chegando a 71% em estudo realizado por Liebchen et al. (2011) em amostras diarreicas na cidade de São Paulo e 41 % em pesquisa realizada por Lima et al. (2013) na cidade de Fortaleza. Neste último estudo foi detectada uma alta prevalência desse patógeno a quadros assintomáticos.

Devido arecentes associações de infecções por EAEC a condições subclínicas, estudos têm demonstrado o impacto dessas infecções no déficit de crescimento infantil.Pesquisas têm demonstrado associações da presença desse patógeno à desnutrição infantil (GUTIÉRREZ et al., 2014; HAVT et al., 2017; ROGAWSKI et al, 2017). Estudo realizado em crianças de baixo nível socioeconômico no Panamá relatou uma associação de infecções por EAEC a um déficit de crescimento nessa população(GUTIÉRREZ et al., 2014).

O estudo MAL-ED, ao analisars efeitos da infecção por enteropatógenos, da diarreia eda dieta no crescimento de crianças nos primeiros dois anos de vida, encontrou taxas mais altas de detecções de enteropatógenos em fezes não diarreicas,sendo associadas a um crescimento linear mais lento. Neste estudo,infecções por *Campylobactere* EAEC,de formas isoladas, foram relacionadas a um déficit de crescimento, no qual,crianças com detecções de EAEC apresentavam  $0,85 \pm 0,31$  cm e  $0,09 \pm 0,14$  kg a menos do que crianças sem a detecção do patógeno(MAL-ED, 2017).

Segundo Jensen et al (2014), a patogênese da infecção da EAEC ainda não foi totalmente entendida. O principal obstáculo para identificar o mecanismo de patogênese desta bactéria é a heterogeneidade das cepas. Em alguns indivíduos há associação clara de EAEC com a diarreia e em outros indivíduos ela parece causar infecção subclínica, ou apenas colonização intestinal.

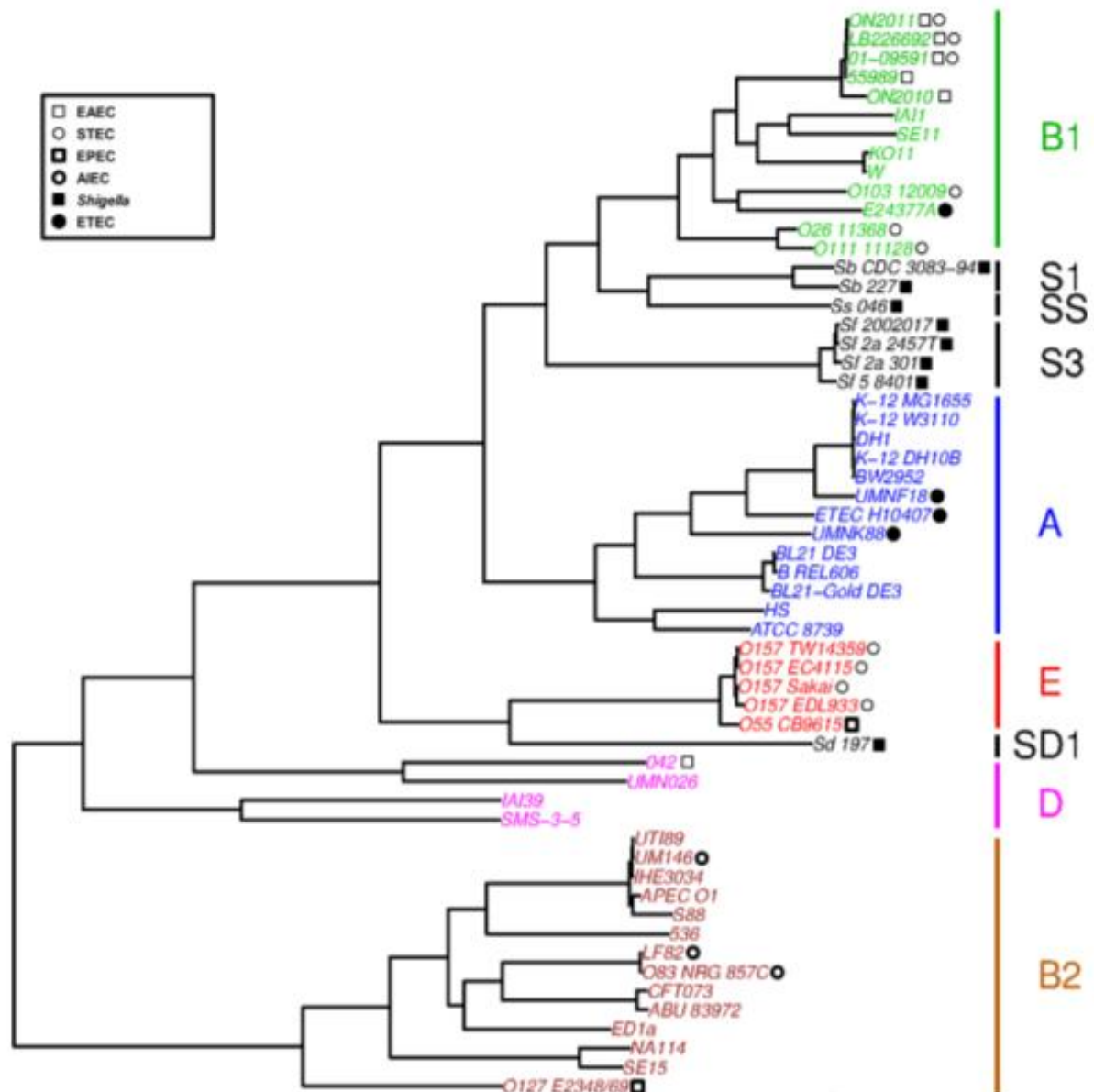
## 2.4. Filogenética de EAEC

Como população, as cepas de *E. coli* podem ser filogeneticamente distribuídas em cinco filogrupos principais, A, B1, B2, D e E demonstrados na **Figura 1** (HAO et al., 2012). Os isolados comensais se agrupam principalmente no filogrupo A, já os filogrupos B2 e D estão frequentemente associados às cepas de *E. coli* extraintestinais. No entanto, nem todos os patotipos de *E. coli* se agrupam de forma homogênea em todos os filogrupos (TOUCHON et al., 2009). Por exemplo, ETEC agrupa-se nos grupos filogenéticos A e B1 (SAHL et al., 2011), enquanto a EAEC agrupa-se nos grupos filogenéticos A, B1, B2 e D, demonstrando a



natureza heterogênea dos genótipos de *E. coli* patogênicas (CLERMONT et al., 2003). A genética populacional e a evolução de cepas de *E. coli* comensais e patogênicas estão em constante revisão (CHATTAWAY et al, 2016; ZHANG et al, 2016).

**Figura 1** - Árvore filogenética de *E. coli* intestinal patogênica.



Fonte: Adaptado de HAO et al. (2012)

As cepas de *E. coli* podem ser agrupadas em cinco grupos filogenéticos principais: A (azul), B1 (verde), B2 (marrom), D (rosa) e E (vermelho). Shigella / EIEC também formam filogrupos adicionais (preto). As cepas híbridas EAEC e STEC denotam tanto um quadrado aberto quanto um círculo aberto. As cepas não marcadas são *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC), ou *E. coli* patogênica aviária (APEC). As cepas de ETEC são isoladas de humanos e animais, enquanto DAEC não é representada na árvore filogenética.



Clermont et al. (2000) criou uma metodologia para identificar os grupos filogenéticos A, B1, B2 e D de EAEC, através de um PCR múltiplo, utilizando dois genes, o *chuA* e o *yjaA*, e um fragmento de DNA TSPE4.C2. Diversos estudos utilizam esta metodologia para a detecção desses filogrupos (REGUA-MANGIA et al., 2009; BOISEN et al., 2012; MOSQUITO et al., 2015).

A precisa identificação de algumas bactérias patogênicas pode ser um desafio, pois a plasticidade genômica destas pode confundir sua classificação, criando distintos padrões de ausência/presença de genes de virulência entre cepas que estão intimamente relacionadas, e recombinação de homólogos que podem gerar uma “falsa identidade” entre cepas distantemente relacionadas. Para tanto, há necessidade de estudos que possam estabelecer identificações entre os patógenos de forma mais fidedigna (HAO et al., 2012).

Existem outras metodologias para a análise filogenética de microrganismos, tais como a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE - *Pulse Field Gel Electrophoresis*) que é um método padronizado para comparação genética de patógenos. Embora a PFGE possa identificar diferenças genômicas entre os isolados, não fornece sequência específica de informação de DNA, e, portanto, não se mostra uma metodologia eficaz para entender a diversidade genética e a história evolutiva das cepas (DAVOODABADI et al., 2015). A outra metodologia é a tipagem de sequências de Multilocus (MLST - *Multi Locus Sequence Typing*) que se tornou um método para inferir relações evolutivas e permitir que cepas distintas de tipos de sequências semelhantes possam ser agrupadas em complexos clonais (LIEBCHEN et al., 2011; SABARLY et al., 2011; NÜESCH-INDERBINEN et al., 2013).

## 2.5. Patobiologia de EAEC

A patogênese da infecção por EAEC continua incerta devido à heterogeneidade das cepas. Entretanto, alguns estágios principais deste processo são descritos, como a capacidade de EAEC aderir-se à mucosa intestinal através das fímbrias de aderência agregativa e outros fatores de aderência do microrganismo (BOISEN et al., 2008). Posteriormente, há o aumento da produção de muco pelas células do hospedeiro, seguida por um depósito de biofilme na superfície dos enterócitos (HARRINGTON, 2009). Por fim, a resposta inflamatória é desencadeada com a liberação de citocinas (HARRINGTON, 2005), que, consequentemente, pode levar a danos na mucosa intestinal (STRAUMAN et al., 2010).

Muitas adesinas, toxinas e proteínas envolvidas na patogênese da infecção por EAEC têm sido descritas, mas a prevalência dos genes que codificam esses fatores de virulência é altamente variável e nenhum desses tem sido encontrado em todas as cepas de



EAEC (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012; LIMA et al., 2013; HAVT et al. 2017).

## **2.6. Fatores de virulência**

### **2.6.1. Adesinas**

Os patógenos bacterianos possuem fatores de adesão específicos, chamados de fímbrias, que são responsáveis pelo reconhecimento de receptores nas células hospedeiras antes da colonização (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012). EAEC possui fímbrias responsáveis por sua adesão ao tecido intestinal do hospedeiro. Cinco variantes da fímbria de aderência agregativa (AAF) de EAEC já foram descritas, sendo elas: AAF/I, codificada pelo gene *aggA*; AAF/II, codificada pelo gene *aafA*; AAF/III, codificada pelo gene *agg3A*; AAF/IV, codificada pelo gene *agg4A* (LIMA et al., 2013; BERRY et al., 2014). Em 2015, um estudo realizado por Jonsson et al. descobriu uma nova fímbria chamada AAF/V codificada pelo gene *agg5A*.

Essas variantes são codificadas no plasmídeo de aderência agregativa (pAA) e reguladas por um gene ativador chamado regulador de aderência agregativa AraC/XylS (*aggR* - *aggregativeadherenceregulator*) (LIMA et al., 2013). O gene *aggR* também possui o papel de regular a transcrição do gene *aap* que codifica a proteína dispersinae do seu transportador, codificado pelo gene *aatA* (SHEIKH et al., 2002).

### **2.6.2. Dispersina**

Uma fase importante na fisiopatologia é a dispersão bacteriana, onde há um deslocamento de EAEC para outros sítios de infecção. Para que isso ocorra EAEC secreta uma proteína denominada dispersina, codificada pelo gene *aap*. Esta proteína possui o papel de ligar-se não covalentemente ao lipopolissacarídeo (LPS), neutralizando a sua carga e assim permitindo que as fímbrias se desprendam para que a bactéria possa infectar outros locais (SHEIKH et al., 2002).

### **2.6.3. Formação de biofilme**

Após a adesão, a EAEC estimula a secreção de muco pelos enterócitos formando um biofilme de agregação espessa, no qual as bactérias se envolvem com substâncias exopoliméricas e recrutam mais células para formar microcolônias intercaladas com canais de passagem de líquido (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Esse processo é um



fator de virulência importante, que pode fornecer resistência ao microrganismo contra a atividade de agentes físicos e químicos (RICKARD et al., 2003; VIJAY et al., 2015), bem como contribuir para infecções prolongadas, ao permitir que bactérias evadam o sistema imunológico local, podendo inibir a quimiotaxia, a fagocitose, a proliferação de linfócitos e limitando a atuação dos macrófagos, além de prevenir o transporte de agentes antimicrobianos (VASUDEVAN et al., 2003; TOKUDA et al., 2010). Existem diversos fatores e genes que contribuem para o estabelecimento do biofilme. Estudo realizado por Mohamed et al. (2007) associou os genes *aggR*, *set1A*, *aatA* e *irp2* de EAEC a esse processo.

#### 2.6.4. Produção de toxinas

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

Serino proteases autotransportadoras de Enterobacteriaceae (SPATEs - *Serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae*) são serino proteases produzidas pela família Enterobacteriaceae e são secretadas por uma via de secreção do tipo III. Estas proteínas são classificadas filogeneticamente em duas classes: classe I que são citotóxicas e inclui várias toxinas como Pet (toxina codificada por plasmídeo - *plasmid-encoded toxin*), SigA (protease homóloga de IgA de *Shigella* - *Shigella IgA-like protease homolog*) e Sat (toxina autotransportadora secretada - *secreted autotransporter toxin*); classe II que não são citotóxicas e possuem diversas proteases como o Pic (*protein involved in colonization* - proteína envolvida na colonização) responsável pela produção de uma mucinase e SepA (protease extracelular de *Shigella* - *Shigella extracellular protease*) responsável pela invasão celular (JENSEN et al., 2014; RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014).

A toxina Pet tem a função de clivar a espectrina do citoesqueleto epitelial, resultando na deformação e esfoliação da célula intestinal (NAVARRO-GARCIA et al., 1999). Abreu et al. (2015) demonstraram o papel da serino protease Pic de EAEC na evasão do sistema imune, devido a sua atividade proteolítica sobre as proteínas secretadas pelo sistema complemento do hospedeiro.

EAST-1 (toxina termoestável de EAEC - *heat-stable enterotoxin*) codificado pelo gene *astA*, não pertence ao grupo das SPATEs e partilha algumas propriedades funcionais com a enterotoxina secretada pela ETEC. Essa toxina causa um aumento da secreção de cloreto e tem sido associado à diarreia, demonstrando ser uma importante toxina na fisiopatologia da infecção por EAEC (MÉNARD; DUBREUIL, 2002).

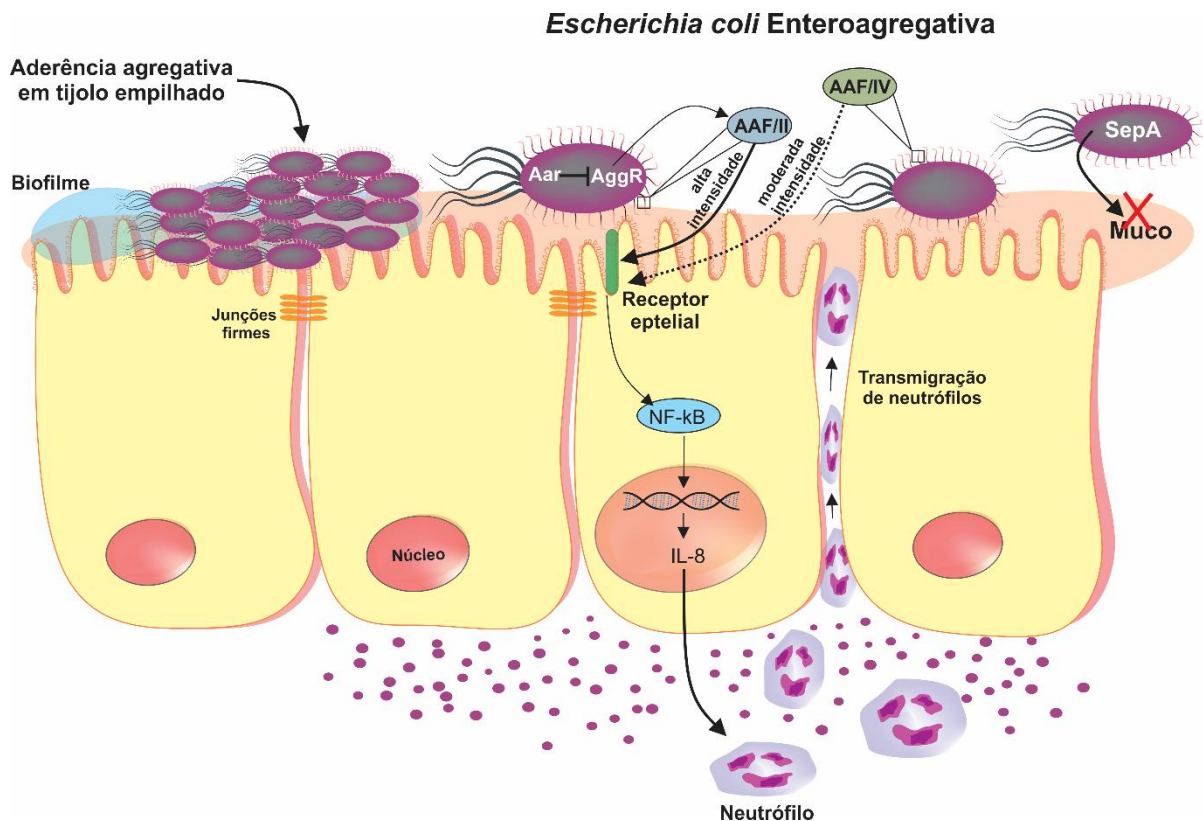


### 2.6.5. Genes regulatórios

Em relação à presença do gene *aggR*, alguns estudos vêm classificando cepas de EAEC em típicas e atípicas. Cepas que possuem o gene *aggR* são consideradas EAEC típicas e as que não possuem são EAEC atípicas (BEATA et al., 2011; ANDRADE; GOMES; ELIAS, 2014; ANDRADE et al., 2017). Esse gene é um importante ativador transcricional, que modula diversos genes que codificam proteínas importantes para a patobiologia de EAEC, incluindo a biogênese da AAF/II, a dispersina e seu sistema secretório, *Shf* (codificador de proteína homóloga à *Shigella flexneri*) e um *cluster* cromossômico denominado *Aai*, responsável pela codificação do sistema de secreção tipo VI (BOISEN et al., 2015; ELIAS, NAVARRO-GARCIA, 2016).

Recentemente foi descoberta uma proteína regulatória, codificada pelo gene *orf60* ou *orf61*, agora denominada gene *aar*, que pertence a uma larga família de reguladores negativos de bactérias Gram-negativas patogênicas. Os pesquisadores supõem que essa família possui o papel de atenuar a virulência dessas bactérias (SANTIAGO et al., 2014), pois alguns estudos mostram a associação do *aar* à infecções subclínicas corroborando com essa afirmação (BOISEN et al., 2012; LIMA et al., 2013; HAVT et al., 2017).

**Figura 2** Patobiologia da EAEC e os principais genes relacionados à virulência com relevância clínica.





Fonte: LIMA; MEDEIROS; HAVT, 2018.

As bactérias EAEC promovem a formação de biofilme e liberação de marcadores inflamatórios através da interação com o epitélio intestinal. Alguns fatores de virulência específicos podem desempenhar papéis importantes na patobiologia. O principal regulador de virulência, *AggR*, controla a expressão de vários genes, incluindo genes que codificam as AAF. O AAF/II promove a ligação com receptores epiteliais (como a fibronectina) e contribui para o biofilme e a inflamação intestinal, que é caracterizada pela indução de NF- $\kappa$ B, liberação de interleucina-8 (IL-8) e migração de neutrófilos.

## 2.7. Resposta imunoinflamatória em associação com EAEC

Diversos biomarcadores de inflamação e dano intestinal são descritos na literatura, no qual a proteína intestinal de ligação aos ácidos graxos (I-FABP) é uma proteína epitelial intracelular localizada principalmente nas extremidades das vilosidades do intestino delgado que é rapidamente libertada para a circulação após lesão do epitélio. Tem sido utilizado para indicar a gravidade do dano intestinal em adultos e crianças e tem uma meia-vida muito curta, refletindo lesão intestinal recente (VREUGDENHIL et al., 2011; ADRIAANSE et al., 2013). As proteínas regeneradoras (REG) estão envolvidas na regeneração de tecidos e proliferação celular. Concentrações aumentadas de proteínas REG em fezes indicam lesão epitelial (FUKUI et al., 1998; FUKUHARA et al., 2010).

O biomarcador utilizado para detecção de integridade e permeabilidade epitelial é o teste de dupla absorção de açúcar. Acredita-se que a inflamação intestinal crie pequenos poros entre as células epiteliais, permitindo a transportação via paracelular da lactulose, enquanto a atrofia do vilos reduz a área de superfície epitelial e a absorção de manitol. Uma maior razão lactulose-manitol (L: M) tem sido usada como uma indicação de DEA (DENNO et al. 2014).

A alfa-1-antitripsina (AAT) é uma proteína liberada durante a inflamação para proteger as células contra enzimas proteolíticas liberadas pelos neutrófilos durante a infecção. No entanto, a AAT não é sintetizada no intestino e a presença de AAT nas fezes reflete a perda de proteínas e o aumento da permeabilidade da circulação periférica para o lúmen do intestino (SERRES; BLANCO, 2014).

A translocação de LPS e outros produtos microbianos envolvem o sistema imune da mucosa, estimulando a ativação de células inflamatórias, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. A mieloperoxidase (MPO), uma enzima armazenada dentro de neutrófilos, está envolvida no processo inflamatório para debelar a infecção bacteriana (HAMPTON, KETTLE, WINTERBOURN, 1998). Neopterina (NEO) é produzida por macrófagos ou células dendríticas após estimulação por interferon- $\gamma$  (SEKI et al., 1996).

A infecção por EAEC induz uma resposta imune com a liberação de algumas citocinas pelas células do hospedeiro. Alguns estudos mostram o aumento dos níveis de IL-8,



interleucina -1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e lactoferrina fecal em pessoas infectadas por EAEC (STEINER et al., 1998; GUTIERREZ et al., 2014). Estudos realizados por Steiner et al. (2000) e posteriormente por Harrington et al. (2005) em modelo *in vitro*, sugeriram que a flagelina, codificada pelo gene *fliC*, fosse um importante fator para a resposta inflamatória no hospedeiro. Para tal, ambos os autores utilizaram uma cepa de EAEC mutante, sem o gene *fliC*, que induziu uma redução na resposta inflamatória em comparação com a EAEC, que possuía o gene, indicando a importância do mesmo na resposta inflamatória.

Pesquisas foram realizadas para compreender o mecanismo de ação da flagelina, demonstrando que esta 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 uma proteína quinase, o que estimula a ligação de NF-kB, 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).

Pesquisa realizada por Steiner et al. (1998) encontrou associação entre crianças infectadas por EAEC, que não apresentaram sintomatologia clínica (diarreia), com prejuízo no crescimento e estas crianças apresentaram elevadas concentrações de lactoferrina e IL-1 $\beta$  nas fezes.

Gutiérrez et al. (2014) demonstraram que a presença de lactoferrina fecal, um marcador de inflamação intestinal, pode ser um fator que contribui para o déficit de crescimento infantil, crianças que estavam infectadas por EAEC possuíam uma média de HAZ de -1,67 e quando se levou em conta as taxas de lactoferrina fecal houve uma diminuição de 0,13 na razão altura por idade.

## 2.8. Manifestações clínicas

Infecções por EAEC podem apresentar diarreia aquosa, muitas vezes com muco, seguidas de náuseas, vômitos, febre, dor abdominal, e em alguns casos, fezes sanguinolentas (CROXEN et al., 2013; ALI et al., 2014). Embora os casos assintomáticos sejam os mais prevalentes, há evidências de outras manifestações clínicas tais como déficit de crescimento infantil (GUTIERREZ et al., 2014; HAVT et al., 2017; ROGAWSKI et al., 2017).

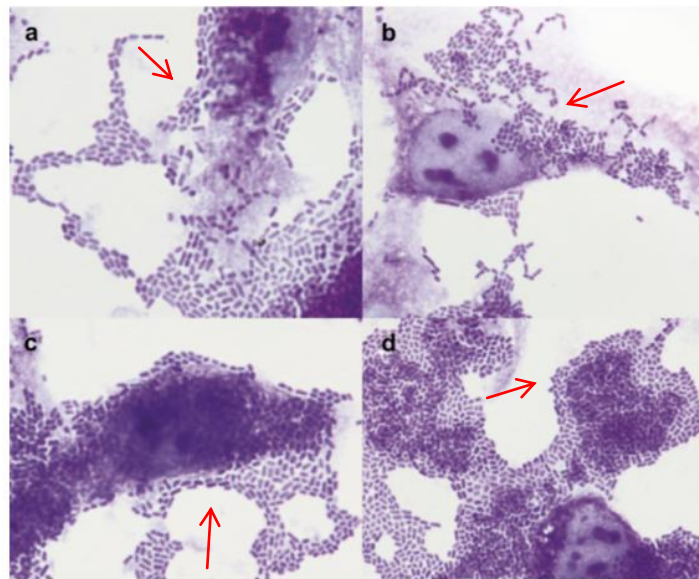
Estudo caso-controle de diarreia realizado na cidade de Fortaleza por Lima et al. (2013) permitiu a observação de algumas manifestações clínicas em crianças com diarreia causada por EAEC. A maioria dos casos de crianças com diarreia infectadas por EAEC apresentou uma taxa de 40% de diarreia de modo agudo, porém houve casos de diarreia persistente com uma taxa de 3.6%.



## 2.9. Diagnóstico de EAEC

O padrão ouro para o diagnóstico e identificação da EAEC é a visualização do padrão de aderência agregativa (AA) utilizando células HEp-2 como mostra a **Figura 3**. Nesta metodologia, de modo simplificado, cultiva-se EAEC em caldo Luria Bertani (LB) a 37° C. Em seguida, infectam-se as células HEp-2 por três horas. Após esse período, visualiza-se o padrão de aderência bacteriana em microscópio óptico (BENEVIDES-MATOS et al., 2015; CROXEN et al., 2013; NUESCH-INDERBINEN et al., 2013). Entretanto, Liebchen et al. (2011), ao analisar 59 cepas de EAEC provenientes de pessoas com quadros diarreicos, observou diferentes fenótipos de agregação em células de adenocarcinoma cervical humano (HeLa), tais como o fenótipo padrão de aderência agregativa (AA), aderência difusa (DA), aderência localizada (LAL) e a minoria não apresentou nenhum padrão de aderência, demonstrando a dificuldade de diagnóstico por essa metodologia.

**Figura 3** - Fotomicrografias ilustrando os padrões de aderência agregativa em células HEp-2.



Fonte: BEATA et al., 2011

Padrões de aderência agregativa em diferentes cepas de EAEC: (a) cepa de referência de EAEC17-2 positiva para *aggR* e *aatA*; (b) cepa de EAEC negativa para *aggR* e positiva para *aatA* de paciente com síndrome do intestino irritado; (c) cepa de EAEC positiva para *aggR* e negativa para *aatA* de criança com doença de Crohn; (d) EAEC *aggR* e *aatA* negativa de criança com diarreia aguda. Coloração: Giemsa. Visualização em 100x.

No ano de 1990, Baudry et al. desenvolveu uma sonda de DNA, chamada CVD432, específica para o plasmídeo AA. Os autores encontraram 89% de sensibilidade e 99% de especificidade da sonda em relação ao padrão ouro na identificação da EAEC. Atualmente o uso da biologia molecular é uma ferramenta comumente empregada para um diagnóstico simples e rápido de EAEC. Diversos genes cromossômicos e plasmidiais são utilizados para o diagnóstico molecular desse patógeno em muitos estudos, não havendo até o



momento consenso e padronização na utilização destes (LIEBCHEN et al., 2011; BENMESSAOUD et al., 2015; VIJAY et al., 2015; PLATTS-MILLS et al., 2017). Pode-se citar os genes *aaiA* e *eaaiG* que estão presentes no cromossomo bacteriano e os genes *aggR* e *aatA* no plasmídeo (ANDRADE; GOMES; ELIAS, 2014). Outros marcadores moleculares foram descritos para diagnóstico de EAEC como o gene *aaiC*, presente no cromossomo bacteriano (LIMA et al., 2013; HAVT et al., 2017; HOUPY et al., 2014).

## 2.10. Resistência antimicrobiana em *Escherichia coli*

A variabilidade genética é essencial para a evolução microbiana. A sobrevivência de um microrganismo depende de sua capacidade de se adaptar às mudanças ambientais no qual este se encontra (OPAL, POP-VICAS, 2015). Agentes antimicrobianos exercem fortes pressões seletivas em populações bacterianas, favorecendo organismos capazes de resistir a eles (TOLEMAN, WALSH, 2011).

Alguns mecanismos são responsáveis por essa variabilidade. Em um primeiro nível, pode haver uma mutação pontual, que é uma mudança microevolucionária, ocorrendo em um par de bases de nucleotídeos. Essas mutações podem alterar a especificidade do substrato da enzima ou o local alvo de um agente antimicrobiano, interferindo em sua atividade. Como exemplo, mutações pontuais em locais cruciais de genes que codificam  $\beta$ -lactamases (como os genes para Temoneira-1 [TEM-1] e sulfidril variável-1 [SHV-1]) que são os principais responsáveis pela notável variedade de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) reconhecidos (MEDEIROS, 1997; TAYH et al., 2016).

Um segundo nível de variabilidade genética em bactérias é referido como uma mudança macroevolutiva e resulta em rearranjos de grandes segmentos de DNA em um único evento. Estes rearranjos podem incluir inversões, duplicações, inserções, deleções ou transposição dessas grandes sequências de DNA de um cromossomo ou plasmídeo bacteriano para outro microrganismo. Esses rearranjos são gerados de forma frequente por elementos genéticos especializados chamados integrons, transposons ou sequências de inserção, que têm a capacidade de inserir, rearranjar ou mover parte do genoma bacteriano (TOLEMAN, WALSH, 2011).

Por fim, há outro mecanismo para obtenção de uma variabilidade genética, no qual as bactérias adquirem grandes segmentos de DNA “estranhos” transportados por plasmídeos, bacteriófagos ou elementos genéticos transponíveis especializados, conhecidos como elementos integrativos e conjugativos (ICE) de outras bactérias (OPAL; POP-VICAS, 2015). A herança desse DNA estranho contribui ainda mais para a variabilidade genética do



organismo e sua capacidade de responder às pressões de seleção impostas pelos agentes antimicrobianos. Esses mecanismos conferem às bactérias a capacidade aparentemente ilimitada de desenvolver resistência a qualquer agente antimicrobiano (MEDEIROS, 1997; TOLEMAN, WALSH, 2011).

Embora alguns genes que conferem resistência a antibióticos aumentem a carga metabólica bacteriana, muitos microrganismos desenvolveram estratégias para limitar esse custo, silenciando a expressão gênica quando não é necessário. Isso permite que genes de resistência a antibióticos sejam mantidos em reserva na ausência da pressão de seleção de antibióticos, mas expressam seu potencial de resistência na reexposição a essadroga (MASSEY; BUCKLING; PEACOCK, 2001).

Pelo menos quatro mecanismos distintos de resistência antimicrobiana têm sido descritos em bactérias, são elas: mecanismo enzimático, bomba de efluxo, mudança de conformação do receptor alvo e diminuição dos canais de porinas. Devido à constante evolução dos microrganismos, o patógeno EAEC tem adquirido resistência a diversos antimicrobianos nos últimos anos, principalmente a  $\beta$ -lactâmicos (ALI et al., 2014; BAFANDEH; HAGHI; ZEIGHAMI, 2015). Estudos têm demonstrado que o mecanismo mais prevalente envolvido na resistência de *E. coli* aos antibióticos é o enzimático, através das  $\beta$ -lactamases, no qual, essas enzimas desativam o antibiótico dividindo a ligação amida do anel  $\beta$ -lactâmico (BAJAJ, SINGH, VIRDI, 2016; AWOSILE et al., 2018; FLEECE et al, 2018).

O antibiótico  $\beta$ -lactâmico inibe o crescimento bacteriano ao interferir na reação de transpeptidação da síntese da parede celular bacteriana, ou seja, a parede celular bacteriana é formada por peptidoglicanos que são compostos por ligações cruzadas de N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico, existe um peptídeo ligado a cadeia final do N-acetilmurâmico chamado D-alanil-D-alanina. A proteína de ligação a penicilina (PBP) remove a alanina terminal no processo de formação de uma ligação cruzada com o peptídeo adjacente, os  $\beta$ -lactâmicos análogos do substrato D-Ala-D-Ala se ligam de forma covalente ao sítio ativo das PBPs inibindo essa reação de transpeptidação. Nesse contexto, as  $\beta$ -lactamases atuam no espaço periplasmático da bactéria hidrolisando o antimicrobiano, fazendo com que este perca a sua eficácia (OPAL; POP-VICAS, 2015).

As  $\beta$ -lactamases são codificadas por genes cromossômicos ou por genes que foram transferidos através de plasmídeos e/ou transposons. Além disso, os genes de betalactamases (*bla*) frequentemente residem em integrons, que carregam múltiplos determinantes de resistência, podendo facilitar uma maior disseminação da resistência a múltiplos fármacos entre diferentes espécies (WELDHAGEN, 2004).



Essas enzimas podem ser classificadas de acordo com a sua estrutura de aminoácidos em quatro classes moleculares, de A a D, conhecidas como classificação de Ambler. Alternativamente, o sistema de Bush-Jacoby-Medeiros classifica as enzimas de acordo com seu perfil de substrato e sensibilidade a inibidores de  $\beta$ -lactamases, como o ácido clavulânico, em vários grupos funcionais. Na classe A, C e D, da classificação de Ambler, as betalactamases hidrolisam o anel  $\beta$ -lactâmico através de um resíduo de serina no seu local ativo, enquanto enzimas de classe B são metalo- $\beta$ -lactamases que usam zinco ( $\text{Zn}$ )<sup>2+</sup> para quebrar a ligação amida (MOSQUITO et al., 2011).

Uma das primeiras  $\beta$ -lactamases foi descrita em 1940, por Abraham e Chain, como uma penicilinase capaz de hidrolizar a penicilina em *E. coli*, na mesma época em que o primeiro uso clínico de penicilina foi relatado na literatura (ABRAHAM, CHAIN, 1940). Com o passar do tempo e o advento de novos antimicrobianos, houve o surgimento de novas betalactamases, entre as mais de 890 betalactamases que já foram caracterizadas (MOSQUITO et al., 2011). Os genes que codificam as enzimas mais comuns dentro da família Enterobacteriaceae são: *blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M*, *blaOXA* e *blaKPC* (DALLENE et al., 2010; HAZEN et al. 2014; BAJAJ, SINGH, VIRDI, 2016; FLEECE et al., 2018).

Após o desenvolvimento de cefalosporinas de terceira geração, que antes eram estáveis à ação das betalactamases do tipo TEM e SHV, houve o surgimento e a disseminação global de enzimas de betalactamase de espectro estendido (ESBL), capazes de hidrolizar monobactam e cefalosporinas de amplo espectro (BAJAJ, SINGH, VIRDI, 2016). Além disso, relatos crescentes de disseminação de carbapenemases aumentaram a preocupação com o arsenal antimicrobiano atualmente limitado contra infecções por bactérias Gram-negativas multirresistentes (DALLENE et al., 2010; BONONO et al., 2018).

Alguns estudos detectaram cepas de EAEC produtora de ESBL (HAZEN et al., 2014; KHOSHVAGHT et al. 2014). Khoshvaght et al. (2014) detectou uma maior prevalência do gene *blaTEM* (78,9%), seguido pelo gene *blaCTX-M* (63,1%) e as cepas contendo ambos com uma taxa de 42,1%. O referido estudo também analisou cepas de EAEC produtoras de ESBL e demonstrou que os principais genes associados a esse fenótipo foram *CTX-M-14*, *CTX-M-55*, *CTX-M-15* e *CTX-M-65*.

Pesquisas também tem revelado a resistência de EAEC a outras classes antimicrobianas, tais como sulfonamidas, quinolonas, tetraciclina, cloranfenicol e aminoglicosídeos e essas resistências variam de acordo com a região do estudo (NÜESCH-INDERBINEN et al., 2013; DAVOODABADI et al., 2015). Estudo caso-controle de diarreia infantil realizado por pesquisadores no Egito caracterizou isolados de EAEC resistentes



ampicilina, cefalotina, cefotaxime, ceftriaxona, amoxicilina/ácido clavulânico, ácido nalidíxico, clorafenicol, estreptomicina e tetraciclina, e mais de 91% das cepas isoladas foram multiresistentes, portanto resistente a três ou mais classes de antimicrobianos (ALI et al., 2014).

Considerando a escassez de dados sobre o tema e a importância epidemiológica da EAEC como patógeno entérico de crianças em países em desenvolvimento como o Brasil, além de sua associação com déficit de crescimento infantil, DEA e do crescente aumento das taxas de resistência antimicrobiana neste patógeno nos últimos anos, fazem-se necessários mais estudos que promovam a caracterização destas cepas isoladas em crianças nutridas e desnutridas para um melhor entendimento da sua patobiologia.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Analisar os genes relacionados à virulência, filogrupos genéticos, formação de biofilme, resistência aos antimicrobianos e resposta imunoinflamatória associadas com cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa isoladas de crianças nutridas e desnutridas em Fortaleza, Brasil.

#### 3.2. Objetivos específicos

- 1) Correlacionar a identificação do patógeno EAEC em crianças nutridas e desnutridas com os genes relacionados à virulência detectados;
- 2) Detectar os grupos filogenéticos de cepas de EAEC por reação em cadeia da polimerase (PCR), bem como definir a distribuição destes filogrupos circulantes em crianças nutridas e desnutridas e avaliar a correlação destes filogrupos com os genes relacionados à virulência detectados;
- 3) Identificar a produção da biomassa de biofilme em cepas de EAEC em crianças nutridas e desnutridas, bem como verificar a correlação da formação de biofilme com os genes relacionados à virulência detectados;
- 4) Investigar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em cepas de EAEC por teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA), incluindo a detecção fenotípica de cepas portando beta-lactamases de espectro estendido;
- 5) Correlacionar os dados obtidos pelo estudo MAL-ED para a presença de biomarcadores de inflamação intestinal e sistêmica e o diagnóstico específico de EAEC, em crianças nutridas e desnutridas, tais como mieloperoxidase (MPO), neopterina (NEO),  $\alpha$ -1-antitripsina (ALA), gene regenerador 1 $\beta$  (REG1B) e calprotectina (CALPRO), forma solúvel de CD14 (CD14s), proteína intestinal de ligação de ácidos graxos (FABP), e amiloide sérica A (SAA), IgA anti-LPS e IgG anti-LPS.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Descrição do estudo e Considerações éticas

Este estudo do tipo caso-controle utilizou dados e amostras de um estudo epidemiológico clínico multicêntrico, intitulado “Etiologia, Fatores de Risco e Interações de Infecções Entéricas e Desnutrição e as Consequências para a Saúde Infantil”, ou estudo MAL-ED, liderado pelos Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos da América (*National Institutes of Health* – NIH) e financiado pela Fundação *Bill and Melinda Gates*. No Brasil, esse estudo foi realizado na cidade Fortaleza - Ce, no Instituto de Prevenção da Desnutrição e da Excepcionalidade - IPREDE localizado na regional IV de Fortaleza.

Apesquisa MAL-ED foi realizada no período de 19 de agosto de 2010 a 30 de setembro de 2013. No início do estudo houve a participação de 483 crianças, dessas 78 crianças não se encaixaram nos critérios de inclusão e 3 crianças saíram do estudo, totalizando 402 crianças participantes. Das 402 crianças incluídas no estudo, 201 foram considerados casos e 201 foram considerados controles, utilizando critério definido pelo escore Z de peso por idade (WAZ). As crianças controles deveriam apresentar  $WAZ \geq -1$ , enquanto as crianças casos teriam que apresentar  $WAZ < -2$  (**Figura 4**) (LIMA et al., 2018). Foram utilizados como critério de inclusão crianças saudáveis sem histórico de doença específica e sem febre, com idades entre 6 e 24 meses. Além disso, a mãe ou cuidador principal da criança deveria estar presente e ter custódia legal sob a mesma. Os critérios de exclusão utilizados foram crianças que necessitaram de hospitalização prolongada ou tiveram graves problemas de saúde, tais como vírus da imunodeficiência humana (HIV), tuberculose, doença neonatal, doença renal, insuficiência cardíaca crônica, doença hepática, fibrose cística, condições congênitas ou enteropatia (por exemplo, doença de Crohn, doença celíaca, colite ulcerativa ou doença de má absorção) diagnosticada por um médico, e por fim, a criança ter um dos pais ou cuidador primário com deficiências cognitivas ou com menos de 16 anos de idade (LIMA et al., 2014).

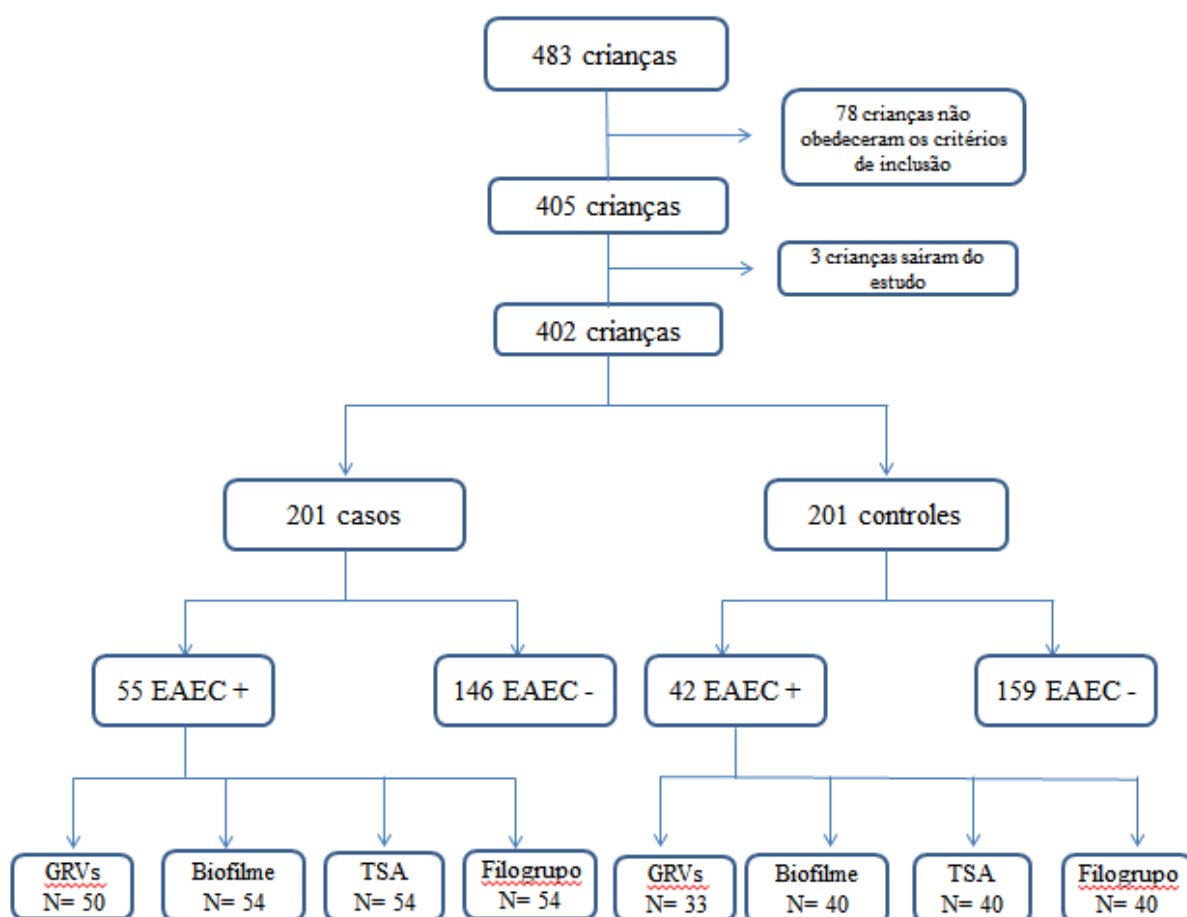
Preenchido os critérios de entrada no estudo, o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (**Anexo A**) foi assinado pelos pais ou responsáveis da criança e obtido pelo agente de saúde (LIMA et al., 2014).



O estudo MAL-ED obteve aprovação no Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP nº232/10), descrito no anexo **Anexo B** e no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (COMEPE nº 246/09), descrito em **Anexo C**.

Este estudo utilizou um denominador de 97 crianças já analisadas quanto à positividade em infecções por EAEC, tendo como diagnóstico a presença de ambos os genes *aaiC* e *aatA*, sendo denominados 55 casos e 42 controles. Os dados referentes ao diagnóstico molecular, genes relacionados à virulência, infecções por co-patógenos e detecção de marcadores imunoinflamatórios estavam armazenados em banco de dados para posterior análise. Para as análises de genes relacionados à virulência, 83 amostras foram verificadas e para as análises de teste de sensibilidade antimicrobiana, formação de biofilme e filogrupos genéticos, foram analisadas 94 amostras, pois três das 97 amostras possuíam alíquota insuficiente (**Figura 4**).

**Figura 4** Fluxograma do estudo.



Fonte: Adaptado de Lima et al., 2018.

GRVs-Genes relacionados à virulência; TSA- Teste de sensibilidade antimicrobiana

#### 4.2. Obtenção de dados e Coleta das amostras



Após a assinatura do TCLE, as informações sobre manifestações clínicas (vômito, febre, diarreia), dados populacionais (sexo, idade, alimentação, nível educacional materno, saneamento básico) e medidas antropométricas (peso, altura, circunferência da cabeça) foram coletadas a partir do formulário padronizado (**Anexo D**) respondido pelos pais ou responsáveis pela criança.

Depois do preenchimento da ficha de dados, o agente de saúde coletou sangue para análise de biomarcadores de inflamação sistêmica através do soro e um *swab* com fezes em um meio de transporte Cary-blair das crianças do estudo em dois momentos distintos, a primeira coleta de fezes foi realizada no momento da entrada da criança no estudo e a segunda coleta foi realizada três meses depois. As amostras foram transportadas ao Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI), da UPC/IBIMED, da Faculdade de Medicina, da UFC.

#### **4.3. Isolamento das cepas bacterianas de *E. coli* em fezes**

Após o recebimento das amostras de fezes no laboratório, foi realizado o semeio das amostras fecais em 3 meios de cultura: o ágar MacConkey, para o crescimento de patógenos gram negativos, principalmente *E. coli*, o ágar XLD utilizado principalmente para o crescimento de colônias de *Shigella* spp. e *Salmonella* spp. e o ágar TCBS para o crescimento de *Vibrio* spp. e *Aeromonas* spp., sendo as placas mantidas na estufa a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 18-24 horas. Após o crescimento das colônias bacterianas no ágar MacConkey, realizou-se análise morfológica de cinco colônias características de *E. coli*. Estas colônias foram isoladas em ágar triptona de soja (TSA) e mantidas na estufa a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 18-24 horas. Após esse tempo, as colônias foram submetidas ao teste de indol (BD DMACA Indole, Fisher Scientific), obedecendo ao manual do fabricante. Cinco colônias sugestivas de *E. coli* (teste de indol positivo) foram armazenadas isoladamente em meio caldo de triptona de soja (TSB) acrescido de 15% de glicerol, sendo estes mantidos em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para testes posteriores. Um *pool* das cinco colônias foi submetido à extração do DNA bacteriano, conforme descrito a seguir (HOUPT et al. 2014).

#### **4.4. Extração do DNA bacteriano de *E. coli***

A extração do DNA bacteriano foi realizada a partir do *pool* das cinco colônias pelo método de ebulição, de acordo com Boisen et al. (2012). As colônias foram dissolvidas em 1 mL de água deionizada do tipo *MilliQ* (Millipore – Billerica, MA, USA) autoclavada acrescida de 5  $\mu\text{L}$  de Triton X-100. Após agitação por 5 segundos, a solução foi submetida à



fervura durante 20 minutos. Em seguida, realizou-se centrifugação (10000 rpm por 10 minutos) e o sobrenadante foi armazenado a -20°C até sua utilização na PCR como DNA molde para realização de diagnóstico molecular e detecção dos genes relacionados a virulência.

#### 4.5. Quantificação/Qualidade do DNA extraído

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

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

#### 4.6. Diagnóstico molecular de *E. coli*

Para o diagnóstico molecular de EAEC, foi realizado um PCR múltiplo através do pool de DNA para a detecção simultânea dos seguintes patógenos: EAEC, EPEC, ETEC, EIEC e EHEC, através dos seguintes genes alvo: *aaIC* (ilha de ativação de *aggR*) e *aatA* (transportador de proteína de anti-agregação) para EAEC (**Tabela 2**); *eae* (intimina de aderência) *ebfA* (gene estrutural de formação de pilus) para EPEC; LT (toxina termolábil) e ST (toxina termoestável) para ETEC; *ipaH* (antígeno do plasmídeo de invasão) para EIEC *eae*, *sxt1* (toxina shiga 1) e *sxt2* (toxina shiga 2) para EHEC (HOUP et al., 2014).

#### 4.7. Pesquisa de co-infecção

Ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) foi utilizado para a detecção de *Campylobacter* spp., Adenovírus, Astrovírus, Rotavírus (ProSpecT, Remel, Lenexa, KS, USA), *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *Entamoeba histolytica* (TechLab, Blacksburg, VA, USA), seguindo as instruções do fabricante (HOUP et al., 2014).



#### 4.8. Detecção dos genes relacionados à virulência

As amostras detectadas como EAEC positivas foram analisadas por reações de PCR multiplex para a detecção de 20 genes relacionados à virulência, conforme a **Tabela 2**. As reações de PCR incluíram cinco painéis, utilizados em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (LIMA et al., 2013). Isolados de EAEC cepas 042, JM221, 239-1, H223-1, 55989 foram utilizados como controles positivos (**Tabela 3**), enquanto que água *MilliQ* autoclavada serviu como controle negativo. Cada reação foi padronizada com o uso de controles positivos para determinar as condições de PCR mais eficientes, de forma a reduzir a existência de bandas inespecíficas e facilitar a interpretação dos resultados. Tais condições incluíram a melhor temperatura de anelamento ( $T_a$ ), o número de ciclos e a concentração dos iniciadores. As condições das reações dos PCR multiplexes incluíram um passo inicial de 15 min a 95°C; 35 ciclos a 95°C por 45s de desnaturação, anelamento a 57°C por 45 s e extensão a 72 °C por 1,25min; além de uma extensão final de 10 min a 72°C. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% e corados com brometo de etídio para visualização em transiluminador ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) (HAVT et al., 2017).



**Tabela 2** Descrição dos genes de diagnóstico e dos genes relacionados à virulência utilizados no estudo.

Genes de Diagnóstico	Acesso ao GenBank	Tipo de PCR	Sequência dos primers (5'-3')	Tamanho dos pares de bases (pb)
<i>aaiC</i> - ilha de ativação <i>deaggR</i>	PN554766.1	MALED Multiplex	ATTGTCCTCAGGCATTTCAC ACGACACCCCTGATAAACAA	215
<i>aatA</i> -transportador de proteína anti-agregação	AY351860		CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	630
Genes Relacionados à Virulência				
<i>astA</i> - toxina A termoestável	L11241	Multiplex 1	ATGCCATCAACACAGTATAT GCGAGTGACGGCTTTGTAGT	110
<i>pet</i> -toxina codificada por plasmídeo	AF056581		GGCACAGAATAAAGGGGTGTTT CCTCTTGTTTCCACGACATAC	302
<i>sigA</i> - homólogo de protease tipo IgA de <i>Shigella</i>	NC_004337		CCGACTTCTCACTTTCTCCCG CCATCCAGCTGCATAGTGTTTG	430
<i>pic</i> - proteína envolvida na colonização	AF097644		ACTGGATCTTAAGGCTCAGGAT GACTTAATGTCACTGTTTCAGCG	572
<i>sat</i> - toxina autotransportadorasecreta	AE014075		TCAGAAGCTCAGCGAATCATTG CCATTATCACCAGTAAAACGCACC	932



da				
<i>orf3</i> -proteína com função desconhecida	FN554767.1	Multiplex 2	CAGCAACCATCGCATTTCTA CGCATCTTTCAATACCTCCA	121
<i>aap</i> – proteína anti-agregação	Z32523		GGACCCGTCCCAATGTATAA CCATTTCGGTTAGAGCACGAT	250
<i>agg3A</i> - subunidade da fímbria AAF/III	AF411067		CCAGTTATTACAGGGTAACAAGGGAA TTGGTCTGGAATAACAACCTGAACG	370
<i>sepA</i> –protease extracelular de <i>Shigella</i>	Z48219		GCAGTGGAAATATGATGCGGC TTGTTTCAGATCGGAGAAGAACG	794
<i>eilA</i> - homólogo HilA de <i>Salmonella</i>	FN554766.1	Multiplex 3	AGGTCTGGAGCGCGAGTGTT GTAAAACGGTATCCACGACC	130
<i>aafA</i> - subunidade da fímbria AAF/II	AF012835		CTACTTTATTATCAAGTGGAGCCGCTA GGAGAGGCCAGAGTGAATCCT	289
<i>agg3/4C*</i> - <i>Usher</i> , unidade de montagem da AAF/III-IV	AF411067, AB255435, EU637023		TTCTCAGTTAACTGGACACGCAAT TTAATTGGTTACGCAATCGCAA	409
<i>aafC</i> - <i>Usher</i> , unidade de montagem da AAF/II	AF114828		ACAGCCTGCGGTCAAAAGC GCTTACGGGTACGAGTTTACGG	491
<i>aar</i> - regulador negativo de <i>aggR</i>	FN554767.1		AGCTCTGGAAACTGGCCTCT AACCGTCCTGATTTCTGCTT	108



<i>aggA</i> –subunidade da AAF/I	Y18149, AY344586	Multiplex 4	TCTATCTRGGGGGGCTAACGCT ACCTGTTCCCCATAACCAGACC	220
<i>capU</i> – homólogo da hexosiltransferase	AF134403		CAGGCTGTTGCTCAAATGAA GTTTCGACATCCTTCCTGCTC	395
<i>air</i> - Proteína de repetição de imunoglobulina enteroagregativa	FN554766.1		TTATCCTGGTCTGTCTCAAT GGTTAAATCGCTGGTTTCTT	600
<i>agg4A</i> – subunidade da AAF/IV	EU637023	Multiplex 5	TGAGTTGTGGGGCTAYCTGGA CACCATAAGCCGCCAAATAAGC	169
<i>shiA</i> – supressor de inflamação tipo shiA	ECB_03517		CAGAATGCCCCGCGTAAGGC CACTGAAGGCTCGCTCATGATCGCCG	292
<i>aggR</i> – ativador transcricional	Z18751		GCAATCAGATTAARCAGCGATACA CATTCTTGATTGCATAAGGATCTGG	426

\*Para este gene foram utilizados dois primers sensores e um primer anti-senso

**Fonte:** adaptado de Havt et al., 2017



**Tabela 3** Controles positivos e seus respectivos genes de virulência utilizados no estudo.

Controles positivos	Genes de virulência relacionados
EAEC 042	<i>astA, pet, pic, aap, orf3, eilA, aafC, aafA, aggR, shiA, aar, air, capU</i>
EAEC JM221	<i>sigAaggA,</i>
EAEC 239-1	<i>sat</i>
EAEC H223-1	<i>sepA, agg4A</i>
EAEC 55989	<i>agg3A, agg3/4C</i>

Fonte: adaptado Havt et al., 2017.

#### 4.9. Triagem das cepas bacterianas de EAEC

Através da positividade para EAEC do *pool* de DNA bacteriano, as cinco cepas isoladas de *E. coli* de cada criança, mantidos em freezer a - 80°C em um tubo contendo meio TSB com glicerol foram descongeladas através de cultivo em meio ágar sangue. As placas foram mantidas a 37°C ± 2°C por 18-24 h. Foi realizada extração do DNA das colônias isoladas pelo método de ebulição para diagnóstico por PCR convencional tendo como genes alvo *aaiC* e *aatA* para triagem de cepas positivas para EAEC (BOISEN et al., 2012).

#### 4.10. Detecção de filogrupos

Para detecção dos filogrupos A, B1, B2 e D, reações em cadeia da polimerase foram aplicadas utilizando os primers descritos na **Tabela 4**, com a enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega Corporation, Madison, WI). As condições das reações do PCR incluíram um passo inicial de desnaturação por 5 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de 30 s a 95°C de desnaturação, anelamento de 30 s a 59°C e extensão de 45 s a 72°C, além de uma extensão final de 7 min a 72°C. Os produtos de PCR foram visualizados e fotografados em transiluminador ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) após eletroforese em gel de agarose a 2% e marcação com o brometo de



etídio (CLERMONT et al., 2000). Para a identificação dos grupos filogenéticos foi utilizado o esquema descrito na **Tabela 5**.

Cada reação foi padronizada com o uso de controles positivos para determinar as condições de PCR mais eficientes, de forma a reduzir a existência de bandas inespecíficas e facilitar a interpretação dos resultados. Tais condições incluíram a melhor temperatura de anelamento (Ta), o número de ciclos e a concentração dos iniciadores.

**Tabela 4** Descrição dos iniciadores utilizados no estudo para detecção dos filogrupos.

Genes alvo	Sequência dos iniciadores (5' – 3')	Acesso ao Genbank, NCBI	Tamanho dos pares de bases (pb)	Referência
<i>chuA</i> (Receptor de hemoglobina em EHEC O157:H7)	S: GACGAACCAACGGTCAGGAT AS: TGCCGCCAGTACC AAAGACA	U67920.1	279	Clermont et al. 2000
<i>yjaA</i> (Função desconhecida)	S: TGAAGTGTCAGGAGACGCTG AS: ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	KU749306.1	211	Clermont et al. 2000
<i>TspE4C2</i> (Fragmento de DNA)	S: GAGTAATGTCTGGGGCATTCA AS: CGCGCCAACAAAGTATTACG	EU240725.1	152	Clermont et al. 2000

**Tabela 5** Esquema para a identificação dos grupos filogenéticos.

Grupos Filogenéticos	<i>chuA</i>	<i>YjaA</i>	<i>TspE4.2C</i>
A	-	+ ou -	-
B1	-	-	+
B2	+	+ou-	+ou-
D	+	-	+ou-

Cepas pertencentes ao filogrupo A não possuem o gene *chuA* e nem o fragmento *TspE4.2C* e a presença do *yjaA* não interfere na identificação, já as cepas pertencentes ao filogrupo B1 possuem apenas o fragmento *TspE4.2C*, as cepas que pertencem ao filogrupo B2 possuem o gene *chuA* e a presença dos genes *yjaA* e *TspE4.2C* não interfere na identificação. Por fim, cepas pertencentes ao filogrupo D possuem o gene *chuA* e não possuem o gene *yjaA*, a presença do fragmento *TspE4.2C* não interfere na identificação (CLERMONT et al., 2000).

#### 4.11. Formação de biofilme

Para analisar a formação de biofilme das cepas, a metodologia foi seguida de acordo com Bandeira et al. (2013). Primeiramente, as amostras foram semeadas em



ágar sangue e mantidas em estufa bacteriológica a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 18-24 horas. Após isso, para a preparação do inoculo bacteriano, transferiu-se uma colônia para um tubo contendo 1 mL de solução salina estéril até atingir a turbidez da escala de McFarland de 0,5 que corresponde a  $1,5 \times 10^8$  UFC por mL. Em seguida, em uma placa de poliestireno de 96 poços de fundo chato, foram adicionados 175  $\mu\text{L}$  de caldo de infusão de cérebro-coração (BHI) enriquecido com 1% de glicose em cada poço e, posteriormente, mais 25  $\mu\text{L}$  do inoculo bacteriano para completar 200  $\mu\text{L}$  por poço. A placa foi incubada em estufa bacteriológica a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 horas.

Após o tempo de incubação, desprezou-se o sobrenadante e a placa foi lavada duas vezes com tampão fosfato salino (PBS 1x). Após a secagem em temperatura ambiente, acrescentou-se 200  $\mu\text{L}$  de metanol PA nos poços e a placa foi mantida em temperatura ambiente por 15 min. Passado esse tempo, o metanol foi desprezado e a placa foi deixada para secar em temperatura ambiente. Em seguida, acrescentaram-se 200  $\mu\text{L}$  de cristal violeta 0,3% nos poços por 10 min. Passados os 10 min com o cristal violeta, a placa foi lavada 3 vezes com PBS 1x e, em seguida, acrescentou-se 200  $\mu\text{L}$  de ácido acético 33% por 10 min. A suspensão de ácido acético foi transferida para uma nova placa de poliestireno de 96 poços, para posterior leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 490 nm. Após a leitura a biomassa do biofilme foi calculada através das fórmulas discriminadas na **Tabela 6**, onde para o cálculo do fraco formador usou-se a média do branco (poços que continham apenas o meio de cultura) mais três vezes o desvio padrão dessa média. Contudo, o cálculo do moderado formador calculou-se duas vezes o valor do fraco formador e para o cálculo do forte formador calculou-se quatro vezes o valor do fraco formador (STEPANOVIC et al., 2000). O experimento foi realizado em triplicata em dois momentos distintos.

**Tabela 6** Fórmula para calcular a biomassa de biofilme.

<b>Cálculo da biomassa de biofilme</b>
Fraco formador = média do branco + (3 x Desvio Padrão)
Moderado formador = 2 x Fraco formador
Forte formador = 4x Fraco formador
Adaptado de Stepanovic et al., 2000.



#### 4.12. Teste de sensibilidade antimicrobiana

Testes de sensibilidade aos antimicrobianos foram realizados pela técnica de difusão em disco de Kirby& Bauer, de acordo com o manual do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017). A preparação do inóculo foi realizada transferindo colônias para um TSB e armazenadas em estufa a 37°C por aproximadamente uma hora até obtenção da formação de uma suspensão bacteriana com turbidez de uma solução maior do que a escala de McFarland de 0,5. O inóculo bacteriano foi transferido para uma solução salina estéril até atingir a turbidez da escala de McFarland de 0,5, sendo semeada em placa de ágar Mueller-Hinton com swab estéril. Após 10 min, os discos de antimicrobianos foram postos na superfície das placas inoculadas, sendo estas incubadas a 37°C por 16-18 horas.

A medição dos diâmetros dos halos de inibição foi realizada e comparada com os pontos de corte especificados na **Tabela 7**, tendo como referência as normas do CLSI (2017), classificando a cepa bacteriana como sensível, intermediário ou resistente a cada antimicrobiano específico. Foram empregados 11 discos antimicrobianos (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA) e uma fita E-test disponíveis comercialmente (BioMérieux AS, Marcy l'Etoile, France). Os seguintes agentes foram testados: ceftriaxona, aztreonam, ceftazidima, ceftazidima/ácido clavulânico, cefoxitina, ertapenem, ciprofloxacina, sulfametoxazol/trimetoprima, ampicilina, ampicilina/sulbactam, gentamicina e azitromicina (Etest®). As cepas de *E. coli* ATCC 25922 e 35218, cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ), foram utilizadas como controle de qualidade dos antimicrobianos ao longo do estudo. Os isolados multirresistentes foram definidos como aqueles resistentes a pelo menos um agente de três ou mais classes simultaneamente (ANVISA, 2015). Cepas com resistência intermediária foram classificadas como sendo resistente ao fármaco (MEDEIROS et al., 2018).



**Tabela 7** Determinação do perfil de sensibilidade da *E. coli* por meio de difusão em ágar baseados no CLSI(2017).

Antimicrobiano (µg)	Pontos de corte		
	Sensível	Intermediário	Resistente
<b>Cefalosporinas</b>			
Ceftriaxona (30µg)	$\geq 23$	20-22	$\leq 19$
Cefoxitina (30 µg)	$\geq 18$	15-17	$\leq 14$
Ceftazidima (30µg)	$\geq 21$	18-20	$\leq 17$
Ceftazidima/ácido clavulânico (30µg/10 µg)	-	-	-
<b>Monobactâmico</b>			
Aztreonam (30µg)	$\geq 21$	18-20	$\leq 17$
<b>Carbapenêmicos</b>			
Ertapenem (10µg)	$\geq 22$	19-21	$\leq 18$
<b>Quinolonas</b>			
Ciprofloxacina (5µg)	$\geq 21$	16-20	$\leq 15$
<b>Sulfonamidas</b>			
Trimetoprima/ Sulfametoxazol (1,25 µg /23,75 µg)	$\geq 16$	11-15	$\leq 10$
<b>Penicilinas</b>			
Ampicilina (10µg)	$\geq 17$	14-16	$\leq 13$
Ampicilina/sulbactam (10µg/10µg)	$\geq 15$	12-14	$\leq 11$
<b>Aminoglicosídeos</b>			
Gentamicina (10µg)	$\geq 15$	13-14	$\leq 12$
<b>Macrolídeos</b>			
Azitromicina (Etest) (0.016-256 µg/mL)	$\leq 16$	-	$\geq 32$

Fonte: CLSI, 2017.



#### 4.13. *Screening* teste confirmatório para detecção de betalactamases de espectro estendido (ESBL)

Para a detecção de ESBL foi realizado o teste fenotípico utilizando a metodologia preconizada pelo CLSI, realizando-se o teste de triagem por disco-difusão utilizando os antimicrobianos: ceftazidima(30µg), aztreonam (30µg), ceftriaxona (30µg) e o resultado foi interpretado através da leitura do diâmetro dos halos descrito na **Tabela 8**. O uso de mais de um agente antimicrobiano melhora a sensibilidade de detecção de ESBL.

**Tabela 8** Pontos de corte do diâmetro do halo formado pelos antimicrobianos utilizados para triagem de ESBL no estudo baseados no CLSI (2017).

Antimicrobiano	Diâmetro do halo
ceftazidima(30µg)	$\leq 22$ mm
ceftriaxona (30µg)	$\leq 25$ mm
aztreonam (30µg)	$\leq 27$ mm

Fonte: CLSI, 2017.

Para a confirmação do teste fenotípico usamos o disco de ceftazidima(30µg) e ceftazidima/ácido clavulânico (30µg/10 µg) Esse teste baseia-se na inibição da atividade da enzima na presença do ácido clavulânico. Se houver um aumento de  $\geq 5$  mm no diâmetro da zona do disco de ceftazidima/ácido clavulânico versus o diâmetro da zona do disco de ceftazidima testado isoladamente, a cepa é produtora de ESBL. A cepa de *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle para o teste de triagem e confirmatório.

#### 4.14. Detecção de biomarcadores de inflamação

Os dados de biomarcadores utilizados nesse estudo foram retirados de um banco de dados já existente referente ao projeto MAL-ED. Para a detecção dos biomarcadores foram selecionados para a análise de inflamação os resultados de alfa-1-antitripsina, mieloperoxidase, neopterin e gene de regeneração 1β (REG1B) que foram medidos em amostras fecais para amiloide sérica A (SAA), proteína intestinal de



ligação de ácidos graxos - I-FABP, proteína de ligação lipopolissacarídica LBP, forma solúvel de CD14 - sCD14, calprotectina, IgA anti-LPS e IgG anti-LPS que foram medidos em amostras de soro por ELISA. Os kits para substâncias do soro foram adquiridos da Hycult Biotech (Uden, Holanda), enquanto os kits de lactoferrina, alfa-1-antitripsina, mieloperoxidase, neopterina e REG1B foram adquiridos da TechLab (Blacksburg, Estados Unidos), Immuchrom (Heppenheim, Alemanha), Immundiagnostik (Bensheim, Alemanha), Genway Biotech (San Diego, Estados Unidos) e TechLab (Blacksburg, Estados Unidos), respectivamente. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante (LIMA et al., 2018).

Resumidamente, as amostras diluídas foram adicionadas a poços de microtitulação revestidos com anticorpos específicos, seguido de incubação com um conjugado de peroxidase. A adição do substrato promoveu reações colorimétricas que foram terminadas por uma solução de parada ácida e lidas a 450 nm em espectrofotômetro. As amostras de soro para SAA, I-FABP, LBP, sCD14 e calprotectina foram diluídas 50x, 100x, 1000x, 80x, 500x, respectivamente, seguindo as recomendações do fabricante. Amostras de fezes para alfa-1-antitripsina, mieloperoxidase, neopterina e reg1B foram diluídos 500x, 10x, 100x e 10000x, respectivamente. As curvas padrão fornecidas pelo kit foram utilizadas para quantificação dos analitos (LIMA et al., 2018).

#### **4.15. Análise estatística**

O Estudo de Caso-Controle MAL-ED foi parte de um estudo multicêntrico, longitudinal, caso-controle, utilizando um protocolo padronizado e ferramentas de coleta de dados (LIMA et al., 2014; MAL-ED, 2014).

Os protocolos internos de treinamento, controle e garantia de qualidade permitiram que este estudo mantivesse um banco de dados de qualidade para análise. Os dados foram digitados duas vezes usando o software Microsoft Access (Microsoft Corporation, Redmond, Washington) e validados por correspondência cruzada dos dois bancos de dados.

Os resultados numéricos obtidos após a aplicação dos diversos protocolos experimentais foram plotados em planilhas de Excel 2010 (Microsoft Corporation).



Posteriormente, estes dados foram transferidos para o software *GraphPad Prism* versão 5.00 para Windows (San Diego, CA).

A análise de normalidade foi através dos testes de Komogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, selecionados de acordo com o número de amostras. Considerando um valor de  $P > 0.1$ , as amostras são classificadas em normais para a curva de Gauss. Assim, utilizaram-se testes paramétricos entre variáveis normais e não paramétricos para variáveis onde  $P < 0.1$ . Para duas variáveis que foram alocadas fora da curva gaussiana, foi aplicado teste não paramétrico Mann Whitney, com os dados expressos em mediana. Para comparar a proporção de ocorrência de uma variável entre os grupos, análise bivariada foi conduzida pelo teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher.

Para os testes de regressão logística multivariada foi utilizado o programa CART (Árvore de classificação e regressão - Classification and Regression Tree) (Salford Systems). O nível de significância estatística foi fixado em um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização da população e prevalência de EAEC do estudo

Durante o período deste estudo, 402 crianças na faixa etária entre seis e 24 meses foram analisadas, desses 50% (201/402) eram crianças nutridas e 50% (201/402) eram crianças desnutridas.

Entre a população total do estudo, 24,1% (97/402) crianças foram positivas para infecção por EAEC. Destas, 56,7% (55/97) foram definidos como casos e 43,3% (42/97) foram definidos como controles (**Tabela 9**). Não houve associação estatística entre infecções por EAEC e as crianças casos ( $P = 0,1617$ ; OR 1.426; IC 95% 0.90 - 2.26).

Do total de amostras positivas para EAEC, houve uma maior prevalência do patógeno em crianças do sexo feminino 53,6% (52/97). Em relação à idade dessas crianças, 50,5% (49/97) apresentavam idades entre seis e 12 meses. Já as crianças com idades entre 13 e 24 meses representaram 49,5% (48/97) (**Tabela 9**). Em relação aos dados coletados sobre amamentação no momento da entrada da criança no estudo, 57,7% (56/97) das crianças analisadas ainda estavam no período de amamentação.

**Tabela 9** Descrição dos parâmetros analisados sobre a caracterização da população estudada.

<b>Parâmetros analisados</b>	<b>Total N (%)</b>	<b>Caso N (%)</b>	<b>Controle N (%)</b>
Infecções por EAEC	97 (24.1%)	55 (56.7%)	42 (43.3%)
<b>Sexo</b>			
Masculino	45 (46.4%)	28 (62.2%)	17 (37.8%)
Feminino	52 (53.6%)	27 (51.9%)	25 (48.1%)
<b>Idade</b>			
6-12 meses	49 (50.5%)	22 (44.9%)	27 (55.1%)
13-24 meses	48 (49.5%)	33 (68.7%)	15 (31.3%)

De acordo com as respostas dos pais ao questionário sobre o surgimento de alguma doença e os seus sintomas (febre, diarreia, vômito, tosse), 46,4% (45/97) das respostas apresentadas no formulário relataram a presença de doença e algum sintoma. Desses, 45,5% (25/55) pertenciam ao grupo dos casos e 47,6% (20/42) ao grupo dos controles. A respeito dos sintomas descritos, a tosse foi o mais relatado com 86,7% (39/45) casos, seguido por febre nas últimas duas semanas com 64,4% (29/45), diarreia com 37,8% (17/45), vômito com 33,3% (15/45) e 6,6% (3/45) crianças estavam tendo febre no dia da aplicação do questionário (**Tabela 10**).



**Tabela 10** Descrição dos parâmetros avaliados sobre a presença de doença.

Parâmetro	Total	Caso	Controle
Doença	45 (46,4%)	25 (45,5%)	20 (47,6%)
Febre nas últimas duas semanas	29 (64,4%)	16 (35,6%)	13 (28,9%)
Febre atual	3 (6,6%)	3 (6,6%)	0 (0%)
Diarreia	17 (37,8%)	9 (20%)	8 (17,8%)
Vômito	15 (33,3%)	10 (22,2%)	5 (11,1%)
Tosse	39 (86,7%)	21 (46,7%)	18 (40%)

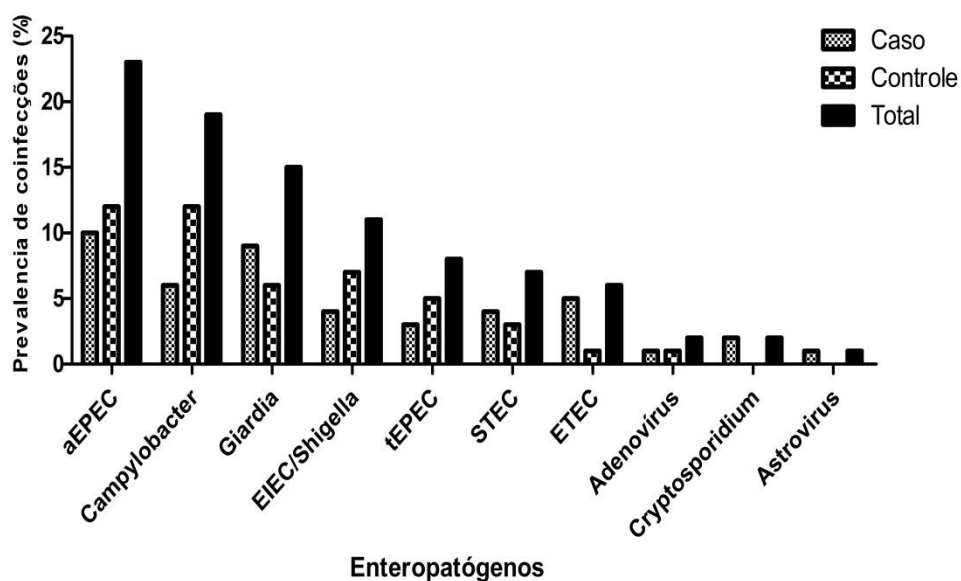
## 5.2. Análise de Coinfecções

Foi analisada a pesquisa para detecção de EPEC típica e atípica, STEC, ETEC, EIEC/*Shigella*, *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., Adenovírus, Astrovírus e Rotavírus. Na população estudada apenas o patógeno Rotavírus não estava causando coinfecção com a EAEC.

Do total da população estudada, uma taxa de 56,7% (55/97) de amostras apresentaram coinfecção por algum patógeno. Os patógenos mais prevalentes encontrados foram EPEC atípica (23,7%), seguida por *Campylobacter* spp. (19,6%) e por fim *Giardia* spp. (15,7%). No grupo dos casos os patógenos mais prevalentes foram EPEC atípica (10%), seguida por *Giardia* spp. (9%), ETEC (5%) e STEC (4%). Nos controles, a maior prevalência foi de coinfecções por EPEC atípica e *Campylobacter* spp. ambas com uma taxa de 12%, seguida de EIEC/*Shigella* (7%) (**Figura 5**). Não houve associação estatística em relação aos grupos estudados.



**Figura 5** Prevalência de coinfeção em crianças com EAEC nos grupos caso e controle.



aEPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica atípica; tEPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica típica; STEC: *Escherichia coli* produtora de toxina shiga; ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica

### 5.3. Detecção dos genes relacionados à virulência de EAEC

Para a detecção dos genes de virulência apenas 85,6%(83/97) das cepas foram testadas, 14 amostras não possuíam alíquotas suficientes para a detecção dos genes relacionados à virulência. Destas 90,9%(50/55) pertenciam ao grupo caso e 78,6% (33/97) pertenciam ao grupo controle. As prevalências dos 20 genes relacionados à virulência testados para EAEC, nos grupos casos e controles, apresentaram-se de forma heterogênea. A **Tabela 11** mostra a distribuição do percentual dos genes *astA*, *pet*, *sigA*, *pic*, *sat*, *orf3*, *aap*, *agg3A*, *sepA*, *eilA*, *aggA*, *aafA*, *agg3/4C*, *aafC*, *aar*, *agg4A*, *capU*, *air*, *shiA* e *aggR*, entre as amostras positivas para EAEC dos grupos caso e controle. Dentre as amostras do grupo caso, os genes de maior prevalência foram: *aap*, *agg3/4C*, *orf3* e *capU* com percentuais de 84% (42/50), 82% (41/50), 82% (41/50) e 78% (39/50), respectivamente. Não houve significância estatística entre os genes pesquisados e as crianças caso.

Entre as amostras controle os genes de maior prevalência foram: *aggR*, *agg3/4C*, *aar* e *pic* com prevalência de 84,8% (28/33), 81,8% (27/33), 78,7% (26/33) e 75,5% (25/33), respectivamente. Não houve associação estatística entre quaisquer genes de virulência e o grupo controle.



**Tabela 11** Percentual de positividade dos genes relacionados à virulência isolados entre amostras positivas para EAEC dos grupos caso e controle.

<b>Genes de virulência de EAEC</b>	<b>Total N=83(%)</b>	<b>Caso N=50(%)</b>	<b>Controle N=33(%)</b>	<b>P valor</b>	<b>OR</b>	<b>95% IC</b>
<i>orf3</i>	68 (81,9%)	41 (82%)	27 (51,5%)	1,0000	1,01	0,32 – 3,17
<i>agg3/4C</i>	68 (81,9%)	41 (82%)	27 (81,8%)	1,0000	1,01	0,32 – 3,17
<i>aggR</i>	66 (79,5%)	38 (76%)	28 (84,8%)	0,4109	0,56	0,17 – 1,79
<i>aap</i>	65 (78,3%)	42 (84%)	23 (69,7%)	0,1736	2,28	0,79 – 6,58
<i>pic</i>	62 (74,7%)	37 (74%)	25 (75,5%)	1,0000	0,91	0,32 – 2,51
<i>capU</i>	62 (74,7%)	39 (78%)	23 (69,7%)	0,4452	1,54	0,56 – 4,18
<i>eilA</i>	59 (71%)	36 (72%)	23 (69,7%)	1,0000	1,11	0,42 – 2,93
<i>aar</i>	56 (67,4%)	30 (60%)	26 (78,7%)	0,0955	0,40	0,14 – 1,10
<i>astA</i>	51 (61,5%)	32 (64%)	19 (57,6%)	0,6467	1,3	0,53 – 3,22
<i>shiA</i>	51 (61,4%)	32 (64%)	19 (57,5%)	0,6467	1,31	0,53 – 3,22
<i>sat</i>	45 (54,2%)	27 (54%)	18 (54,5%)	1,0000	0,97	0,40 – 2,36
<i>aggA</i>	33 (39,7%)	18 (36%)	15 (45,5%)	0,4926	0,67	0,27 – 1,65
<i>sepA</i>	33 (39,7%)	20 (40%)	13 (39,4%)	1,0000	1,02	0,41 – 2,52
<i>air</i>	31 (37,3%)	18 (36%)	13 (39,4%)	0,8186	0,86	0,34 – 2,14
<i>pet</i>	26 (31,3%)	19 (38%)	7 (21,2%)	0,1475	2,2	0,82 – 6,26
<i>agg4A</i>	25 (30,1%)	13 (26%)	12 (36,3%)	0,3379	0,61	0,23 – 1,59
<i>sigA</i>	25 (30,1%)	15 (30%)	10 (30,3%)	1,0000	0,98	0,37 – 2,56
<i>aafA</i>	24 (28,9%)	15 (30%)	9 (27,3%)	1,0000	1,14	0,43 – 3,03
<i>aafC</i>	13 (15,6%)	11 (22%)	2 (6%)	0,0662	4,37	0,90 – 21,21
<i>agg3A</i>	5 (6%)	3 (6%)	2 (6%)	1,0000	0,98	0,15 – 6,26

EAEC= *Escherichia coli* enteroagregativa; OD= *Oddsratio*; IC= Intervalo de confiança.



#### 5.4. Detecção dos Filogrupos de EAEC

Dentre as 94 cepas utilizadas foram detectada a presença de três filogrupos (A, B2 e D). O filogrupo B2 foi o de maior prevalência, seguido pelo filogrupo D e, por fim, o filogrupo A, com percentuais de 54,2% (51/94), 38,3% (36/94) e 7,4% (7/94), respectivamente. Não houve associação estatística entre os filogrupos pesquisados e os grupos estudados.

**Tabela 12** Distribuição dos grupos filogenéticos entre as cepas de EAEC isoladas de crianças casos e controle.

Grupo filogenético	Total N=94 (%)	Caso N=54(%)	Controle N=40(%)	P valor	OR	95% IC
A	7 (7,4%)	4 (7,4%)	3 (7,5%)	1,000	0,98	0,20 – 4,67
B1	-	-	-	-	-	-
B2	51 (54,2%)	31 (57,4%)	20 (50%)	0,533	1,34	0,59 – 3,06
D	36 (38,3%)	19 (35,1%)	17(42,5%)	0,523	0,73	0,31 – 1,70

OR= *Odds ratio*; IC= Intervalo de confiança

Para a correlação entre os genes de virulência pesquisados e os filogrupos detectados, 86,2% (81/94) das cepas foram analisadas, havendo associação estatística da presença do gene *pet* com o filogrupo A ( $P=0,0218$ ; OR 7,23; IC 95% 1,29 – 40,46), e da ausência do gene *pet* e *sepA* ao filogrupo B2 ( $P=0,0030$ ; OR 0,20; IC 95% 0,07 – 0,58), ( $P=0,0218$ ; OR 0,32; IC 95% 0,12 – 0,82), respectivamente.

#### 5.5. Formação de Biofilme de EAEC

Na detecção da biomassa de biofilme produzido pela EAEC, 78,7% (74/94) destas formaram biofilme. O grupo caso obteve maior formação de biofilme em relação ao grupo controle (45,7% vs 32,9%), embora não houve associação estatística ao grupo caso ( $P=0,8048$ ; OR 1,13; IC 95% 0,41 – 3,06). Em relação à quantificação do biofilme, 51 cepas foram classificadas como fracas formadoras de biofilme e 23 cepas foram classificadas como moderada e forte formadoras de biofilme, com percentuais de 68,9% (51/74) e 31,1% (23/74), respectivamente.

Em relação à correlação da formação do biofilme com os genes de virulência detectados, 81 cepas foram analisadas. Como não foi observado associação de formação do biofilme em relação aos grupos caso e controle do estudo, as seguintes análises foram realizadas de acordo com a presença e ausência de formação de biofilme,



no qual, para as análises de regressão logística foi correlacionado com os genes relacionados à virulência agrupados por grupos de função.

A presença dos genes *aggR*, *orf3* e *agg3/4C* foram os mais prevalentes na formação do biofilme tendo como percentuais 82,8% (53/64), 81,2% (52/64) e 82% (51/64), respectivamente. Os genes *aar* ( $P=0,0466$ ; OR 3,11; IC 95% 1,03 – 9,36) e *pic* ( $P=0,0390$ ; OR 5,81) foram associados à formação do biofilme.

Em contrapartida, os genes mais prevalentes detectados em cepas que não foram capazes de formar biofilme foram *capU*, *agg3/4C*, *eilA*, com percentuais de 100% (17/17), 94,1% (16/17) e 94,1% (16/17), respectivamente. Os genes *pet*, *sepA*, *eilA* e *capU* foram associados com a não formação do biofilme ( $P=0,0213$ ; OR 0,40), ( $P=0,0040$ ; OR 0,17; IC 95% 0,05 – 0,56), ( $P=0,00167$ ; OR 0,11; IC 95% 0,01 – 0,89) e ( $P=0,0042$ ; OR 0,05; IC 95% 0,003 – 1,00), respectivamente (**Tabela 13**).



**Tabela 13** Descrição da correlação entre formação de biofilme e os genes relacionado à virulência por grupo de funções detectado.

Genes de virulência	Total N= 81(%)	Formador de biofilme N=64(%)	Não formador de biofilme N=17(%)	Análise bivariada <sup>a</sup>		Análise multivariada <sup>b</sup>	
				P valor	OR	P valor	OR
<b>Fímbrias</b>							
<i>aggA</i> – subunidade da fímbria AAF/I	31 (38,3%)	26 (40,6%)	5 (29,4%)	0,5756	1,64	0,9261	1,06
<i>aafA</i> –subunidade da fímbria AAF/II	22 (27,2%)	18 (28,1%)	4 (23,5%)	1,0000	1,27	0,7353	1,26
<i>aafC</i> – <i>Usher</i> , unidade estrutural da AAF/II	12 (14,8%)	9 (14,1%)	3 (17,6%)	0,7087	0,76	0,4461	0,52
<i>agg3A</i> –subunidade da fímbria AAF/III	5 (6,2%)	5 (7,8%)	0 (0%)	0,5784	0,98	0,9863	0,32
<i>agg3/4C</i> – <i>Usher</i> , unidade estrutural da AAF/III-IV	67 (82,7%)	51 (82%)	16 (81,8%)	0,2800	0,24	0,2115	0,23
<i>agg4A</i> –subunidade da fímbria AAF/IV	24 (29,6%)	19 (29,7%)	5 (29,4%)	1,0000	1,03	0,9617	1,03
<b>Classe das SPATEs I</b>							
<i>sat</i> –toxina autotransportadora secretada	45 (55,5%)	34 (53,1%)	11 (64,7%)	0,4259	0,61	0,8870	0,90
<i>pet</i> – toxina codificada por plasmídeo	24 (29,6%)	16 (25%)	8 (47,1%)	0,1325	0,37	<b>0,0213</b>	0,40
<i>sigA</i> – protease homóloga da <i>Shigella IgA-like</i>	24 (29,6%)	17 (26,6%)	7 (41,2%)	0,2488	0,51	0,1058	0,33
<b>Classe das SPATEs II</b>							
<i>pic</i> – proteína envolvida em colonização	60 (74,1%)	48 (75%)	12(70,6%)	0,7593	1,25	<b>0,0390</b>	5,81
<i>sepA</i> – protease extracelular da <i>Shigella</i>	31 (38,3%)	19 (29,7%)	12 (70,6%)	<b>0,0040**</b>	0,17	<b>0,0024</b>	0,08
<b>Outros GRVs</b>							
<i>astA</i> – toxina termooestável A da EAEC, EAST1	49 (60,4%)	36 (56,2%)	13 (76,4%)	0,1677	0,39	0,7960	0,81
<i>air</i> – proteína repetida da imunoglobulina enteroagregativa	31 (38,3%)	23 (35,9%)	8 (47,1%)	0,4150	0,63	0,7191	1,30
<i>capU</i> – homóloga àhexosiltransferase	60 (74,1%)	43 (67,2%)	17 (100%)	<b>0,0042**</b>	0,05	0,9687	0,00
<i>eilA</i> –homólogo <i>HilA</i> de Salmonella	57 (70,4%)	41 (64,1%)	16 (94,1%)	<b>0,0167*</b>	0,11	<b>0,0451</b>	0,08
<i>aar</i> –regulador negativo do <i>aggR</i>	55 (67,9%)	47 (73,4%)	8 (47,1%)	<b>0,0466*</b>	3,11	0,2139	2,52
<i>shiA</i> – supressor inflamatório shiA-like	49 (60,5%)	37 (57,8%)	12 (70,6%)	0,4109	0,57	0,9522	1,04
<i>aap</i> – proteína antiagregativa, Dispersina	63 (77,8%)	50 (78,1%)	13 (76,4%)	1,0000	1,09	0,2387	3,45
<i>orf3</i> – codifica proteína críptica	66 (81,5%)	52 (81,2%)	14 (82,4%)	1,0000	0,92	0,2862	0,19
<i>aggR</i> – regulador transcricional	65 (80,2%)	53 (82,8%)	12 (70,6%)	0,3077	2,00	0,4171	2,87

GRVs – Genes relacionados à virulência; OR – *Odds ratio*

a – análise estatística por teste exato de fisher

b – análise estatística por regressão logística por CART análise



### 5.6. Detecção de resistência antimicrobiana entre os isolados de EAEC

O fenótipo de resistência a pelo menos um fármaco foi observado em 63,8% (60/94) dos isolados de EAEC. A maior taxa de resistência foi para a ampicilina com 58,5% (55/94), seguida da combinação sulfametoxazol-trimetoprima com 55,3% (52/94). Em contraste, taxa moderada foi observada para azitromicina com 24,4% (23/94) e taxas baixas de resistência foram encontradas para ampicilina combinado com sulbactam 10,6% (10/94), seguido de aztreonam 3,2% (3/94), ceftriaxona 2,2% (2/94). Cefoxitina, ertapenem, ciprofloxacina e gentamicina apresentaram o mesmo percentual de 1,1% (1/94). As cepas não apresentaram resistência ao antimicrobiano ceftazidima (**Tabela 14**).

**Tabela 14** Descrição das taxas de prevalência da resistência entre os isolados de EAEC.

ANTIMICROBIANO	SENSÍVEL	INTERMEDIÁRIO	RESISTENTE
<b>Ceftriaxona</b>	92 (97.8%)	2 (2.2%)	0
<b>Aztreonam</b>	91 (96.8%)	3 (3.2%)	0
<b>Ceftazidima</b>	94 (100%)	0	0
<b>Cefoxitina</b>	93 (98.9%)	1 (1.1%)	0
<b>Ertapenem</b>	93 (98.9%)	1 (1.1%)	0
<b>Ciprofloxacina</b>	93 (98.9%)	1 (1.1%)	0
<b>Trimetoprima+ Sulfametoxazol</b>	42 (44.7%)	0	52 (55.3%)
<b>Ampicilina</b>	39 (41.5%)	0	55 (58.5%)
<b>Ampicilina+Sulbactam</b>	84 (89.4%)	3 (3.2%)	7 (7.4%)
<b>Gentamicina</b>	93 (98.9%)	0	1 (1.1%)
<b>Azitromicina</b>	71 (75.5%)	0	23 (23.5%)

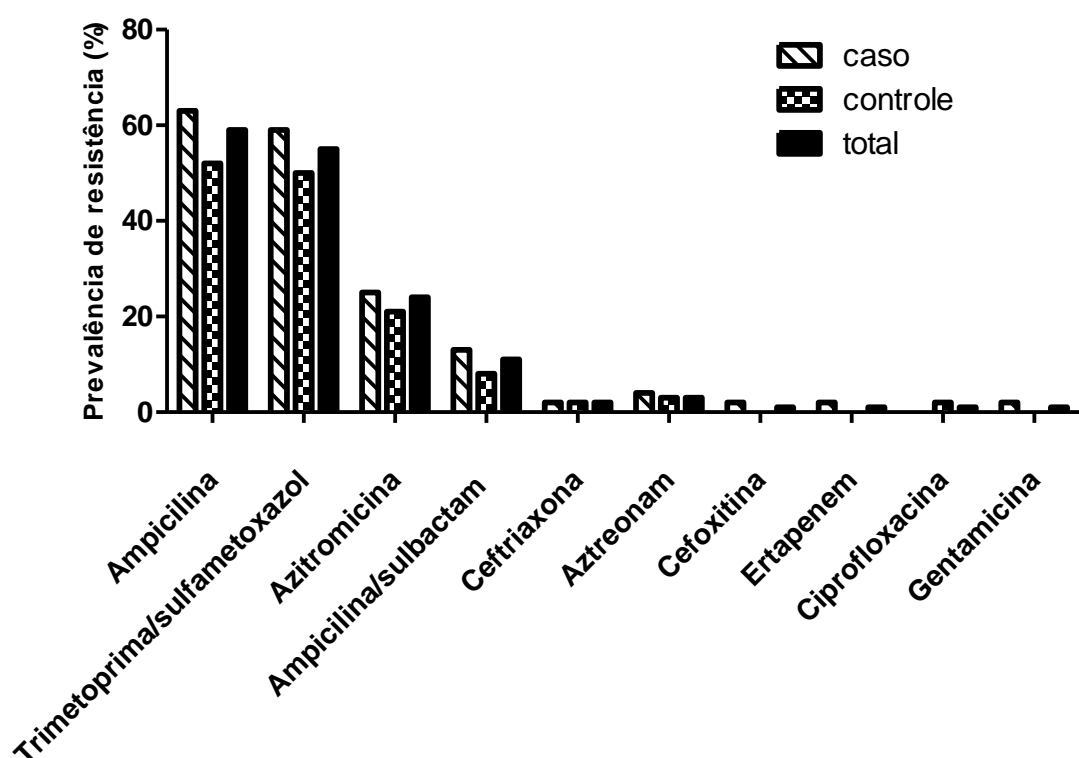
As taxas de resistência entre os casos foram de 63% (34/54) para ampicilina, 59,3% (32/54) para a combinação trimetoprima/sulfametoxazol, 25,9% (14/54) para azitromicina, 12,9% (7/54) para ampicilina/sulbactam, 3,7% (2/54) para aztreonam e taxas de 1,9% (1/54) para os antimicrobianos ceftriaxona, cefoxitina, ertapenem e



gentamicina. Foi encontrada uma taxa no grupo caso de 29,6% (16/54) de cepas sensíveis a todos os antimicrobianos testados (**Figura 6**).

Em contrapartida, as taxas de resistência detectadas nos controles foram de 52,5% (21/40) para ampicilina, 50% (20/20) para trimetoprima/sulfametoxazol, 21,6% (9/40) para azitromicina, 7,5% (3/40) para ampicilina/sulbactame 2,5% (1/40) para os antimicrobianos ceftriaxona, aztreonam e ciprofloxacina (**Figura 6**). Uma taxa de 40% (16/40) de cepas sensíveis a todos os antimicrobianos foi detectada nos grupos controles. Não houve associação estatística de resistência para ambos os grupos estudados.

**Figura 6** Representação do percentual de resistência entre os isolados de EAEC entre os grupos caso e controle.



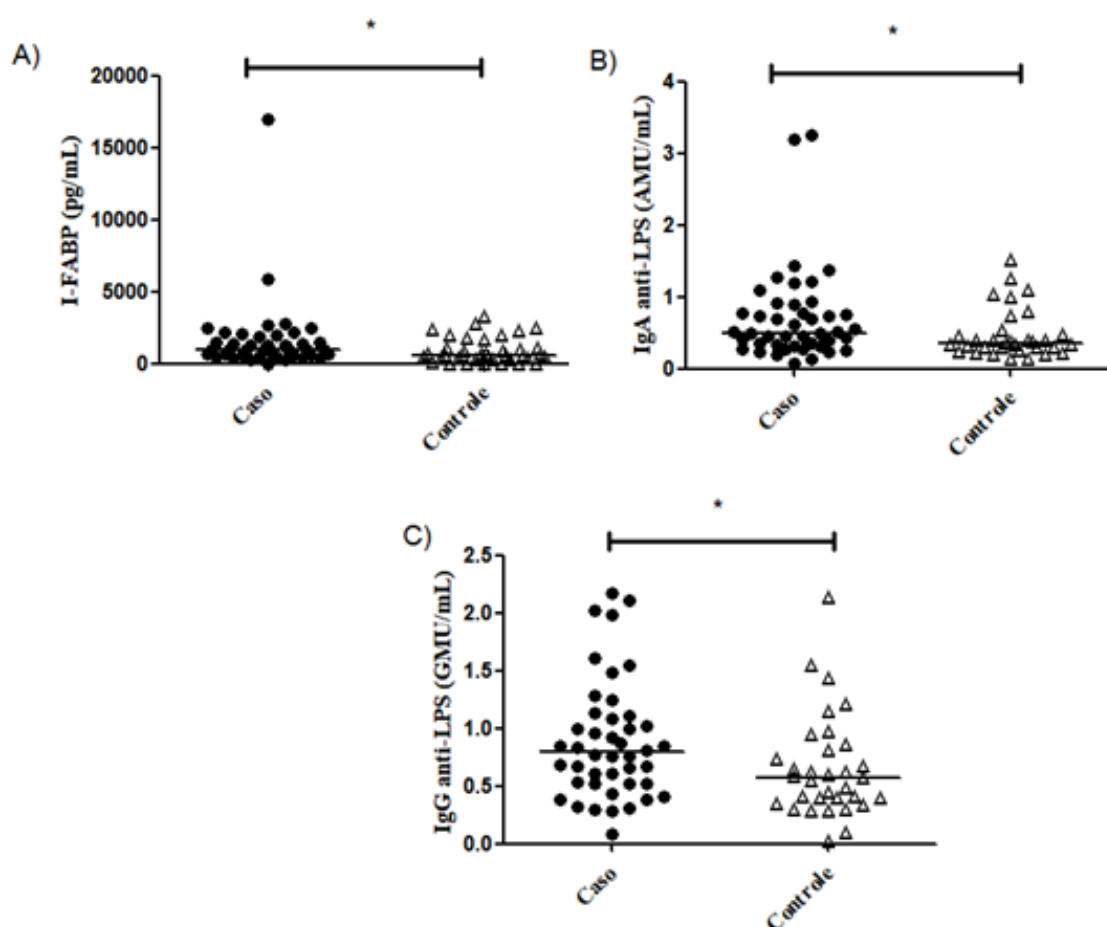
Dentre os 94 isolados de EAEC, 22,3% (21/94) apresentaram fenótipo de multirresistência (resistência a pelo menos um fármaco de três classes diferentes de antimicrobianos). O perfil de multirresistência mais detectado foi para ampicilina, trimetoprima/sulfametoxazole azitromicina com uma taxa de 90,4% (19/21). Apenas uma amostra foi positiva para a produção de ESBL (1,06%).



### 5.7. Análise de biomarcadores de inflamação intestinal

Na análise realizada para a detecção dos biomarcadores de inflamação nas crianças do grupo caso e controle, a presença dos biomarcadores I-FABP ( $P=0.0127$ ), IgA anti-LPS ( $P= 0.0353$ ) e IgG anti-LPS ( $P= 0.0192$ ) (**Figura 7**) foram associadas aos casos de desnutrição.

**Figura 7** Concentrações dos marcadores inflamatórios FABP-I (A), LPS-IgA (B) e LPS-IgG (C) em crianças dos grupos caso e controle.



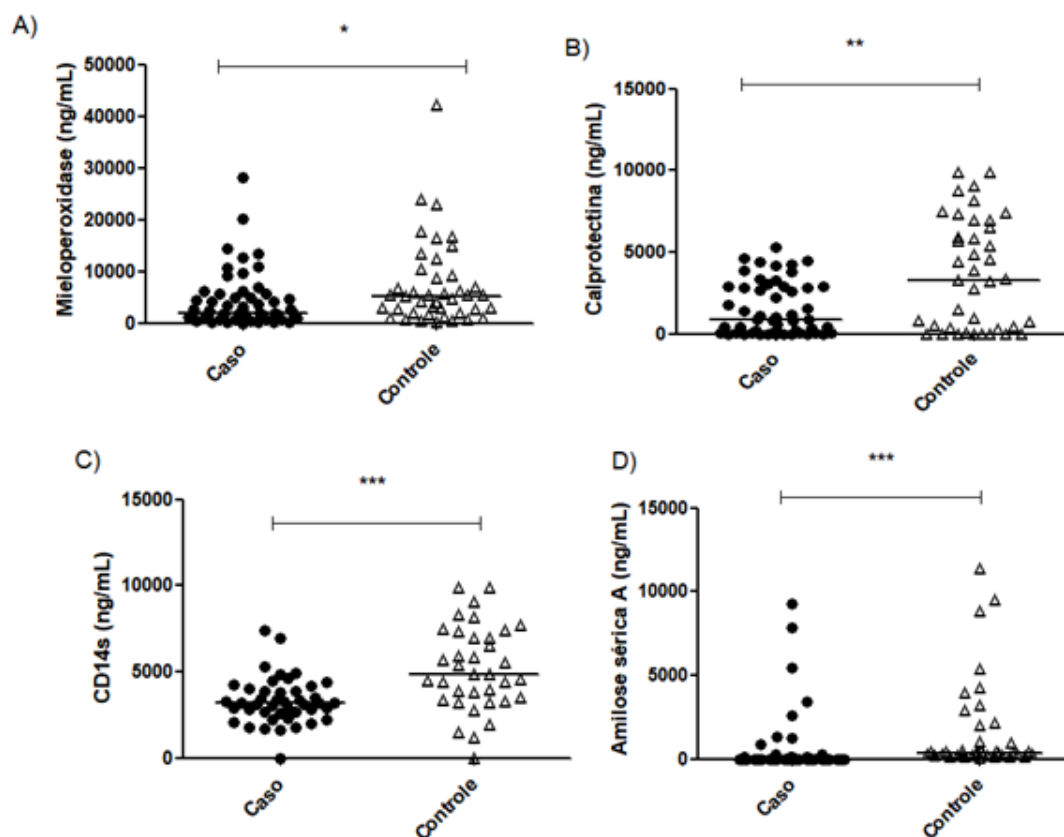
Teste estatístico Mann Whitney; \* $P < 0.05$ ; pg – Picograma; AMU – Unidade de Mediana de IgA; GMU – Unidade de Mediana de IgG; mL – mililitro

Em contrapartida, a presença dos biomarcadores MPO ( $P=0.0169$ ), calprotectina ( $P=0.0096$ ), CD14s ( $P < 0.0001$ ) e SAA ( $P < 0.0001$ ) foram associadas aos controles nutridos (**Figura 8**). Não houve associação estatística entre a detecção dos biomarcadores neoptertina, alpha-1-antitripsina, REG-1B, LBP e hsCRP com os grupos do estudo.



Foi realizado teste de correlação entre a presença dos biomarcadores de inflamação detectados com a capacidade das cepas de formar biofilme e não foram encontradas diferença significativa entre os parâmetros.

**Figura 8** Concentrações dos marcadores inflamatórios MPO (A), calprotectina (B), CD14s (C) e SAA (D) em crianças dos grupos caso e controle.



Teste estatístico Mann Whitney ; \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.0001; ng – nanograma; mL - mililitro



## 6. DISCUSSÃO

A EAEC é um importante enteropatógeno capaz de induzir a diarreia persistente e aguda (LIMA et al., 2000; ANDRADE, HAAPALAINEN, FAGUNDES-NETO, 2011; JENSEN et al., 2017) e até mesmo infecção subclínica (FRANÇA et al., 2013; HAVT et al., 2017; LIMA et al., 2000; 2018), podendo acarretar, a longo prazo, em déficit de crescimento infantil e inflamação crônica intestinal (STEINER et al., 1998; ROGAWSKI et al., 2017). Portanto, infecções por EAEC têm sido associadas a diferentes desfechos clínicos (LIMA et al., 2000; HAVT et al., 2017), sendo um desafio para o entendimento da patobiologia desse agente infeccioso. Nesse contexto, a alta heterogeneidade das cepas contribui para esse fenômeno e o pouco conhecimento de marcadores de virulência específicos é responsável por essa consequência (LIMA et al., 2013).

O presente estudo analisou os copatógenos, os genes relacionados à virulência, a filogenia, a formação de biofilme, a resistência a antimicrobianos e a presença de marcadores imunoinflamatórios do patógeno EAEC isolados de amostras fecais, coletadas entre agosto de 2010 a setembro de 2013, de crianças nutridas e desnutridas que eram acompanhadas pelo IPREDE. Para o diagnóstico da EAEC foram utilizados ensaios moleculares que possibilitam a rápida detecção do referido patógeno, através dos seguintes genes: o codificador da ilha de ativação de controle transcricional *-aaiC* e a proteína transportadora anti-agregativa *-aatA* (PLATTS-MILLS et al., 2017; LIMA et al., 2018). Segundo Rogawski et al. (2017) o uso de ambos os genes de diagnóstico torna a identificação de EAEC mais consistente.

A prevalência de EAEC neste estudo foi de 24,1%, que corrobora com um estudo coorte do MAL-ED, onde foi analisado amostras de 2092 crianças, de países da América do Sul, África e Ásia, no qual foi encontrada uma prevalência de 27,5% de infecção por EAEC nas amostras analisadas (ROGAWSKI et al., 2017). Pesquisa caso-controle que analisaram crianças com e sem diarreia, realizada em Fortaleza, detectou uma alta prevalência de infecções por EAEC, demonstrando uma taxa de 41% em ambos os grupos estudados (LIMA et al., 2013). Além disso, estudos mostraram que a infecção por EAEC está associada a casos de desnutrição infantil (HAVT et al., 2017; MAL-ED, 2017; ROGAWSKI et al., 2017), no qual, Lima et al. (2000) demonstraram que a presença de EAEC foi associada a diarreia persistente e a retardo do crescimento



das crianças participantes do estudo, embora nosso estudo não tenha associado a presença desse patógeno ao grupo desnutrido.

A investigação da ocorrência de coinfeções é de extrema importância no estudo das infecções entéricas, principalmente em países em desenvolvimento, onde existe constante exposição a diversos patógenos do ambiente (GUERRANT et al., 2013). Neste estudo, a investigação da etiologia bacteriana identificou 55 amostras com outros patógenos, sendo os patógenos mais prevalentes detectados EPEC atípica, seguida de *Campylobacter* sp. Apesar de não ter sido observada associação estatística de coinfeções nesta população, estudos tem mostrado alta prevalência de detecções de EPEC (SANTOS et al., 2019) e *Campylobacter* como um co-patógeno em infecções por EAEC (MAL-ED, 2017; ROGAWSKI et al., 2017).

A fim de elucidar alguns aspectos da patobiologia da infecção pela EAEC este estudo utilizou cinco painéis de PCR múltiplos, contendo 20 genes codificadores de virulência (LIMA et al., 2013). Esses painéis foram usados para a detecção de genes relacionados à virulência nas amostras de DNA de colônia bacteriana isoladas de crianças nutridas e desnutridas do presente estudo. Além disso, avaliaram-se associações destes genes com a formação ou não de biofilme.

Foi observado que os genes *orf3* e *agg3/4C* foram os mais prevalentes entre todas as crianças diagnosticadas com o patógeno, com taxa de 81,9%, seguido pelos genes *aggR* e *aap* com prevalência de 79,5% e 78,3%, respectivamente. Muitos destes genes compõem a patogênese da EAEC, portanto são importantes para estabelecimento da infecção. O gene *orf3* codifica uma proteína de função ainda desconhecida, embora estudo realizado por Lima et al. (2013) tenham também demonstrado a sua alta prevalência em cepas de EAEC. Já o gene *agg3/4C* codifica uma subunidade da fímbria III e IV do referido patógeno, tendo estas funções de aderência ao epitélio intestinal e consequentemente causar a colonização no intestino do hospedeiro (CHATTAWAY et al., 2013). A função do gene *aggR* é ativar a transcrição de diversos genes codificadores de virulência, inclusive os que codificam as fimbrias e a dispersina (BOISEN et al., 2015; ELIAS, NAVARRO-GARCIA et al., 2016). A dispersina, codificada pelo gene *aap*, possui o papel de dispersão bacteriana, proporcionando o deslocamento do patógeno para outros sítios de infecção (SHEIKH et al., 2002).

Como população, a EAEC é distribuída em quatro filogrupos principais, neste estudo encontramos uma maior prevalência do filogrupo B2, tendo uma taxa de detecção de 54,2%, seguida pelos filogrupos D com 38,3% e filogrupo A com 7,4%,



não havendo associação entre os grupos analisados. Contudo, França et al. (2013) analisando cepas de EAEC isoladas de crianças com e sem diarreia no Rio de Janeiro, detectaram uma maior prevalência dos filogrupos A e D. O mesmo achado foi encontrado em um estudo realizado em cepas de EAEC isoladas de crianças com diarreia no Mali, sendo detectado uma taxa de prevalência de 32,2% tanto para o filogrupo A quanto para o filogrupo D (BOISEN et al., 2012). Em contrapartida, estudo realizado no Paquistão em cepas de EAEC isoladas de 225 crianças com diarreia detectou o filogrupo B2 como o mais prevalente, seguido pelos filogrupos D, A e B1 (KHALIL et al., 2016), corroborando com nossos dados. Portanto, esses estudos tem demonstrado diversidade da taxa de detecção dos filogrupos que variam de acordo com a região do estudo.

A formação do biofilme é um passo importante para persistência do patógeno no sítio de infecção, embora esse processo seja pouco elucidado no ambiente intestinal, pois no trato gastrointestinal, as condições ambientais, sinais do hospedeiro e de bactérias comensais contribuem para moldar a formação de biofilme de *E. coli* dentro das comunidades bacterianas de uma forma complexa e integrada (ROSSI et al., 2017).

Nosso estudo detectou uma taxa de 78,7% de cepas de EAEC capazes de formar biofilme *in vitro*. As cepas isoladas de crianças desnutridas obtiveram uma maior taxa de formação de biofilme em relação ao grupo controle (45,7% vs 32,9%), porém não houve associação com desnutrição, sugerindo que a formação do biofilme nestas cepas não está ligada à desnutrição das crianças do estudo. Contudo, Mohamed et al. (2007) demonstraram a importância da formação de biofilme por cepas de EAEC na presença de diarreia.

Para compreendermos a patobiologia envolvida entre infecções por EAEC e formação de biofilme, correlacionamos este com os genes codificadores de virulência detectados, encontrando associação do gene *aare pic* com a formação do biofilme. O gene *aar* é um gene responsável por regular negativamente o gene transcricional *aggR* e estudos têm associado a presença do gene *aar* a infecções subclínicas ou a uma colonização intestinal (BOISEN et al., 2012; LIMA et al., 2013; SANTIAGO et al., 2014; HAVT et al., 2017). Paralelamente, pesquisas têm associado a presença de biofilme a uma persistência da infecção bacteriana, pois geralmente o biofilme confere uma resistência ao estresse ambiental e evasão do sistema imune do hospedeiro (HALL-STOODLEY, COSTERTON, STOODLEY, 2004; GONZÁLEZ, HAHN, GUNN, 2018). Até o momento, não há dados na literatura que possamos explicar tal fenômeno,



portanto, hipotetizamos que cepas que possuem o gene *aar* formam biofilme para que este possa permancer no ambiente intestinal por mais tempo.

A proteína codificada pelo gene *pic* possui função de mucinase e de promover a colonização intestinal, pois com a degradação do muco o patógeno pode adentrar a camada mucóide e aderir ao epitélio intestinal (HARRINGTON et al., 2009). Diante disso, sugerimos que cepas que possuem o gene *pic* promove a colonização intestinal favorecendo a formação do biofilme bacteriano.

Em contrapartida, a presença dos genes *capU*, *pet*, *sepA* e *eilA* foram associados a cepas de EAEC não formadoras do biofilme. O gene *capU* codifica um homólogo da hexosiltransferase, que possui função no metabolismo de carboidratos. Estudo realizado por Fujiyama et al. (2008), analisaram cepa de EAEC 042 mutante, que não possuía o gene *capU*, e detectaram que essas cepas foram capazes de formar mais biofilme do que a cepa de EAEC 042 *wild type*, corroborando com nosso resultado de que a presença do gene *capU* pode interferir na formação do biofilme de EAEC. Em relação à associação da presença do gene *pet* a não formação de biofilme estudos moleculares tem mostrado a não associação da presença do gene *pet* com a formação de biofilme, corroborando com o nosso achado (MOHAMED et al., 2007; WANI et al., 2012).

O gene *sepA*, codifica uma protease extracelular que também está presente em cepas de *Shigella*, tendo como função a degradação de muco e invasão celular (BOISEN et al., 2009; RUIZ-PEREZ, NATARO, 2014). Nosso achado não corrobora com a literatura encontrada, na qual, o referido gene está associado à promoção da colonização causando a diarreia e sintomas da doença no hospeiro (BOISEN et al., 2012; IKUMAPAYI et al., 2017; MEDEIROS et al., 2017).

O gene *eilA* codifica uma das proteínas efetoras do sistema de secreção do tipo III e estudos tem associado a sua presença a formação do biofilme não corroborando com nossos resultados (SHEIKH et al., 2006; HÜTTENER et al., 2014). No entanto, Hüttener et al. (2014) sugere a existência de reguladores negativos desse gene, portanto, hipotetizamos que esses reguladores poderiam representar uma estratégia da bactéria de reduzir a expressão da formação de biofilme já vinculado a outros genes a fim de não prejudicar o hospedeiro. São necessários mais estudos posteriores para compreender o complexo mecanismo envolvido na patobiologia do biofilme em EAEC.



O presente estudo também avaliou o fenótipo de resistência dos isolados de EAEC a vários antimicrobianos através do teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA) pelo método de difusão em disco, de acordo com instruções do CLSI, sendo esta metodologia largamente utilizada por vários estudos da área (AMAYA et al., 2011; ADEFISOYE, OKOH, 2016; GHANEM, HADDADIN, 2018).

Em relação aos resultados do referido método, o presente estudo mostrou que os isolados de EAEC analisados tiveram maior taxa de resistência a ampicilina, seguido de sulfametoxazol-trimetoprima e azitromicina. Tais achados reforçam a importância da vigilância da resistência antimicrobiana para o melhor direcionamento da escolha terapêutica (LEI et al., 2018).

As altas taxas de resistência a ampicilina e a combinação sulfametoxazol-trimetoprim já foram observadas em isolados de EAEC em diversos estudos (RAJU, BALLAL, 2009; NÜESCH-INDERBINEN et al., 2013; ALI et al., 2014), o que corrobora com nossos dados e confirma a disseminação dessa resistência em várias localidades.

A rápida emergência da resistência antimicrobiana deve-se principalmente à importância de elementos móveis bacterianos para estes mecanismos, sendo os plasmídeos, transposons e integrons citados como as principais fontes de resistência em bactérias, pois estes são transmitidos de um microrganismo bacteriano para outro de diferente espécie (WELDHAGEN, 2004). Em Fortaleza, Lima et al. (1995) já demonstraram a existência de diferentes plasmídeos codificadores de resistência a ampicilina, estreptomicina e sulfametoxazol-trimetoprima em cepas de *Shigella*.

Até o momento, não foram encontrados dados na literatura sobre resistência a azitromicina em isolados de EAEC, embora, estudo tenha demonstrado resistência a eritromicina, pertencente à mesma classe antimicrobiana da azitromicina em isolados de *E. coli*, indicando uma taxa de 100% de resistência (IGWARAN, IWERIEBOR, OKOH, 2018). Um estudo do nosso grupo realizado em cepas de *Shigella* isoladas de crianças com diarreia em Fortaleza encontrou taxa considerável de resistência a azitromicina nestes isolados, indicando circulação de mecanismos de resistência a esse fármaco (MEDEIROS et al., 2018), o que pode explicar as taxas encontradas no nosso estudo em relação à resistência a azitromicina, sugerindo uma possível transmissão horizontal de plasmídeos contendo esse mecanismo para outras bactérias, incluindo EAEC.

Foi também avaliada nas crianças do presente estudo a presença de biomarcadores de inflamação intestinal local e sistêmica, onde encontramos a presença



dos biomarcadores inflamatórios sistêmicos I-FABP, IgA e IgG anti-LPS associadas às crianças infectadas desnutridas. O I-FABP é uma proteína de ligação aos ácidos graxos presentes no epitélio intestinal, portanto, a sua presença na circulação sanguínea sugere lesão da barreira intestinal (ADRIANSE et al., 2013). Os anticorpos IgA e IgG anti-LPS representam a circulação de anticorpos contra o LPS bacteriano e a sua presença na circulação periférica sugere uma translocação microbiana (GABE et al., 2001), indicando assim, lesão intestinal nessa população, favorecendo a baixa absorção de nutrientes e consequentemente piora do quadro nutricional. Nossos dados corroboram com os achados encontrados por Guerrant et al. (2016), onde a presença dos biomarcadores I-FABP, IgA e IgG anti-LPS também foram associados a desnutrição infantil.

A presença dos biomarcadores MPO, calprotectina, CD14 solúvel e SAA foram associados às crianças infectadas nutridas, sendo o MPO um marcador de migração de polimorfonucleares, indicando processo inflamatório intestinal (HAMPTON, KETTLE, WINTERBOURN, 1998). A calprotectina é uma proteína de ligação de cálcio e zinco liberada pelos neutrófilos como resultado do estresse celular excretada nas fezes, sendo um indicador de dano intestinal (VAOS et al., 2013). A proteína CD14 na forma solúvel é uma proteína de fase aguda envolvido na inibição do crescimento microbiano (WRIGHT et al., 1990). O biomarcador imunoinflamatório SAA é sintetizado por hepatócitos em resposta a citocinas, especialmente interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), produzidas por monócitos e macrófagos, sendo um marcador de resposta de fase aguda (STEEL, WHITEHEAD, 1994). Portanto, a associação da presença desses biomarcadores em crianças nutridas sugere que há uma boa resposta imunológica nessa população, indicando o não comprometimento das defesas imunológicas do hospedeiro contra o patógeno.

O presente estudo apresentou algumas limitações, tais como: o protocolo MAL-ED não foi projetado para avaliar a associação entre doença e desnutrição em crianças, portanto, dados de morbidade diária não foram coletados. Dados referentes à quantidade e qualidade do consumo alimentar complementar que poderiam influenciar a desnutrição também não foram coletados. As análises de alguns parâmetros não foram realizadas em todas as amostras positivas para EAEC, devido à insuficiência do inóculo para a realização do experimento e a detecção dos genes relacionados à virulência foi realizada em *pool* de DNA bacteriano. Embora tenha essas limitações, este estudo é um



dos primeiros que caracterizam quanto ao genótipo e fenótipo cepas de EAEC isoladas de crianças nutridas e desnutridas, facilitando o entendimento da patobiologia de EAEC envolvida na desnutrição.

## **7. CONCLUSÃO**



- 1) Diante disso, as cepas de EAEC isoladas de crianças nutridas e desnutridas mostraram-se bastante heterogêneas, contudo, não apresentando marcadores específicos de virulência que indiquem uma maior gravidade da infecção nessa população.
- 2) Em relação aos filogrupos pesquisados, os filogrupos B2 e D foram os mais prevalentes entre as crianças do estudo, não havendo associação estatística entre os grupos.
- 3) Considerando a patobiologia do biofilme de EAEC, não foram observados influência desse fenótipo em relação às crianças nutridas e desnutridas. Entretanto, nosso estudo mostrou a influência da presença de alguns genes relacionado à virulência na formação ou não do biofilme nestas cepas, concluindo que há uma complexa interação entre os genes relacionados à virulência para a formação ou não desse fenótipo.
- 4) A resistência aos antimicrobianos foi verificada, com destaque para a grande circulação de cepas de EAEC resistentes a ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprima e azitromicina, reforçando a importância da vigilância da resistência antimicrobiana para o melhor direcionamento da escolha terapêutica nestas infecções.
- 5) A presença de biomarcadores imunoinflamatórios em ambos os grupos de estudo, reforçam o entendimento do ciclo infecção entérica-desnutrição, no qual crianças desnutridas possuem comprometimento da resposta imunológica a infecção.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, n. 3713, 1940.

ABREU, A. G. et al. The serine protease pic from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates immune evasion by the direct cleavage of complement proteins. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 212, p. 106-115, 2015.

ACF INTERNATIONAL. Taking Action Nutrition for Survival, Growth & Development. White Paper, p. 1–52, 2010.

ADEFISOYE, A., OKOH, A. I. Identification and antimicrobial resistance prevalence of pathogenic *Escherichia coli* strains from treated wastewater effluents in Eastern Cape, South Africa. **MicrobiologyOpen**, v. 5, n. 1, p.143-151, 2016.

ADRIAANSE, M. P. M. et al. Serum I-FABP as marker for enterocyte damage in coeliac disease and its relation to villous atrophy and circulating autoantibodies. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 37, p. 482–490, 2013.

ALI, M. M. M. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* in diarrheic children in Egypt: molecular characterization and antimicrobial susceptibility, **The Journal of Infection Developing Countries**, v. 8, n. 5, p. 589-596, 2014.

AMAYA, E. et al. Antibiotic resistance patterns of intestinal *Escherichia coli* isolates from Nicaraguan children. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 2, p.216-222, 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 Microbiological Methods**, v. 106, p. 16-18, 2014.

BANDEIRA, T. J. P. G. et al. In Vitro Activities of Amoxicillin-Clavulanate, Doxycycline, Ceftazidime, Imipenem, and Trimethoprim-Sulfamethoxazole against



Biofilm of Brazilian Strains of *Burkholderiapseudomallei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 11, p.5771-5773, 2013.

BAJAJ, P.; SINGH, N. S.; VIRDI, J. S. *Escherichia coli*  $\beta$ -Lactamase: What Really Matters. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 417, 2016.

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, p.1249-1251, 1990.

BANFADEH, 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, 2015.

BENEVIDES-MATOS, N. et al. Adherence and virulence genes of *Escherichia coli* from children diarrhoea in the Brazilian Amazon. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, n. 1, p. 131-137, 2015.

BENMESSAOUD, R. et al. Aetiology, epidemiology and clinical characteristics of acute moderate-to-severe diarrhoea in children under 5 years of age hospitalized in a referral paediatric hospital in Rabat, Morocco. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, p. 84-92, 2015.

BERRY, A. A. et al. Structural insight into host recognition by aggregative adherence fimbriae of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Plos Pathogens**, v. 10, n. 9, p. 1-15, 2014.

BLACK, R. E. et al. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. **The Lancet**, v.382, n. 9890, p.427–451, 2013.

BOISEN, N. et al. New Adhesin of Enteroaggregative *Escherichia coli* Related to the Afa/Dr/AAF Family. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 7, p. 3281-3292, 2008.

BOISEN, N. et al. Short Report: High prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 2, p. 294–301, 2009.



BOISEN, N. et al. Genomic Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* From Children in Mali. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 3, p. 431-444, 2012.

BOISEN, N. et al. Shiga toxin 2a and Enteroaggregative *Escherichia coli* - a deadly combination. **GutMicrobes**, v.6, n.4, p.272-278, 2015.

BONOMO, R. A. et al. Carbapenemase-producing organisms: A global scourge. **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, n. 8, p. 1290-1297, 2018.

BUERIS, V. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 839-844, 2007.

CHATTAWAY, M. A. et al. Identification of *Escherichia coli* and *Shigella* species from whole genome sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 616-623, 2016.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555-4558, 2000.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Microbes, Immunity, and Disease**, v. 284, n. 5418, p.1318-1322, 1999.

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, 2015.

CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013.

DALLENNE, C et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p.490-495, 2010.



DENNO, DM. et al. Use of the lactulose to mannitol ratio to evaluate childhood environmental enteric dysfunction: A systematic review. **Clinical Infectious Disease**, p. S213–S219, 2014.

DAVOODABADI, A. et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of Enteraggative *Escherichia coli* Strains Isolated From Diarrheic Children in Iran. **Jundishapur J Microbiol**, Iran, v. 8, n. 9, p.22295-22295, 2015.

FLEECE, M. E. et al. Molecular diagnosis of antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 18, n. 3, p. 207-217, 2018.

FRANÇA, F. L. S. et al. Genotypic and phenotypic characterisation of Enteraggative *Escherichia coli* from children in Rio de Janeiro, Brazil. **Plos One**, v. 8, n. 7, 2013.

FRANK, C. et al. Epidemic profile of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 19, p. 1771-1780, 2011.

FUKUHARA, H. et al. In vivo evidence for the role of RegI in gastric regeneration: transgenic overexpression of RegI accelerates the healing of experimental gastric ulcers. **Laboratory Investigation**, v. 90, p. 556–565, 2010.

FUKUI, H. et al. Regenerating gene protein may mediate gastric mucosal proliferation induced by hypergastrinemia in rats. **Gastroenterology**, v. 115, n. 6, p. 1483-1493, 1998.

GABE, S. et al. Gut barrier function and bacterial translocation in humans. **Clinical Nutrition**, v. 20, p. 107–112, 2001.

GHANEM, B.; HADDADIN, R. N. Multiple drug resistance and biocide resistance in *Escherichia coli* environmental isolates from hospital and household settings. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 7, n. 1, p.1-7, 2018.

GONZÁLEZ, J. F.; HAHN, M. M.; GUNN, J. S. Chronic biofilm-based infections: skewing of the immune response. **Pathogens and Disease**, v. 76, n. 3, p.1-18, 2018.

GUERRANT, R. L. et al. Biomarkers of Environmental Enteropathy, Inflammation, Stunting, and Impaired Growth in Children in Northeast Brazil. **Plos One**, v. 11, 2016.



GUERRANT, R. L. et al. The impoverished gut – a triple burden of diarrhea, stunting and chronic disease. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**. v. 10, n. 4, p. 220-229, 2013.

GUTIERREZ, E. J. et al. Enteric parasites and enteroaggregative *Escherichia coli* in children from Cañazas County, Veraguas Province, Panama. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 91, n. 2, p. 267-272, 2014.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Journal of the American Society of Hematology**, v. 92, 1998.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 95–108, 2004.

HAO, W. et al. Phylogenetic incongruence in *E. coli* O104: Understanding the evolutionary relationships of emerging pathogens in the face of homologous recombination. **Plos One**, v. 7, n. 4, 2012.

HARRINGTON, S. M. et al. Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia Coli*. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1565-1578, 2005.

HARRINGTON, S. M. et al. The pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 6, p. 2465-2473, 2009.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **Microbiology Letters**, v. 254, n. 1, p. 12-18, 2006.

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



HARPER, K. M. et al. Environmental enteric dysfunction pathways and child stunting: A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. e0006205, 2018.

HAZEN, T. H. et al. Comparative Genomics of an IncA/C Multidrug Resistance Plasmid from *Escherichia coli* and *Klebsiella* Isolates from Intensive Care Unit Patients and the Utility of Whole-Genome Sequencing in Health Care Settings. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4814-4825, 2014.

HOUPT, E. et al. Microbiologic Methods Utilized in the MAL-ED Cohort Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 1, n. 59, p. 225-232, 2014.

HÜTTENER, M. et al. HilA-like regulators in *Escherichia coli* pathotypes: the YgeH protein from the enteroaggregative strain 042. **BMC Microbiology**, p. 14-268, 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. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 4, p. 97–1004, 2017.

JENSEN, B. H. et al. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n.3, p. 614-630, 2014.

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, 2017.

JONSSON, R. et al. Novel Aggregative adherence fimbria variant of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 4, p. 1396-1405, 2015.

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

KHALIL, U. et al. Phenotypic and genotypic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from pediatric population in Pakistan. **Apmis**, v. 124, n. 10, p.872-880, 2016.



KHOSHVAGHT, H.; HAGHI, F.; ZEIGHAMI, H. Extended spectrum betalactamase producing Enteroaggregative *Escherichia coli* from young children in Iran. **Gastroenterology and Hepatology**, v. 7, n. 2, p. 131-136, 2014.

KOTLOFF, K. L. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet**, v. 382, n. 9888, p. 209-222, 2013.

LÄÄVERI, T. et al. A prospective study of traveller's diarrhoea: analysis of pathogen findings by destination in various (sub)tropical regions. **Clinical Microbiology and Infection**, p. 1-8, 2017.

LEI, L. et al. Antimicrobial resistance and prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC), in diarrheic yaks of Tibetan Plateau, China. **Acta Tropica**, v. 182, p.111-114, 2018.

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, n. 6, p. 2274-2278, 2011.

LIMA A. A. M. et al. High frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin, chloramphenicol, and tetracycline isolated from patients with shigellosis in northeastern Brazil during the period 1988 to 1993. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 1, p. 256-259, 1995.

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. Geography, Population, Demography, Socioeconomic, Anthropometry, and Environmental Status in the MAL-ED Cohort and Case-Control Study Sites in Fortaleza, Ceara, Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 4, p.287-294, 2014.

LIMA, A. A. M. et al. Determinant Variables, Enteric Pathogen Burden, Gut Function, and Immune-Related Inflammatory Biomarkers Associated with Childhood



Malnutrition: A Prospective CaseControl Study in Northeastern Brazil. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 36, n. 12, p. 1177-1185, 2018.

LIMA, A. A. M.; MEDEIROS, P. H. Q. S.; HAVT, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* subclinical and clinical infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, artigo aceito para publicação, 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, 2013.

LOZER, D. M. et al. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 1-6, 2013.

MAL-ED Network Investigators. The MAL-ED study: a multinational and multidisciplinary approach to understand the relationship between enteric pathogens, malnutrition, gut physiology, physical growth, cognitive development, and immune responses in infants and children up to 2 years of age in resource-poor environments. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, p. 193-206, 2014.

MAL-ED Network Investigators. Relationship between growth and illness, enteropathogens and dietary intakes in the first 2 years of life: findings from the MAL-ED birth cohort study. **BMJ Global Health**, v.2, 2017.

MEDEIROS, A. A. Evolution and dissemination of  $\beta$ -Lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -Lactam antibiotics. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, p. 19-45, 1997.

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, 2018.

MÉNARD, L. P., DUBREUIL, J. D. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): A new toxin with an old twist. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n.1, p. 43-60, 2002.



MOHAMED, J. A. et al. Association of putative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 121-126, 2007.

MOORE, S. R. et al. Prolonged episodes of acute diarrhea reduce growth and increase risk of persistent diarrhea in children. **Gastroenterology**, v. 139, p. 1156-1164, 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**, v. 66, n. 1, p. 50-57, 2010.

MOSQUITO, S. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* phylogroups are associated with antibiotic resistance and duration of diarrheal episode. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p.1-6, 2015.

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. 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.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NAVARRO-GARCIA, F. et al. Cytoskeletal effects induced by pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 67, n.5, p. 2184-2192, 1999.

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, 2013.

PASCKKE, C. et al. Controlled study on enteropathogens in travellers returning from the tropics with and without diarrhea. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 8, p. 1194-1200, 2010.



PLATTS-MILLS, J. A. et al. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). **The Lancet Global Health**, v. 3, n. 9, p.564-575, 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, p. 1132-1138, 2017.

REGUA-MANGIA, A. H. et al. Molecular typing and virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro city, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v.58, n. 4, p. 414-422, 2009.

RICKARD, A. H. et al. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multispecies biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 11, p. 94-100, 2003.

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.e0005798, 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 Sciences**, v. 71, n. 5, p. 745-770, 2014.

SABARLY, V. et al. The decoupling between genetic structure and metabolic phenotypes in *Escherichia coli* leads to continuous phenotypic diversity. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 24, n. 7, p. 1559-1571, 2011.

SAHL, J. W. et al. A comparative genomic analysis of diverse clonal types of enterotoxigenic *Escherichia coli* reveals pathovar-specific conservation. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 2, p. 950-960, 2011.

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. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n.1, p. 142-150, 2007.



SANTOS, A. K. S. et al. Virulence genes and copathogens associated with clinical outcomes of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infections in children from Brazilian semiarid region: a case-control study of diarrhea, artigo em submissão.

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. 1-15, 2014.

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

SERRES, F.; BLANCO, I. Role of alpha-1 antitrypsin in human health and disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 276, p. 311-335, 2014.

SHEIKH, J. et al. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 9, p. 1329-1337, 2002.

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

STEEL, D. M.; WHITEHEAD, A. S. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. **Immunol Today**, v. 15, p. 81-88, 1994.

STEINER, T. S. et al. (1998) 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.

STEINER, T. S. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* express a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 12, p. 1769-1777, 2000.

STEPANOVIC, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, p. 175-179, 2000.

STRAUMAN, M. C. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* disrupts epithelial cell tight junctions. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 11, p. 4958-4964, 2010.



SYED, S.; ALI, A.; DUGGAN, C. Environmental Enteric Dysfunction in Children. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 63, n. 1, p. 6-14, 2016.

TANIUCHI, M. et al. Etiology of diarrhea in Bangladeshi infants in the first year of life analyzed using molecular methods. **The Journal of Infectious Diseases**, v.208, n. 11, p. 1794-1802, 2013.

TAYH, G. et al., First report of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* in Gaza Strip, Palestine. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v.6, p. 17-21, 2016.

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, n. 6, p. 320–329, 2010.

TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R. Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, p. 912-935, 2011.

UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND (UNICEF). Improving child nutrition: The achievable imperative for global progress. **United Nations Children's Fund**, p.1-132, 2013.

UNICEF; OMS; WB; UNPD. Child mortality rates plunge by more than half since 1990 but global MDG target missed by wide margin, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/child-mortality-report/en/>. Acessado em: 21 de junho de 2018.

VAOS, G. et al. The role of calprotectin in pediatric disease. **Biomed Research International**, v. 2013, p.1-8, 2013.

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

VICTORIA, C. G. et al. Maternal and child health in Brazil: Progress and challenges. **The Lancet**, v. 377, n. 9780, p. 1863–1876, 2011.

VIJAY, D. et al. Characterization and biofilm forming ability of diarrhoeagenic enteroaggregative *Escherichia coli* isolates recovered from human infants and young



animals. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 38, p. 21-31, 2015.

Vreugdenhil, A. et al. Additional value of serum I-FABP levels for evaluating celiac disease activity in children, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v. 46, n. 12, p. 1435-1441, 2011.

WANI, S. A. et al. Putative virulence genes and biofilm production among typical enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic children in Kashmir and Andhra Pradesh. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p.587-592, 2012.

WATANABE, K.; PETRI, W. A. Environmental enteropathy: Elusive but significant subclinical abnormalities in developing countries. **EBioMedicine**, v. 10, p. 25-32, 2016.

WELDHAGEN G. F. Integrins and beta-lactamases—a novel perspective on resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. 6, p.556-562, 2004.

WHO. Global database on child growth and malnutrition: The Z-score or standard deviation classification system, 1997. Disponível em: <http://www.who.int/nutgrowthdb/about/introduction/en/index4.html>. Acessado em: 01 de julho de 2018.

WHO. WHO Child Growth Standards: Methods and development: Length/height-for-age, Weight-for-age, Weight-for-length, Weight-for-height and Body Mass Index-for-age. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2006. Disponível em: [http://www.who.int/childgrowth/publications/technical\\_report\\_pub/](http://www.who.int/childgrowth/publications/technical_report_pub/). Acessado em: 17 de junho de 2018.

WHO. World health statistics. **Guideline of World Health Organization**, 2015.

WHO. Double-duty actions for ending malnutrition within a decade. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/en/news-room/commentaries/detail/double-duty-actions-for-ending-malnutrition-within-a-decade>. Acessado em: 21 de junho de 2018.

WRIGHT, S. D. et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science**, v. 249, p. 1431–3, 1990.



ZAMBONI, A.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1058-1063, 2004.

ZHANG, S. X.; YANG, C. L.; GU, W. P.; AI, L. et al. Case-control study of diarrheal disease etiology in individuals over 5 years in southwest China. **Gut Pathogens**, v. 8, n. 58, p. 1-11, 2016.



## ANEXO A

<b>Infecção Entérica e Desnutrição</b>			<b>Local do Estudo: Brasil</b>
<b>Estudo CASO-CONTROLE</b>			
TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PESQUISA INTERNACIONAL			
IRB-HSR <#>	Versão #3	28Mai2010	Página 1 de 3

Nome Criança \_\_\_\_\_ PID #

Participante: Mãe: \_\_\_\_\_ PID #

## -- CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAR DE UM ESTUDO DE PESQUISA --

**De Que Trata Este Estudo**

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

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

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

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

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

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

Este estudo será realizado em Fortaleza, Brasil.

**O Que Acontecerá Durante o Estudo?**

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

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

IRB-HSR  
 APPROVAL DATE 8/10/10  
 EXPIRATION DATE 8/9/11

Dra. Mônica Parente Monteiro  
 Coordenadora Adjunta do Comitê  
 de Ética em Pesquisas  
 CONEP/UFCE







<b>Infecção Entérica e Desnutrição</b>			<b>Local do Estudo: Brasil</b>
<b>Estudo CASO-CONTROLE</b>			
TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PESQUISA INTERNACIONAL			
IRB-HSR < # >	Versão #3	28Mai2010	Página 2 de 3

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

#### **Esta Pesquisa Poderá Ajudar-me?**

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

#### **Esta Pesquisa Promove Algum Risco?**

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

#### **Garantia em Caso de Danos**

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

#### **Como Minha Privacidade Será Protegida?**

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

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

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

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

Em adição, também pedimos permissão para liberar informações sobre bactérias no intestino de sua criança. Isto será liberado somente com sua permissão e sem nenhuma informação sua ou de sua criança associado a ele.

#### **Eu Preciso Participar?**

Você não precisa participar deste estudo se não quiser. Isto significa participação voluntária. Cabe a você decidir em estar neste estudo de acordo com seu interesse. Se você não desejar participar deste estudo não assine este formulário.

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



<b>Infecção Entérica e Desnutrição</b>	<b>Local do Estudo: Brasil</b>
<b>Estudo CASO-CONTROLE</b>	
TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PESQUISA INTERNACIONAL	
IRB-HSR < # >      Versão #3      28Mai2010	Página 3 de 3

**Quem Eu Posso Contactar Para Questões Sobre Direitos Como Sujeito de Pesquisa?**

Comitê de Ética em Pesquisa da UFC (COMEPE), telefone: 3366.8338. Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-270.

Dr. Aldo Lima, Unidade de Pesquisa Clínica, UFC (telefone: 3366.8437),

Dr. Álvaro Madeiro, IPREDE (telefone: 3218.4000)

**Assinatura**

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

\_\_\_\_\_  
NOME DO PARTICIPANTE  
(ASSINATURA)

\_\_\_\_\_  
NOME DO PARTICIPANTE  
(LETRA DE FORMA)

\_\_\_\_\_  
DATA

\_\_\_\_\_  
QUEM OBTVE O CONSENTIMENTO  
(ASSINATURA)

\_\_\_\_\_  
QUEM OBTVE CONSENTIMENTO  
(LETRA DE FORMA)

\_\_\_\_\_  
DATA

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

\_\_\_\_\_  
NOME DA TESTEMUNHA  
(ASSINATURA)

\_\_\_\_\_  
NOME DA TESTEMUNHA  
(LETRA DE FORMA)

\_\_\_\_\_  
DATA

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





## ANEXO B



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

**PARECER Nº 232/10**

**Registro CONEP 15701** (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

**Registro no CEP – 246/09**

**Processo nº 25000.639836/2009-76**

**Projeto de Pesquisa:** *"Etiologia, Fatores de Risco e Interações das Infecções Entéricas e Desnutrição e suas Consequências no Desenvolvimento e Saúde da Criança"*. Protocolo versão 01 data da capa de 05/03/2009, data do corpo do texto 28/08/2009; Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para o estudo CASE-CONTROL versão 2.0 de 18/02/2010, TCLE para o estudo COHORT versão 4 de 15/04/2009.

**Pesquisador Responsável:** Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

**Instituição:** Universidade Federal do Ceará (**CENTRO ÚNICO**)

**CEP de origem:** Universidade Federal do Ceará

**Área Temática Especial:** Pesquisa com cooperação estrangeira

**Patrocinador:** Bill & Melinda Gates Foundation

**Sumário geral do protocolo**

A desnutrição é considerada um dos fatores de risco mais prevalentes para morbidade e mortalidade em crianças abaixo de cinco anos. Estima-se que 20% das crianças nos países em desenvolvimento são desnutridas e déficits nutricionais estão associados com mais da metade das causas de morte a nível mundial. A desnutrição na infância pode levar a déficits físicos e cognitivos e pode induzir déficits similares em gerações futuras com mães desnutridas que dão à luz crianças de baixo peso. Além disso, a desnutrição aumenta a susceptibilidade e a incidência de infecções e está associada com a diminuição da resposta às vacinas. O entendimento das relações complexas e sinérgicas entre infecções entéricas e a desnutrição é fundamental para planejar melhores estratégias de prevenção. Apesar dos grandes avanços terapêuticos, as infecções entéricas causadoras de diarreia permanecem como a causa primária de todas as mortes, estimada em 17-20% (até ~2.1 milhões de mortes) por ano em crianças abaixo de 5 anos de vida. Embora a mortalidade causada por patógenos entéricos tenha reduzido mundialmente nas últimas três décadas, estima-se que a taxa global da morbidade devido à diarreia tenha aumentando no mesmo período.

A origem da desnutrição infantil é complexa com uma variedade de fatores diretos e indiretos relacionados não apenas com a escassez de alimentos, incluindo aleitamento materno insuficiente e precário suporte de suplementos alimentares, mas também estados catabólicos devido às infecções, e a resposta inadequada do hospedeiro e de sua microbiota intestinal ao déficit calórico. Bactérias patogênicas, vírus e parasitas intestinais parecem comprometer o estado nutricional em duas maneiras distintas: 1) Os patógenos entéricos impedem a absorção de nutrientes, reduzindo a capacidade absorptiva do intestino, dessa forma, causando desnutrição protéica-energética e de micronutrientes; 2) As infecções entéricas podem também comprometer a barreira intestinal, resultando na permeabilidade aumentada de patógenos, endotoxinas e outras macromoléculas que podem resultar em estimulação crônica do sistema imune.

Tanto as deficiências de micronutrientes como a estimulação crônica imune podem comprometer o crescimento e aumentar a susceptibilidade de doenças infecciosas. A microbiota intestinal alterada e patógenos podem reduzir a eficácia das vacinas ministradas por via oral.



Enquanto já se conhece que infecções entéricas podem induzir desnutrição, a literatura existente tratando de etiologias de enteropatógenos é limitada devido a amostragens pequenas, sítios geográficos restritos e qualidade dos testes diagnósticos. Apesar de que a maior parte da atenção do tratamento para diarreia aguda ocorreu através da rehidratação, ainda existem poucos estudos da morbidade e mortalidade devido às infecções entéricas crônicas e recorrentes, envolvendo microorganismos e parasitas, e sua contribuição para a morbidade global em crianças abaixo de 5 anos e as consequências e efeitos de longo-prazo na vida adulta.

Também não existem estudos sistemáticos que elucidaram as relações entre crescimento/desenvolvimento e microorganismos específicos, taxas de incidência numa faixa etária particular na infância, ou infecções combinadas. Além disso, não existem estudos demonstrando associações conclusivas desses fatores com indicadores intermediários, como disfunção intestinal, no qual presumivelmente associa infecções entéricas com crescimento e desenvolvimento. Também existe limitação na literatura avaliando a resposta às vacinas associada à infecção mista e o papel da suplementação de micronutrientes em países em desenvolvimento.

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

A pesquisa de campo proposta ajudará a elucidar os fatores de risco para desnutrição e infecções entéricas nessas populações. Também existe a necessidade de expandir os achados para outros locais com presumidas altas taxas de morbidade devido às infecções entéricas, mas com falta de dados específicos.

Os principais objetivos desse projeto são: 1. Estabelecer uma rede coordenada de forma multicêntrica em países em desenvolvimento na Ásia, África e América do Sul; 2. Conduzir estudos epidemiológicos iniciais utilizando protocolos padronizados comuns e éticos, na melhor prática clínica, para aumentar a compreensão de fatores de risco para a desnutrição e doenças entéricas. Esse entendimento aumentará nosso conhecimento de seus efeitos no desenvolvimento e crescimento físico e cognitivo e a susceptibilidade às doenças e sua resposta às intervenções de saúde pública em crianças de países em desenvolvimento. 3. Estabelecer mecanismos que permitam novos projetos financiados que possam ser aplicados no desenvolvimento de políticas e intervenções de saúde pública. 4. Desenvolver ferramentas que permitam extrapolar os achados desses estudos para outras populações em que há quantificação precária da prevalência de doenças.

Estes objetivos serão alcançados através de três principais atividades: 1. Estabelecer uma estrutura administrativa para desenvolver e gerenciar uma rede multicêntrica em países em desenvolvimento para estudar a desnutrição e infecções entéricas; 2. Conduzir um estudo epidemiológico longitudinal prospectivo e de caso-controle para identificar os fatores associados com o risco às infecções entéricas, diarreia crônica, desnutrição, assim como comprometimento da função intestinal, resposta às vacinas e desenvolvimento e coletar dados fenotípicos e ambientais nos centros da pesquisa, permitir a integração de futuros estudos através das colaborações de pesquisa e atividades de pesquisa em parceria, designadas para reduzir a mortalidade infantil; 3. Desenvolver e ilustrar modelos temporais e geoespaciais, utilizando dados de fontes secundárias, assim como desse projeto, para estimar a distribuição e sobrecarga da desnutrição e infecções entéricas, assim como, os benefícios atribuídos às várias intervenções.

A rede multicêntrica proposta aqui irá obter dados e amostras para avaliar a contribuição de cada um desses fatores para desnutrição e suas consequências. Espera-se não apenas encontrar associações a partir destes estudos observacionais, mas produzir novas hipóteses e serem testadas, e também providenciar uma infra-estrutura colaborativa



Cont. Parecer CONEP nº 232/2010

para apoiar financiamentos para descobertas científicas. A partir da estrutura do acordos, espera-se que essa rede forme uma ponte para estudos colaborativos em saúde e desenvolvimento infantil em áreas com menos recursos.

O protocolo propõe a nível internacional um estudo multicêntrico epidemiológico para esclarecer a relação entre as várias infecções intestinais, desnutrição e relação estatural em crianças desde o nascimento até a idade de 24 meses em países em desenvolvimento, incluindo a avaliação de dados geográficos, ambientais, sócio-culturais e diversidade de etiologias. Será conduzido na Ásia, América do Sul e África entre populações bem estabelecidas, utilizando uma agenda de pesquisa com ensaios para função intestinal, microbiologia, antropometria, nutrição, função cognitiva e imunogenicidade de vacinas orais, bem como vigilância em comunidade para doenças infecciosas. O estudo envolve a mistura de comunidades urbanas e rurais, com média e alta prevalência de infecções intestinais e baixa estatura, onde uma intervenção alvo possa ter um impacto significativo na redução de infecção intestinal e desnutrição.

O estudo assume os aspectos de estudo coorte longitudinal e estudo caso-controle. No estudo de coorte longitudinal o desenho do estudo coorte prospectivo e longitudinal permitirá capturar o tempo e a sequência dos episódios de diarreia e as ligações destes com a função intestinal, indicadores nutricionais e medidas de crescimento e desenvolvimento. Após assinatura do TCLE, mulheres grávidas serão seguidas regularmente e a partir do nascimento da criança a mesma será seguida por, no mínimo, 24 meses de idade. Nesse período será avaliada a função intestinal, microbiologia, estado nutricional, clínico e a função cognitiva das crianças. Cada local de estudo irá estudar cerca de 200 crianças no coorte. A vigilância ativa geral e para doenças infecciosas irá incluir visitas semanais (2x) nas casas para seguimento das crianças do estudo. Todos os locais proverão aos participantes, padrões regionais de cuidados para o tratamento de doenças comumente observadas.

O estudo caso controle será realizado no Brasil e Bangladesh. Casos e controles serão identificados em ambas comunidades e clínicas. O desenho do estudo seguirá cerca de 500 casos e 500 controles, pareados por idade e comunidade (em cada local), idade de 6 a 24 meses, seguidos no 1º, 3º, 6º e 12º meses. Cada local deve realizar um número ou frequência mínima de testes e avaliações, incluindo provas funcionais intestinais, medidas antropométricas, dosagens de micronutrientes, imunogenicidade vacinal e avaliação da função cognitiva tabelas fi 33, 34, e 35. Na admissão, as características familiares e o QI materno serão verificados.

#### Local de realização

Trata-se de um projeto internacional multicêntrico, com cooperação estrangeira, que no Brasil será realizado em um só centro. Além do Brasil, participará do estudo: na América do Sul (Brasil e Peru), na África (África do Sul e Tanzânia) e na Ásia (Índia, Bangladesh, Paquistão e Nepal). Foi apresentado documento de aprovação do estudo nos EUA (páginas 07 e 17-22, numeração do CEP). Além disso, consta documento intitulado "Esclarecimento da não participação americana no estudo" (página 11, numeração do CEP) em que o pesquisador responsável informa que a Universidade de Virginia (EUA) será o centro de administração de uma parte do projeto, porém por não ser um país em desenvolvimento, as atividades do protocolo não serão realizadas em tal país. Na "Declaração de uso de destino do material biológico e dados coletados" (página 13, numeração do CEP) o pesquisador responsável informa que os materiais biológicos e dados coletados serão utilizados de acordo com as orientações estabelecidas no presente projeto e que o "possível envio dos mesmos para o exterior seguirá os padrões exigidos pela Resolução CNS 347/2005".

Ao todo é previsto o recrutamento de 1200 sujeitos de pesquisa no estudo, todos no centro em tela. Foi apresentada "Declaração de infra-estrutura das instalações da UPC" (páginas 09-10, numeração do CEP), demonstrando que o centro em tela se encontra adequado para realização do estudo.



Cont. Parecer CONEP nº 232/2010

#### **Apresentação do protocolo**

A Folha de Rosto encontra-se preenchida e assinada.

Na "Declaração de Concordância com o Projeto" (página 12, numeração do CEP) o pesquisador responsável informa que o mesmo fez parte da equipe idealizadora do projeto e que está plenamente de acordo com o mesmo. Consta (p. 08, numeração do CEP) Declaração do Presidente do IPREDE (Instituto de Prevenção à Desnutrição e à Excepcionalidade) autorizando a realização da pesquisa na instituição, bem como Declaração de Infra-Estrutura das instalações da UPC (Unidade de Pesquisa Clínica da Universidade Federal do Ceará), declarando a sua adequação para a realização do estudo. Consta Declarações de Compromisso do pesquisador principal quanto ao cumprimento das Resoluções 196/96 e 340/2004 do CNS.

O orçamento financeiro (página 16, numeração do CEP) informa que o valor total previsto para o estudo em tela é de R\$ 2.551.197,95.

O currículo do pesquisador responsável (páginas 108-132, numeração do CEP) demonstra que o mesmo se encontra apto para condução do estudo.

Foram apresentados dois modelos de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE): para participação no estudo COHORT (páginas 104-106, numeração do CEP) e para participação no estudo CASE-CONTROL (página 107, numeração do CEP), ambos redigidos em linguagem clara e objetiva e em formato conciso.

#### **Considerações sobre a análise das respostas ao Parecer CONEP 029/2010, relativo ao projeto de pesquisa em questão:**

1. Nas páginas 105 e 107 dos TCLEs (numeração do CEP) encontramos a afirmativa: "Armazenaremos saliva e sangue de sua criança, urina fezes e DNA coletados como parte deste estudo em câmeras seguras de armazenamento, tais como congelador, que ficam localizados em salas que podem apenas serem acessados por algum membro de nossa equipe científica. Algumas dessas amostras coletadas poderão ser enviadas a um laboratório na Universidade da Virgínia(EUA) para testes genéticos de riscos ligados à diarreia e desnutrição. Todas as amostras serão codificadas com número, assim não terá nenhuma identificação das informações (isto é: nome e endereço) e serão estocadas com os resultados de seus testes. Se você mudar de idéia sobre manter suas amostras você poderá entrar em contato com a equipe e as suas amostras serão destruídas. Caso você concorde em participar deste estudo suas amostras ficarão estocadas e sob a responsabilidade do grupo de estudo durante os dez anos de realização do estudo". Solicita-se, portanto, esclarecimento sobre a formação de banco de materiais e, em caso afirmativo da constituição do banco, é necessário apresentar os documentos cabíveis requisitados pelas Resoluções CNS 340/2004 (pelos testes genéticos) e 347/2005, incluindo a definição de como se dará a autorização para uso do material armazenado após cinco anos, de acordo com as Resoluções supracitadas.

**Resposta:** "Amostras de urina, fezes, sangue e saliva serão coletadas e armazenadas na Unidade de Pesquisas Clínicas & IBIMED-Instituto de Biomedicina, da Universidade Federal do Ceará, conforme citado no projeto e TCLE. O processamento das amostras se dará nos cinco anos seguintes a sua coleta, período previsto para o estudo. Foi solicitado ao sujeito desta pesquisa no TCLE a autorização para armazenamento de amostra prazo maior do que o período de financiamento porque, devido a quantidade de atividades, corre um risco de não haver tempo suficiente para concluir todo o processo em tempo hábil. Por razão financeira, enviaremos parte do material de sangue e saliva para Universidade de Virgínia aonde teremos parceria para a realização de exames que exijam melhor infra-estrutura com baixo custo. Parte do soro será utilizada para dosagens de nutrientes. Dosagens de glutamina e arginina serão realizadas no Brasil por esta atividade apresentar baixo custo. Parte do sangue também será utilizada para



dosagem de anticorpos de resposta as vacinas de rotina citadas no projeto e a Universidade da Virgínia fará estas dosagens pelo mesmo motivo relativo a custos já que os métodos são de domínio global e o fator decisivo foram custos relativos por amostra. O DNA da saliva será utilizado para estudos de polimorfismos genéticos determinantes de riscos para doenças diarreicas e infecções intestinais específicas bem como desnutrição. Uma lista de genes com este potencial, tais como IL-8, TLR5, outros genes de citocinas pró-inflamatórias e genes de proteínas associadas com funções firmes do epitélio intestinal, tais como claudinas, occludina, ZO1 e 2, e outros de adesão celular. O sequenciamento de DNA será feito no IBIMED e um estudo mais amplo genômico de determinantes genéticos de riscos será realizado em colaboração com a Universidade de Virgínia & UFC (programa este em andamento há mais de 30 anos) incluindo a capacitação de recursos humanos e treinamento Junior, sênior e nível técnico. Todos os estudos realizados pela UPC & IBIMED que necessitam de envio de amostra para o exterior seguem os padrões exigidos pelas normas de pesquisa com seres humanos. Sempre serão contemplados: autorização do sujeito através do TCLE, prazo, classificação, embalagem e documentação. A UPC & IBIMED procura seguir as normas da International Air Transport Association (IATA). Segue em anexo a Norma Interna da UPC & IBIMED que regulamenta o armazenamento de material biológico humano e sua utilização.

**Análise:** Considerando a Resolução CNS 347/2005, no seu item 2.3, que delimita o armazenamento de material biológico humano no âmbito de projetos de pesquisa por período máximo de 05 anos, julgamos que ainda há a necessidade de explicitação por parte do pesquisador responsável de descrever de forma mais clara a definição de como se dará a autorização para uso do material armazenado após cinco anos, de acordo com as Resoluções supracitadas, uma vez que no TCLE encontramos a reafirmação do texto questionado "Caso você concorde em participar deste estudo suas amostras ficarão estocadas e sob a responsabilidade do grupo de estudo durante os dez anos de realização do estudo". No novo TCLE também encontramos a afirmativa: "Também poderemos armazenar suas amostras para outras pesquisas futuras mediante aprovação do CEP local e nacional e um novo consentimento assinado por você". Pendência **parcialmente atendida**.

2. Nas mesmas páginas dos TCLEs (105 e 107, numeração do CEP), encontramos ainda a afirmativa: "Não existem riscos vinculados a este estudo". Solicita-se adequação da mesma, uma vez que, conforme disposto na Resolução CNS 196/96 que preconiza, no seu item V: Considera-se que toda pesquisa envolvendo seres humanos envolve risco. O dano eventual poderá ser imediato ou tardio, comprometendo o indivíduo ou a comunidade. Solicita-se adequação do texto.

**Resposta:** *"Foi adicionado no TCLE o seguinte: Consideramos que toda pesquisa envolvendo seres humanos envolve risco, mesmo que seja mínimo. Algum dano eventual poderá ser imediato ou tardio, comprometendo o indivíduo ou a comunidade. Pode ser que você se sinta desconfortável ao responder o questionário e que você e/ou sua criança pode ter leve dor quando da coleta de sangue".*

**Análise:** Pendência **atendida**.

3. Solicita-se deixar explícito no TCLE a garantia ao sujeito de pesquisa sobre os direitos à indenização, conforme itens V.5, V.6 e V.7 da Resolução CNS 196/96.

**Resposta:** "Foi adicionado ao TCLE o item: Garantia em Caso de Danos, que tem o seguinte texto: Não está previsto indenização ou ressarcimento ao sujeito participante deste estudo, porém o pesquisador responsável assume a responsabilidade de fornecer a assistência integral necessária referente às complicações e danos decorrentes de algum risco previsto".

**Análise:** Pendência **atendida**.



Cont. Parecer CONEP nº 232/2010

4. Solicita-se a inclusão do endereço do CEP no tópico "Quem eu posso contactar para Questões sobre Direitos como Sujeito de Pesquisa?".

Resposta: "Foi adicionado ao TCLE: Endereço Rua Cel. Nunes de Melo, 1127, Rodolfo Teófilo, CEP: 60.430-270".

Análise: Pendência atendida.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, devendo o CEP verificar o cumprimento da questão 01 acima, antes do início do estudo.

Situação: **Protocolo aprovado com recomendação.**

Brasília, 24 de maio de 2010.



**Gyselle Saddi Tannous**  
Coordenadora da CONEP/CNS/MS



## ANEXO C



Universidade Federal do Ceará  
Comitê de Ética em Pesquisa

**Of. N° 135/10**

Fortaleza, 28 de junho de 2010

**Protocolo COMEPE n° 246/ 09**

**Pesquisador responsável:** Aldo Ângelo Moreira Lima

**Deptº./Serviço:** Departamento de Fisiologia e Farmacologia/ UFC

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

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

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

Atenciosamente,

Dr. Fernando A. Frata Bezerra  
Coordenador do Comitê  
de Ética em Pesquisa  
COMEPE/UFC



## ANEXO D

CEF/VC/v5/09FEB10

Case Control Study

Participant ID:        

CHILD ENROLLMENT FORM (CEF)			
If no response for any question, write NA as response.			
#	Question	Code	Response
01	Researcher/Nurse/Fieldworker ID	###	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
02	Today's date	DD/MMM/YY	<input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/>
03	Date of birth	DD/MMM/YY	<input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/>
04	Gender of child	Male=01 Female=02	<input type="text"/> <input type="text"/>
05	Birthweight	00.00-99.99 kg	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/>
06	Current weight of the child	00.00-99.99 kg	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/>
07	Current length of the child	000.0-999.9 cm	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/>
08	Current arm circumference of child	00.0-99.9 cm	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/>
09	Current head circumference	00.0-99.9 cm	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/>
10	Weight for Age Z score of the Child (Use field chart for the calculation) <i>If the child is mildly underweight, STOP.</i>	Severe underweight (<-3) = 01; Moderate underweight (-3.01 to -2.01) = 02; Mild underweight (-2.00 to -1.01) = 03; Normal (>-1) = 04	<input type="text"/> <input type="text"/>
11	Case or control?	Control= 00, Case=01 (Control if WAZ > -1, Case if WAZ < -2)	<input type="text"/> <input type="text"/>
12	How long after childbirth did the mother begin breastfeeding him/her?	00 = within 1 hour; 01 = 1-24 hours; 02 = 1-3 days; 03 = 4+ days later; NA = never breastfed	<input type="text"/> <input type="text"/>
13	Was the child fed the first milk (colostrum)?	Yes = 01, No = 00	<input type="text"/> <input type="text"/>
14	Was there pre-lacteal feeding of the child?	Yes = 01, No = 00	<input type="text"/> <input type="text"/>
15	At what age (in days) did you first give your child plain water, sugar water, honey water, or juice or cow's or goat's milk?	<del>000-100</del> days Not given = 888 Do not know = 999	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
16	Are you still breastfeeding?	Yes = 01, No = 00	<input type="text"/> <input type="text"/>
17	At what age (in months) did you first give your child (semisolid) fruits, vegetables, porridge, or dal?	000-010 months Not given = 888 Do not know = 999	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
18	At what age (in months) did you first give your child rice, wheat, meat, fish, or eggs?	000-010 months Not given = 888 Do not know = 999	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
19	Has he/ she received a vitamin A capsule like this (SHOW CAPSULE) in last 6 months?	Yes = 01, No = 00	<input type="text"/> <input type="text"/>
20	What type of salt is used for cooking today by your household?	Packet (iodized) salt = 01, Unpacked (non-iodized) salt = 02	<input type="text"/> <input type="text"/>



