



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

NATÁLIA KELLY FERNANDES DE MENEZES MELO

Caracterização dos genes relacionados à virulência da infecção por *Escherichia coli* enterotoxigênica em crianças no Semiárido Brasileiro

FORTALEZA

2019

NATÁLIA KELLY FERNANDES DE MENEZES MELO

Caracterização dos genes relacionados à virulência da infecção por *Escherichia coli* enterotoxigênica em crianças no Semiárido Brasileiro

Qualificação 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

2019

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)

M486c Melo, Natalia Kelly Fernandes de Menezes.

Caracterização dos genes relacionados à virulência da infecção por *Escherichia coli* enterotoxigênica em crianças no Semiárido Brasileiro / Natalia Kelly Fernandes de Menezes Melo. – 2019.

71 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

1. *Escherichia coli* enterotoxigênica. 2. Diarreia. 3. Genes de virulência. 4. Crianças. 5. Semiárido brasileiro. I. Título.

CDD 616.9

Natália Kelly Fernandes de Menezes Melo

Caracterização dos genes relacionados à virulência da infecção por *Escherichia coli* enterotoxigênica em crianças no Semiárido Brasileiro

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: 31/10/2019.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Manassés Claudino Fontele
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Profª. Dr^a. Cecília Leite Costa
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu. Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou; Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar; Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar; Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar; Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora; Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar; Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz. Que proveito tem o trabalhador naquilo em que trabalha? Tenho visto o trabalho que Deus deu aos filhos dos homens, para com ele os exercitar. Tudo fez formoso em seu tempo; também pôs o mundo no coração do homem, sem que este possa descobrir a obra que Deus fez desde o princípio até ao fim. Já tenho entendido que não há coisa melhor para eles do que alegrar-se e fazer bem na sua vida; E também que todo o homem coma e beba, e goze do bem de todo o seu trabalho; isto é um dom de Deus.

Eclesiastes 3:1-13

AGRADECIMENTOS

Agradeço a primeiramente a Deus, que por mais que eu faça isso todos os dias ainda assim não se torna suficiente, diante de todo cuidado dEle por mim, por todo o amor, toda providência, todas as bênçãos na minha vida, na minha família e no meu trabalho.

Aos meus pais, por terem me dado a vida e a força de vontade de lutar, em especial minha mãe, que pelo exemplo de força e determinação me deu coragem para nunca desistir dos meus sonhos, obrigada minha querida, pelas suas renúncias em favor de oferecer-me o melhor de suas possibilidades.

Aos meus filhos, que embora pequenos, não entendem a importância e a motivação que são em minha vida. Ao pai deles que durante uma parte da jornada esteve presente e me passou segurança pra seguir.

Ao meu irmão, por estar ao meu lado, me apoiando em todas decisões se assim for para minha felicidade.

À minha “anja” Aldalia, que no cotidiano, me dá suporte e apoio para que eu possa desenvolver meus trabalhos.

À minha família, pela contribuição para essa conquista.

Agradeço ao meu orientador, o Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima. Muito obrigada pela oportunidade me dada, pelo compartilhamento de tantos ensinamentos e pelo exemplo de pesquisador e humanidade.

Agradeço de forma especial aos que contribuíram diretamente no desenvolvimento e finalização do meu trabalho, são eles: Rafaela Pankov, Pedro Henrique Quintela, Herlice Veras, Marília Maia, Ana Karolina Santos, Samilly Ribeiro e Rafhaella Della Guardia. Obrigada pela parceria, correções, discussões e paciência. Vocês serão sempre especiais na minha vida. Agradeço aos meus colegas de laboratório LDI / LTM, em especial Cleber Ferreira, e a toda equipe do INCT, UPC-IBIMED pelo compartilhamento de conhecimentos, e por terem ajudado no meu crescimento científico e pessoal.

À toda equipe RECODISA, que realizou o trabalho fora do laboratório seja no treinamento dos participantes, na coleta das amostras e dados, e principalmente, aos responsáveis e crianças participantes do estudo, por terem contribuído no avanço dessa pesquisa científica

Agradeço a coordenação e secretaria da PPGMM, pela eficiência e por sempre estarem disponíveis no esclarecimento de qualquer dúvida ou questionamento.

Aos meus amigos, por acreditarem, pelo incentivo, orações, estímulos e amor. Em especial ao meu amigo leal, Pedro Paulo Martins, que esteve ao meu lado suprindo minhas faltas na prefeitura e me dando suporte para finalizar essa caminhada, e a minha grande amiga, Michele Custódio, que me ensinou tanto, com tanto amor e paciência.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização de mais essa etapa.

À todos vocês, MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Introdução: As infecções por *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) são importantes causadoras de diarreia em crianças de países em desenvolvimento, nesse sentido se faz necessário um maior entendimento sobre a sua patobiologia, fatores de virulência e seu impacto clínico. **Objetivo:** O presente estudo tem como objetivo caracterizar genes relacionados à virulência da infecção por ETEC em crianças com e sem diarreia do semiárido brasileiro. **Material e Métodos:** Realizou-se um estudo caso-controle, em seis cidades do semiárido brasileiro, que analisou dados/amostras de 113 crianças de 2 a 36 meses infectados por ETEC com e sem diarreia. Entre a população estudada, de 56 crianças foram coletadas amostra de fezes diarreicas (casos) e 57 crianças forneceram amostras de fezes sem diarreia (controles). O diagnóstico de ETEC foi realizado pela técnica Luminex (Bioplex 200), com base nos genes *estA* (toxina termoestável-ST) e *eltB* (toxina termo lábil-LT). As amostras identificadas positivas para ETEC foram analisadas por reações cadeia da polimerase (PCR) para sete genes de virulência. **Resultados:** Entre as amostras coletadas, se deu a maior prevalência de ETEC produtora de *eltB* do que ETEC produtora *estA* (70,8% - 80/113 vs 10,6% - 12/113). A faixa etária de 2 a 3 anos de idade foi associada aos controles, ausência de diarreia, ($P = 0,001$), enquanto a prática de amamentação não exclusiva foi mais prevalente entre casos, crianças com diarreia ($P = 0,004$). As crianças com infecções por ETEC-LT apresentaram valores menores de WAZ (escore z peso por idade) em relação a crianças com infecções por ETEC-ST ($P = 0,02$), quando analisadas em crianças controle. As amostras de ETEC-ST exclusivas não apresentaram os genes de virulência pesquisados, as caracterizações ocorreram nas amostras ST/LT ou LT exclusivas. Os genes de virulência com maior frequência detectados foram *eata* (31,8% - 36/113) e *csuA* (24,8% - 28/113), e a maior prevalência de coinfeção foi com *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e enteroagregativa (EAEC).

Palavras-chave: *Escherichia coli* enterotoxigênica. Diarreia. Genes de virulência. Crianças. Semiárido brasileiro.

ABSTRACT

Introduction: Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infections are important causes of diarrhea in children in developing countries. Therefore, a greater understanding of its pathobiology, virulence factors and clinical impact is necessary. **Objective:** The present study aims to characterize genes related to the virulence of ETEC infection in children with and without diarrhea in the Brazilian semiarid. **Material and Methods:** A case-control study was conducted in six cities of the Brazilian semiarid region, which analyzed data / samples from 113 children aged 2 to 36 months infected with and without diarrhea. The diagnosis of ETEC was made by the Luminex technique (Bioplex 200), based on the estA (thermostable toxin-ST) and eltB (thermo labile toxin-LT) genes. The identified ETEC positive samples were analyzed by polymerase chain reactions (PCR) for seven virulence genes. **Results:** Among the study population, 56 children were collected from diarrheal stool samples (cases) and 57 children provided stool samples without diarrhea (controls), with a higher prevalence of eltB-producing ETEC than estA-producing ETEC (70.8% - 80 / 113 vs 10.6% - 12/113). The age group from 2 to 3 years old was associated with controls, absence of diarrhea, (P = 0.001), while non-exclusive breastfeeding was more prevalent among cases, children with diarrhea (P = 0.004). Children with ETEC-LT infections had lower WAZ values (weight-for-age z score) compared to children with ETEC-ST infections (P = 0.02) when analyzed in control children. Exclusive ETEC-ST samples did not show the virulence genes researched, characterizations occurred in exclusive ST / LT or LT samples. The most frequently detected virulence genes were eatA (31.8% - 36/113) and csuA (24.8% - 28/113), and the highest prevalence of co-infection was enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and enteroaggregative. (EAEC).

Keywords: *Enterotoxigenic Escherichia coli. Diarrhea. Virulence genes. Children. Semiarid.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ciclo vicioso Diarreia x Desnutrição: Relações causais e consequências para a sociedade	17
Figura 2 -	Micrografia de <i>Escherichia coli</i>	19
Figura 3 -	Mecanismos de ação das toxinas LT e STa da ETEC	24
Figura 4 -	Região do semiárido brasileiro.	31
Figura 5 -	Fluxograma do estudo.	37
Figura 6 -	Efeito de infecções por <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica produtora de toxina termolábil (ETEC-LT) e ETEC produtora de toxina termoestável (ETEC-ST) nos escores antropométricos de crianças sem diarreia (controle) do semiárido brasileiro.	45
Figura 7 -	Concentração do marcador inflamatório mieloperoxidase (MPO).	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Genes de diagnóstico relacionados a <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica, iniciadores utilizados, tamanhos dos produtos e suas funções.	38
Tabela 2 -	Distribuição de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica em relação ao grupo casos e controle em crianças do semiárido brasileiro.	40
Tabela 3 -	Caracterização da população infantil positiva para <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica do semiárido brasileiro.	41
Tabela 4 -	Sintomatologia clínicas relatada pelos responsáveis das crianças positivas para <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica.	42
Tabela 5 -	Distribuição da população de estudo quanto à ocorrência de diarreia nas últimas 24 horas.	43
Tabela 6 -	Medidas antropométricos das crianças positivas para <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica.	44
Tabela 7 -	Distribuição de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica por cidades do estudo em relação ao grupo caso e controle.	46
Tabela 8 -	Genes de virulência de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica em relação ao grupo caso e controle.	47
Tabela 9 -	Frequência de genes de virulência em amostras positivas para ETEC-LT de crianças com e sem diarreia do semiárido brasileiro.	48
Tabela 10 -	Frequência de genes de virulência em amostras positivas para ETEC-ST/LT de crianças com e sem diarreia do semiárido brasileiro.	49
Tabela 11 -	Relação de copatogenicidade entre as doenças causadoras de diarreia.	50

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Prime antisenso
A/E	Lesão intestinal denominada <i>attaching and effacing</i>
AA	Padrão de aderência agregativa
AD	Padrão de aderência difusa
CE	Ceará
COMEPE/UFC	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente
DEC	<i>E. coli</i> diarreio gênicas
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EAF	EPEC <i>adherence factor</i>
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> extra-intestinal
FC	Fator de colonização
FV	Fator de virulência
FVNC	Fator de virulência não clássico
HAZ	Escore Z altura-por-idade - do inglês, “ <i>heighth-for-age</i> ”
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LT	Termo lábil
MPO	Mieloperoxidase
S	Primer senso
ST	Termo estável
PCR	Do inglês “Polymerase Chain Reaction” (Reação em cadeia da polimerase)
WAZ	Escore Z peso-por-idade – do inglês, “ <i>weigth-for-age</i> ”
WHZ	Escore Z peso-por-altura – do inglês, “ <i>weigth-for-heighth</i> ”
<i>eatA</i>	Gene codificador auto transportador de toxina secretada
<i>CfaB</i>	Gene codificador subunidade fimbrial

<i>Tia</i>	Gene codificador determinante de invasão
<i>FaeG</i>	Gene codificador subunidade fimbrial maior
<i>EtpA</i>	Gene codificador adesina fimbrial
<i>csua1</i>	Gene codificador de adesão de ETEC às células epiteliais intestinais humanas
<i>CsoA</i>	Gene codificador subunidade fimbrial
<i>estA</i>	Gene codificador de toxina termoestável (ST)
<i>eltB</i>	Gene codificador de toxina termo lábil (LT)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO -----	12
2	REVISÃO DE LITERATURA -----	14
2.1	Diarreias infecciosas -----	14
2.2	<i>Escherichia coli</i> -----	18
2.3	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC) -----	20
2.4	Patogênese da infecção por ETEC -----	21
2.5	Fatores de virulência da ETEC -----	21
2.5.1	Toxinas -----	21
2.5.2	Fatores de colonização da ETEC (fatores de virulência clássicos) -----	27
2.6	Diagnóstico da infecção por ETEC-----	26
2.7	Epidemiologia de infecções por ETEC -----	27
3	OBJETIVOS -----	30
3.1	Geral -----	30
3.2	Específicos -----	30
4	MATERIAL E MÉTODOS -----	31
4.1	Aspectos éticos -----	31
4.2	Descrição do estudo-----	32
4.2.1	<i>Local do estudo</i> -----	32
4.2.2	<i>Crítérios de Inclusão e Exclusão da população do Estudo</i> -----	33
4.3	Extração de DNA Fecal-----	34
4.3	Medidas Antropométricas -----	34

4.4	Coleta das amostras-----	34
4.5	Processamento das amostras fecais-----	34
4.6	Diagnóstico molecular de ETEC-----	35
4.7	Pesquisa de genes relacionados à virulência-----	37
4.8	Determinação da Concentração da Mieloperoxidase (MPO)-----	39
4.9	Análise estatística dos dados-----	39
5	RESULTADOS -----	40
5.1	Prevalência das infecções por ETEC e caracterização da população-----	40
5.2	Dados Clínicos-----	42
5.3	Dados Antropométricos-----	43
5.4	Distribuição Geográfica dos Isolados de ETEC-----	46
5.5	Inflamação Intestinal-----	46
5.6	Pesquisa dos Genes de Virulência De ETEC-----	47
5.7	Coinfecções-----	49
6	DISCUSSÃO -----	51
7	CONCLUSÃO -----	56
	REFERÊNCIAS -----	57
	ANEXOS -----	65
	ANEXO A – Aprovação Comitê de Ética-----	66
	ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)-----	67
	ANEXO C – Checklist de elegibilidade etiologia de diarreia do semiárido-----	68

1 INTRODUÇÃO

A diarreia é um problema de saúde pública considerado uma das causas principais de morbidade e mortalidade no mundo (FITZWATER et al, 2019). As características patológicas da diarreia podem ser classificadas quanto aos parâmetros de duração (aguda ou crônica), órgão afetado (intestino delgado, grosso ou ambos), descrição clínica (frequência, volume, consistência, presença de sangue), origem e mecanismo patofisiológico primário (BINDER, 1990).

A transmissão de diarreia pode se dá pela ingestão de alimentos, água ou mesmo pelo contato direto com agentes infecciosos (HENRY; RAHIN, 2019). Existem diferentes fatores que causam a diarreia, mas o mais comum é a infecção intestinal, ou gastroenterite, que podem ser causadas por microrganismos como vírus, bactérias e parasitas. Dentro dessa perspectiva, é comum infecções por rotavírus, *Escherichia coli* e *Giardia lamblia* (MORAES; CASTRO, 2012). As causas mais comuns de diarreia são infecções por rotavírus e *E. coli* (WHO, 2013).

As diarreias causadas pela bactéria *E. coli* podem ter variações de cepas que originam patologias que podem ser classificados entre diarreio gênicas e extraintestinais. Os principais tipos de *E. coli* patogênicas são *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EAEC), *E. coli* difusamente aderida (DAEC), enteroagregativa (EAEC), *E. coli* *Shigella*/enteroinvasiva (EIEC), uropatogênica (UPEC) e meningite neonatal (NMEC) (CROXEN, 2013).

Existe uma grande variabilidade entre os tipos de *E. coli*, as quais partem de formas comensais que estão distribuídas na microbiota saudável do hospedeiro. Algumas patovariantes que são adaptadas e capazes de produzir toxinas que desencadeiam o desenvolvimento de várias doenças (SOUSA, 2006). As diferenças entre as variantes patogênicas e comensais se dão pela diferença genética entre elas, bactérias patogênicas apresentam genes que codificam características patogênicas, como é o caso da virulência, e esses aspectos geralmente são codificados por genes que estão presentes nos plasmídeos das bactérias (QADRI et al, 2005).

Dentre as variantes patogênicas, as bactérias *E. coli* do tipo ETEC produzem enterotoxinas causadoras de danos na mucosa, as quais provocam efeitos citotóxicos que desregulam processos de secreção de água e eletrólitos. A ETEC é capaz de causar desde

uma diarreia simples até disenterias inflamatórias mais severas (CROXEN; FINLEY,2010).

A transmissão de ETEC está normalmente associada à ingestão de água acondicionada ou/e fornecidas em más condições (HILL; BEECHING, 2010), mas também pode ser associada à contaminação da comida em surtos de gastroenterites alimentares, como é o caso do surto que acometeu alguns países da Europa e Ásia em 2012 (MACDONALD et al, 2014). Além disso, ETEC é tida como principal causadora da diarreia dos viajantes (CROXEN et al, 2013).

As bactérias são disseminadas no organismo e ao chegarem no intestino delgado estabelecem uma infecção. O processo ocorre através da aderência das bactérias que começam a colonizar a superfície do intestino delgado e após a colonização produzem enterotoxinas (Termoestável – ST ou/e Termolábil - LT) que afetam as células epiteliais da área (NATARO; KAPER, 1998).

A infecção por ETEC é geralmente sugerida pelas características clínicas de diarreia aquosa e presença de febre, mas a confirmação só é dada com a presença de *E. coli* na cultura das fezes diarreicas. Em casos de surtos, é necessário fazer testes de identificação de virulência, sorotipagem, identificação dos fatores de colonização, demonstração da produção das enterotoxinas (LT ou ST) e identificação dos genes que codificam esses fatores de virulência (EVANS; EVANS 1996).

A identificação de ETEC pode ser realizada através do diagnóstico molecular, que usa técnicas como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que apresenta uma alta especificidade e sensibilidade para a identificação rápida e diferencial de genes relacionados a ETEC (PLATTS-MILLS et al, 2018).

Os altos índices de doenças diarreicas causadas por *E. coli* demonstram a necessidade de estudos que esclareçam os mecanismos associados a patologia da infecção, genéticos e epidemiológicos envolvidos no desencadeamento da doença, principalmente em áreas endêmicas. No presente estudo, foram avaliadas amostras de crianças 2 a 36 meses com e sem diarreia, em seis cidades no semiárido brasileiro, buscando identificar as características genéticas associadas a ETEC, bem como o perfil socioeconômico das famílias das crianças pesquisadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diarreias infecciosas

As diarreias infecciosas configuram-se como uma síndrome intestinal caracterizada, frequentemente, pela ruptura da barreira intestinal a partir da ação de patógenos, sejam estes, bactérias, vírus ou protozoários. Essa síndrome é acompanhada de náusea, vômito, dores abdominais e diarreia. A transmissão ocorre, normalmente, pela ingestão de água ou alimentos contaminados, do contato pessoa a pessoa como resultado da falta de higiene e saneamento básico precários (MOTTA et al, 2002).

Definições de diarreia incluem o aumento do volume e frequência das defecações acompanhada de alteração da consistência das fezes. A diarreia caracteriza-se quando há uma frequência de evacuações de 3 ou mais por dia. Um episódio de diarreia é definido como uma sequência de dias com diarreia, intervalado por no mínimo 48 horas. Quanto a duração, a diarreia pode ser classificada em: diarreia aguda, quando os sintomas duram até 7 dias; diarreia prolongada quando a duração é entre 7 e 13 dias; diarreia persistente quando a duração é de mais de 13 dias; diarreia crônica quando os sintomas permanecem por mais de 30 dias de duração (MOORE et al, 2010; DUPONT, 2016).

A diarreia aguda tem como causas infecções por vírus, bactérias ou parasitas, mas também pode ser relacionada a algum tipo de alergia, indução de droga ou infecções extra - intestinais. As diarreias crônicas podem ser provocadas por causas dietéticas, desordens pancreáticas, erros inatos no metabolismo, deficiências enzimáticas, defeitos no transporte etc. (FAN et al, 2009; RIDDLE et al, 2016).

A patofisiologia da diarreia pode ser classificada em secretória e osmótica. Na primeira, a principal causa associada são infecções bacterianas no intestino que promovem a produção de enterotoxinas ou citocinas, contribuindo para a ativação da secreção. Enquanto na segunda, a causa é relacionada à presença de solutos não absorvíveis no trato gastrointestinal ou mesmo a má absorção de nutrientes solúveis em água (SHEIKH et al, 2018).

As doenças diarreicas constituem um grande problema de saúde pública mundial, sendo uma das maiores causas de morbidade e mortalidade infantil, representando a segunda maior causa de morte em crianças abaixo de cinco anos de idade (THIAM et al, 2017). Cerca de um terço das crianças que vivem em países em desenvolvimento, onde as condições higiênico-sanitárias desfavoráveis facilitam a disseminação de agentes

patogênicos, são acometidas por infecções entéricas com ou sem eventos diarreicos (HODGES; GILL, 2010; GUERRANT et al, 2012).

Um estudo epidemiológico sobre diarreia infantil no mundo mostrou que, em 2010, estimou-se que bilhões de episódios de diarreia ocorreram em crianças abaixo de cinco anos de idade e, em 2011, cerca de 700 mil episódios diarreicos culminaram em morte, sendo mais de 70% dessas mortes em crianças abaixo de dois anos de idade (WALKER et al, 2013).

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

Estudos realizados na cidade de Fortaleza, Ceará demonstraram que existe um risco maior de diarreia persistente e diarreia prolongada, e foi verificado que está relacionado a precariedade das condições sanitárias, desmame precoce e colonização intestinal (LIMA et al, 2000). Esse quadro fisiopatológico pode acarretar no desenvolvimento de quadros de desnutrição, gerando impactos negativos sobre a população acometida (MOORE et al, 2010).

A diarreia persistente está relacionada à altas taxas de morbidade e mortalidade em pessoas de baixo nível socioeconômico em países em desenvolvimento (FEWTRELL et al, 2019). No Brasil, entre 2000 e 2011, foram notificados 33 milhões de casos de diarreia aguda, dentre os quais a maioria da população acometida era menor que 1 ano de idade. Os dados epidemiológicos demonstram que houve diminuição nos casos e óbitos decorrente da doença, o que se acredita ser um reflexo das ações de intervenção nas áreas da saúde e saneamento básico (BRASIL, 2015).

A diarreia está relacionada a morbidade e mortalidade dentro de populações mais economicamente desfavorecidas, por atuar na promoção do desenvolvimento de lesões na mucosa entérica, que conseqüentemente, provocam a diminuição da absorção de

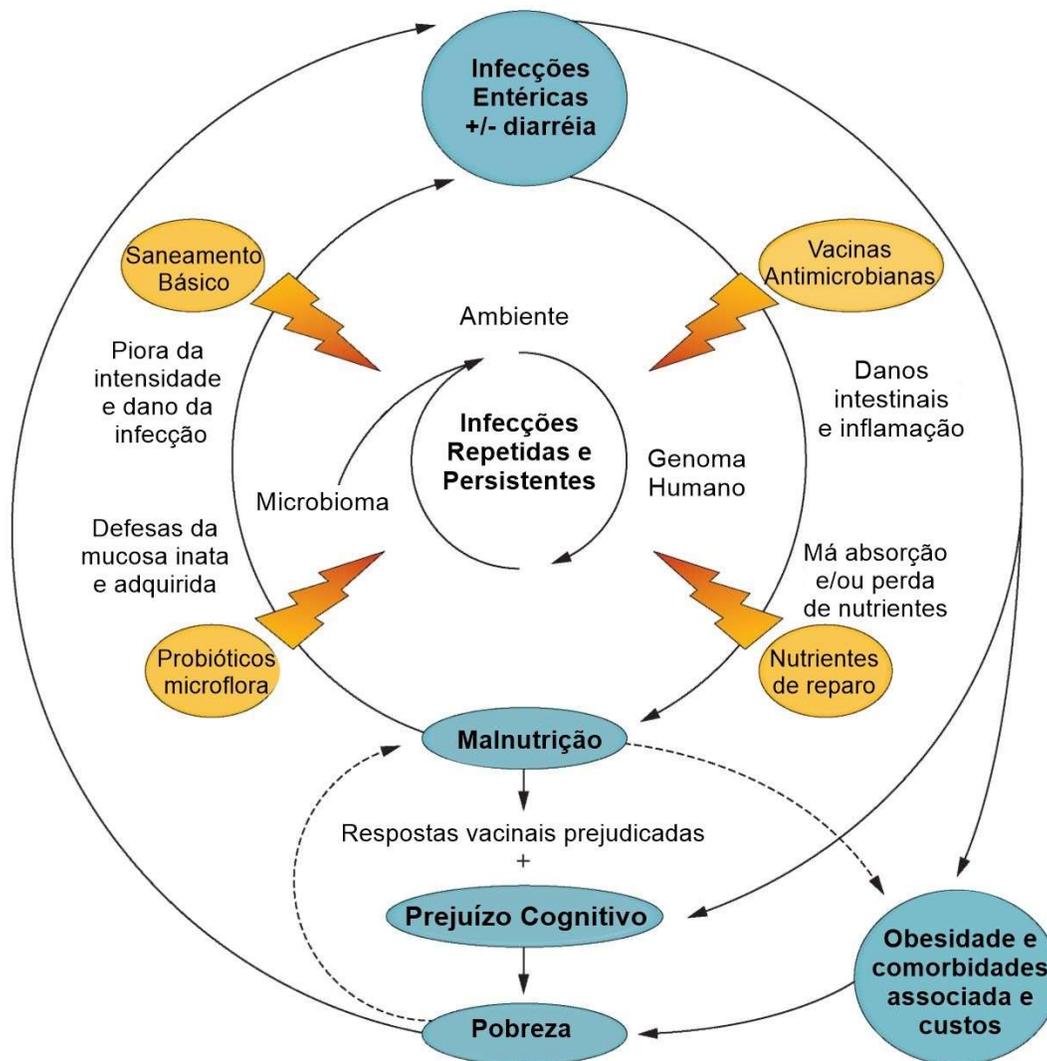
nutrientes, insuficiência de crescimento e atraso cognitivo (MOORE et al, 2010; KEUSCH et al, 2016).

Entre 1992 e 2000 foram relatados nos dados epidemiológicos de mortalidade de crianças com idade menor que 5 anos que aproximadamente 10 milhões por ano, 18% desses casos é decorrente da diarreia, e mais de 53% dos casos foram associados com a má nutrição (KOSEK, BERN, GUERRANT, 2003).

As infecções entéricas persistentes tendem a prejudicar a capacidade absorptiva do indivíduo, o que leva a quadros de desnutrição, que por sua vez é um fator que causa o comprometimento dos mecanismos de defesa imunológica e contribui para o desenvolvimento de diarreias infecciosas. Essa situação desencadeia um ciclo vicioso (Figura 1) de diarreia e desnutrição (COUTINHO et al, 2008; ROCHE et al, 2010).

Dentre os agentes patogênicos causadores de diarreia em crianças estão *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae*, *Clostridium difficile*, *Entamoeba histolytica*, *Cyclospora* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., adenovírus, rotavírus, norovírus entre outros (LIMA et al, 2000; GUERRANT et al, 2001; DHAMA et al, 2008; MOORE et al, 2010; SOLI et al, 2014). A infecção pela bactéria *Escherichia coli*, configura a principal forma causadora de diarreias (PENNINGTON, 2010).

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



Os ciclos viciosos de enteropatia ambiental. As infecções entéricas, especialmente nos primeiros 2 a 3 anos de vida, com ou sem diarreia evidente, podem predispor um indivíduo à desnutrição e ao crescimento atrofiado por meio de múltiplos mecanismos. O nanismo aos 2 anos de idade, por sua vez, está associada ao comprometimento do desenvolvimento cognitivo, que se estende até a infância e até na idade adulta e na produtividade do adulto.

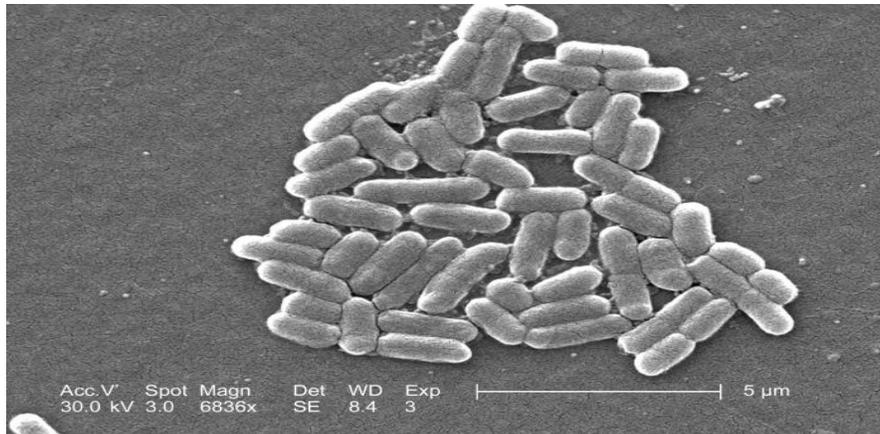
Fonte: Adaptado de GUERRANT et. al., 2012.

2.2 *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* é uma bactéria encontrada comumente no trato intestinal de seres humanos. A robustez, versatilidade e facilidades no manuseio fizeram da *E. coli*, um dos organismos modelos mais importante para o desenvolvimento de pesquisas científicas. Suas características bioquímicas e genéticas são amplamente elucidadas, o que faz a *E. coli* ser o organismo mais conhecido da microbiologia, e acreditasse que exista um grande potencial ainda inexplorado para pesquisa dessa bactéria (BLOUNT, 2015).

E. coli (Figura 2), é uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae, com uma estrutura bacilar e Gram negativa, as quais se caracterizam por um perfil bioquímico positivo para produção de indol, oxidase negativa, não esporulante, anaeróbio facultativo, podendo apresentar cepas móveis ou imóveis, que colonizam o trato intestinal de animais e de humanos, permanecendo como comensal durante toda a vida do indivíduo. 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 de lactose (CROXEN et al, 2013).

Figura 2 - Micrografia de *Eschechiria coli*.



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

Fonte: CARR, 2006.

O gênero *Escherichia*, é uma homenagem ao pediatra alemão Theodore Escherich que descreveu pela primeira vez esta bactéria em 1885, e a denominou de *Bacterium coli commune*, sendo posteriormente renomeada *Escherichia coli*. A espécie *coli* faz referência ao habitat natural desse microrganismo, ou seja, proveniente do cólon

(INGERSON-MAHAD; REID, 2011), indicando a ocorrência universal desta bactéria no intestino de indivíduos saudáveis (NATARO; KAPER, 1998; RODRIGUEZ, 2002; VIDAL et al, 2007).

A maioria dos animais têm em seu trato intestinal colonizado por bactérias *E. coli* nas primeiras horas e dias de vida, através da ingestão de comida e água. A bactéria pode se aderir ao muco que circunda o intestino grosso e normalmente coloniza o estômago em cerca de 40 horas após o nascimento. A *E. coli* é um importante membro da microbiota intestinal humana, que é na maioria das vezes inofensiva ao organismo. Entretanto, variações das cepas podem ser altamente versáteis e frequentemente patogênicas e causar diversas doenças (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A *E. coli* é o principal agente etiológico causador de diarreia entre os casos moderados a severos em crianças. Atualmente muito se sabe a respeito das características microbiológicas, patogênicas, ecológicas e interações com o hospedeiro, facilitando a compreensão do papel da *E. coli* nas ocorrências de diarreia dentro do cenário de saúde mundial (BLOUNT, 2015).

As cepas de *E. coli* patogênicas geralmente limitam-se a colonização da superfície mucosa ou podem ser disseminadas para outras partes do corpo podendo causar danos como infecções no trato urinário, sepse/meningite e infecções gastrointestinais. A infecção por *E. coli* no trato gastrointestinal causa maior suscetibilidade a diarreias (NATARO; KAPER, 1998; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

Existem categorias de *E. coli* que são patogênicas e podem desencadear o desenvolvimento de uma vasta gama de doenças. Essas bactérias patogênicas são cepas específicas e bem adaptadas que podem ser classificadas como diarreio gênicas, com os subtipos *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* difusa aderente (DAEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC); e os subtipos extra – intestinais (ExPEC) são *E. coli* uropatogênica (UPEC) e *E. coli* meningite neonatal (NMEC) (SOUSA, 2006; CROXEN et al, 2013).

O tamanho dos genomas varia entre a *E. coli* comensal e as variantes patogênicas, existindo diferenças de até milhões de pares de base, onde essa quantidade extra de genes pode corresponder a fatores como virulência e aptidão patogênica. A habilidade patogênica da *E. coli* se dá pela grande flexibilidade de ganho e perda de material genético. Essas alterações podem ocorrer através da transferência do DNA entre os hospedeiros e procariotos por elementos de transposição (transposons), inserção de

sequencias, bacteriófagos e plasmídeos. A maioria dos fatores relacionados a virulência da cepa de *E. coli* são derivadas das alterações criadas por elementos genéticos móveis (FROST et al, 2005; QADRI et al, 2005).

2.3 *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)

A *E. coli* como já mencionado é um membro comum da flora intestinal, contanto que essas bactérias não adquiram elementos genéticos codificantes de fatores de virulência, eles permanecem bactérias comensais benéficas. Todavia, as cepas que adquirem bacteriófagos ou DNA plasmídial codificam enterotoxinas ou fatores de invasão tornam-se virulentas e são capazes de causar desde uma diarreia simples e aquosa até mesmo uma disenteria inflamatória (CROXEN et al, 2010).

Um dos patotipos de *E. coli* que produz enterotoxinas é conhecido por *E. coli* enterotoxigênica (ETEC). Existem numerosos tipos de enterotoxinas. Algumas dessas toxinas são citotóxicas e causam danos à mucosa celular, incluindo apenas a secreção de água e eletrólitos (EVANS, 1996).

A ETEC é uma das bactéria mais importante por causar diarreia ou doenças como a cólera em todos os grupos de idade em áreas com condições precárias no saneamento básico e fornecimento inadequado de água limpa (HILL; BEECHING, 2010). A maioria dos casos de diarreia de viajantes são causadas por *E. coli*, principalmente pelo patotipo ETEC (WIEDERMANN; KOLLARITSCH, 2006). Também foi associada como causa de surtos de gastroenterite de origem alimentar na Noruega, EUA, Dinamarca, Coreia do Sul e Japão (MACDONALD et al, 2014).

Diarreias causadas por ETEC são caracterizadas por serem rápidas, aquosas, sem quantidade considerável de sangue, e podem ser acompanhadas pelo aparecimento de quadros de febre baixa. Outros sintomas comuns são a dor abdominal, mal-estar, náuseas e vômito. Esses sintomas e a diarreia tendem a acabar em um período de 1 a 3 dias (EVANS, 1996).

Doenças diarreicas são a segunda causa mais comum de mortes de crianças de até 5 anos, perdendo apenas para as mortes por infecções respiratórias (GUERRANT et al, 2018). As diarreias mediadas por ETEC tem sido atribuída a secreção combinada ou individual de enterotoxinas termo lábeis (LT) ou enterotoxinas termoestáveis (ST), implicando na manifestação das características envolvidas no desenvolvimento de

diarreia secretória através da indução da secreção de fluidos e inibição da absorção no intestino (CROXEN; FINLEY, 2006).

LT é uma toxina polimórfica que é dividida em duas variantes principais LTI e LTII, as quais são expressas por diversas linhagens de ETEC mundialmente distribuídas. A toxina ST é subdividida em 2 subgrupos, STh e STp, os quais são pequenas unidades peptídicas não-imunogênicas contendo de 19 a 18 amino ácidos (JOFFRÉ; 2016).

2.4 Patogênese da infecção por ETEC

A doença diarreica por ETEC é causada pela proliferação bacteriana de um número de 10^9 a 10^{10} .

Para poder colonizar a superfície do epitélio intestinal, as bactérias devem se prender primeiro onde as adesinas bacterianas entram em ação e atuam nos receptores cognatos presentes no epitélio hospedeiro. Isso ajuda as bactérias a resistir ao peristaltismo intestinal. No ETEC, a adesão ao intestino delgado é mediada por fatores de colonização (FCs), um importante determinante da virulência para iniciar a patogênese. A colonização intestinal é seguida pela liberação de enterotoxinas bem caracterizadas, lábeis ao calor (LT) e / ou estáveis ao calor (ST) (GAASTRA; SVENNERHOLM; 1996) que desencadeiam diarreia secretora (BHAKAT et al, 2019).

2.5 Fatores de virulência da ETEC

Os fatores de colonização (FCs), juntamente com as toxinas (LT e ST), são chamados de fatores de virulência clássicos (BHAKAT et al, 2019). Fatores adicionais relacionados à virulência foram identificados (DEL CANTO et al, 2011) e são denominados fatores de virulência 'não clássicos' (FVNCs).

2.5.1 Toxinas

As cepas de ETEC colonizam a superfície da mucosa do intestino delgado e produzem enterotoxinas, que proporcionam a estrutura necessária para desencadear um estado secretório líquido (SEARS.; KAPER, 1996). Essa secreção é estimulada pela ação dessas enterotoxinas que induzem a secreção de cloreto, sódio e água no lúmen (BOLICK et al, 2018). O gene *estA* codifica a enterotoxina estável ao calor (ST), enquanto o gene *eltB* codifica a enterotoxina termo lábil (LT).

Após a fixação e colonização da bactéria, é iniciada a produção de enterotoxinas (LT e ST) e estas afetam a área das células epiteliais. Essas toxinas são o principal fator de virulência da infecção por ETEC, podendo causar a doença estando associadas ou cada uma separadamente. Os fatores de adesão e colonização também são fatores de virulência que devem ser considerados (MIRHOSEINI; AMANI; NAZARIAN, 2018).

A toxina termo lábil (LT) é uma toxina oligomérica com características de função e estrutura similar a enterotoxina expressa pela bactéria *Vibrio cholerae*, diferindo em características como processamento e secreção da toxina e respostas do linfócito T helper. LT é produzida pela *E. coli* em dois subtipos, I e II, os quais possuem características genéticas, bioquímicas e imunológicas diferenciadas entre si. LT-I é associada com a doença tanto em animais quanto em humanos, enquanto que LT-II é associada apenas a cepas encontradas em animais (CONNELL, 2007).

LT-I é um heterohexâmero de 84 kDa de tamanho composto por uma subunidade pentâmera B e uma A. O efeito dessa enterotoxina se dá pela indução de efeitos tóxicos ao gangliosídeo GM1 das células hospedeiras causando endocitose da toxina. Uma subunidade passa pela membrana celular e reage com o fator ADP de ribosinalização, evitando a atividade GTPase da proteína $GS\alpha$ e leva a continuidade e aumento da atividade da enzima adenilase ciclase e formação de cAMP (Adenosina monofosfato cíclico). Por sua vez, o aumento de cAMP causa a ativação da proteína quinase dependente de cAMP. Essa enzima também causa a fosforilação e estimulação de canais de cloro. Essas mudanças causam secreção de eletrólitos e água no intestino levando à diarreia (BINDER, 1990; NATARO; KAPER, 1998; JAFARI; ASLANI; BOUZARI, 2012).

LT-II não gera acumulação de fluidos no intestino e também não se liga ao GM1. A ação dessa toxina se dá pelo aumento de cAMP intracelular por mecanismos similares ao da toxicidade de LT-I, mas nesse caso, LT-II usa o gangliosídeo GD1, receptor de membrana, no lugar de GM1. A associação de LT-II com humanos é rara e pouco se sabe a respeito dos seus mecanismos. Comumente, as informações genéticas relacionadas a toxina estão no cromossomo bacteriano e LT-II possui dois antígenos variantes LT-IIa e LT-IIb (NATARO; KAPER, 1998; CONNELL, 2007; MIRHOSEINI; AMANI; NAZARIAN, 2018).

A toxina termoestável (ST) é uma toxina codificada por um gene localizado em um plasmídeo, que é relacionado a um transposon chamado de *estA*. Existem duas classes não relacionadas de ST as quais são diferentes em estrutura e mecanismos de ação, e os

genes que codificam ambas as classes são encontradas predominantemente em plasmídeos, mas também existem alguns tipos que são encontrados em transposons (LIMA; FONTENELES, 2014).

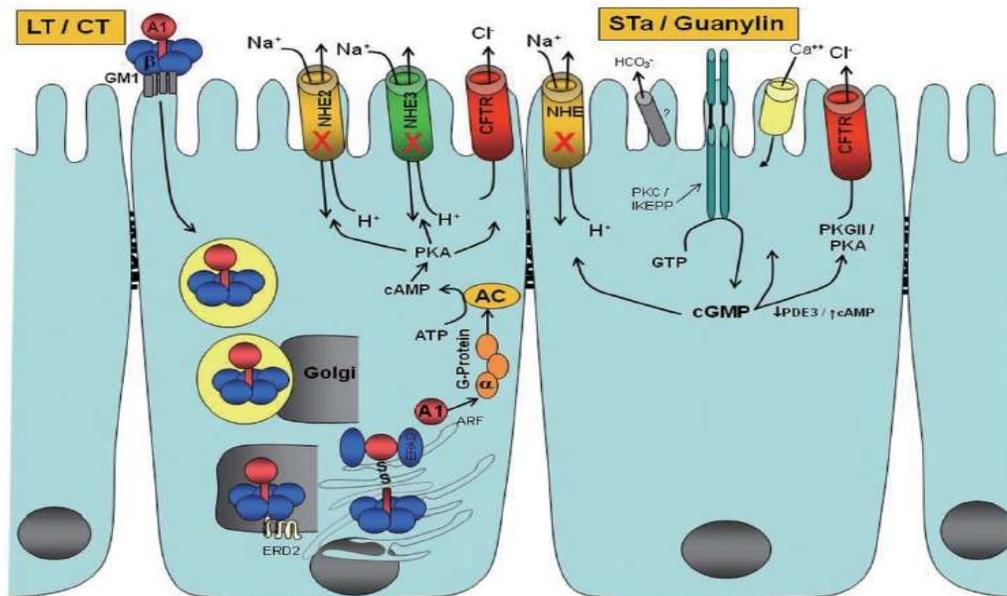
STa é uma toxina monomérica de 18 a 19 aminoácidos, com massa molecular de 2 kDa, que contém múltiplos resíduos de cisteína, os quais formam pontes dissulfeto necessárias para manter a estabilidade ao calor necessária para essas toxinas. Existem duas variantes, designadas de STp (STIa) e STb (STIb), ambas podem ser vistas em cepas de humanos e são praticamente idênticas nos 13 resíduos de aminoácidos que são necessários e suficientes para causar a atividade enterotóxica (RASHEED et al, 1990).

STa age pela ligação com uma proteína receptora epitelial intestinal localizada na borda da membrana, e os receptores para STa são encontrados no colo e intestino delgado (WANG et al, 2019). O principal receptor para STa se localiza em uma enzima de membrana chamada de guanilato ciclase C (GC-C), a qual pertence à família de receptores ciclase. A ligação de STa ao GC-C estimula a atividade GC levando ao aumento dos níveis da cGMP intracelular (BASU et al, 2010). Isso promove a estimulação da secreção de cloro e inibição da absorção de cloreto de sódio (NaCl), resultando na secreção de fluidos intestinais líquidos (JOFFRÉ et al, 2006).

STb foi primeiramente associada à cepas de ETEC encontradas em porcos, mas também são encontradas expressas em cepas de ETEC isoladas de humanos. Essa toxina é inicialmente sintetizada a partir de uma molécula precursora e processada para uma forma madura, passando de 71 aminoácidos para 48 aminoácidos, com um peso molecular final de 5.1 kDa (ARRIAGA; HARVILLE; DREYFUS, 1995). O dano causado por STb consiste na perda de vilos nas células epiteliais e atrofia parcial dos vilos. STb estimula a secreção de bicarbonato pelas células intestinais, levando ao aumento nos níveis de cálcio intracelular para extracelular. Os mecanismos pelos quais STb estimula a secreção intestinal são desconhecidos, mas sabe-se que não envolve nucleotídeos cíclicos. Também ocorre a liberação de PGE2 e serotonina, sugerindo que exista algum tipo de envolvimento entre o sistema nervoso entérico e a resposta secretória desta toxina (HARVILLE; DREYFUS, 1995).

Os mecanismos envolvidos na ação de LT e STa estão ilustrados na Figura 3.

Figura 3 – Mecanismos de ação das toxinas LT e STa da ETEC.



Legenda: Mecanismos de ação da enterotoxina lábil ao calor (LT) e estável ao calor (STa) de *Escherichia coli* e ligantes peptídicos endógenos da guanilil ciclase C (GC-C). A LT se liga ao receptor GM1 monossialogangliosídeo na superfície da mucosa do hospedeiro e desencadeia endocitose da holotoxina. O domínio A1 da subunidade A é transportado através do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático para ativar a subunidade Gsα da G-proteína. Este domínio A1 interage com fatores de ADP-ribosilação para ADP-ribosilar esta subunidade Gsα, a fim de ativar a proteína G e, conseqüentemente, a adenilil ciclase (AC). O AC cliva o ATP no cAMP e, subsequentemente, ativa a proteína cinase A, que inibe a absorção de NaCl (transportadores NHE) e aumenta a secreção de cloreto através do regulador transmembranar da fibrose cística (CFTR). Os ligantes peptídicos do domínio extracelular do GC-C ativam o domínio catalítico intracelular do GC-C, resultando na formação de cGMP, que ativa várias vias: a) inibição do transportador NHE3, que diminui a absorção de NaCl; b) ativação do CFTR, que leva à secreção de cloreto; ec) aumento do influxo de cálcio.

Fonte: Adaptado LIMA; FONTELES, 2014.

2.5.2 Fatores de colonização da ETEC (fatores de virulência clássicos)

A colonização mediada por fímbria de patógenos bacterianos foi demonstrada pela primeira vez em suínos, antes que estudos semelhantes fossem realizados em outros mamíferos ou humanos. O primeiro antígeno adesivo descrito de cepas de *Escherichia coli* isoladas de animais foi o antígeno F4, originalmente denominado K88, por se tratar de um antígeno capsular (K para “Kapsel” ou cápsula em alemão). Sua natureza proteica e dependência da presença de um plasmídeo foi demonstrada posteriormente (ANANTHA et al, 2004).

Esse antígeno era visível por microscopia eletrônica como um filamento exposto à superfície que era fino e flexível e tinha propriedades hemaglutinantes. Como outros apêndices semelhantes a cabelos não flagelares na superfície bacteriana, essas fímbrias também eram chamadas de pili. No entanto, a designação de fímbrias é preferida por

alguns devido à precedência histórica ou para distinguir adesivos (fímbrias) de organelas conjugadas (pili). Particularmente a *E. coli* pode aglutinar eritrócitos e que essa propriedade pode ser mediada por fímbrias, já havia sido descrita anteriormente. No entanto, o fato de que a adesão intestinal e a colonização de *E. coli* em animais diarreicos é mediada por fímbrias foi primeiramente mostrado com fímbrias F4, e o papel das fímbrias como fatores de virulência foi demonstrado pela primeira vez (DUBREUIL et al, 2016).

Embora o papel das fímbrias na patogênese da ETEC tenha sido demonstrado com cepas clínicas curadas de plasmídeos que codificam os genes fimbriais, confirmações de experimentos com mutantes isogênicos definidos nunca foram realizadas. No entanto, existem evidências adicionais que apoiam a importância das fímbrias como fatores essenciais de virulência na adesão de ETEC ao intestino (DUBREUIL et al, 2016).

As cepas humanas de ETEC possuem seu próprio tipo de fimbria colonizadora, chamado de CFAs. O primeiro grupo inclui CFA/I-LIKE e/ou CFA/I (*cfab*), CS1(*csaA*), CS2, CS4, CS14 (*csuA*) e CS17. O segundo é o grupo CS5 ou grupo CS5-like, inclui os agentes de ligação CS5, CS7, CS18 e CS20. As sequências de aminoácidos CS5, CS13, CS18 e CS20 são geneticamente similares as subunidades de fimbria de cepas de animais como K88 e f41 (MIRHOSEINI; AMANI; NAZARIAN, 2018).

2.5.3 Fatores de virulência não clássicos da ETEC

Dentre os fatores de virulência não clássicos (FVNC) estão alguns genes importantes para virulência principalmente com a adesão, *eata*, *tia*, *etpA* e *faeG*. O gene *eata* é um membro do autotransportador de serina protease que facilita a entrega mais rápida de toxina lábil ao calor (LT) (PATEL et al, 2004). O gene *tia* atua como uma invasina e também como uma adesina (ELSINGHORST E WEITZ, 1994). Já o gene *etpA* também é envolvido na adesão (ROY et al, 2008). E o gene *faeG* é o principal constituinte das fímbrias F4, contribui principalmente para a ligação do patógeno às células hospedeiras (PENGPENG et al, 2015) A distribuição dos genes de virulência, variam na detecção de amostras positivas ETEC de uma região geográfica para outra.

2.6 Diagnóstico da infecção por ETEC

O diagnóstico de ETEC é normalmente feito pelas características clínicas que o paciente apresenta e confirmado pela cultura das fezes (EVANS; EVANS, 1996). A detecção de ETEC pode ser baseada na busca pelas enterotoxinas LT e/ou ST, através de imunoenaios ou bioensaios, como é o caso do teste de ELISA (CRYAN, 1990), radioimunoenaios (GIANNELLA; DRAKE; LUTTRELL, 1981), ensaios de aglutinação (ITO; KUWAHARA; YOKOTA, 1983), ensaio de aglutinação de látex passiva reversa (SCOTLAND; RICHMOND; ROWE, 1983) e o tradicional teste de Biken (HONDA et al, 1981).

As cepas de ETEC podem ser identificadas através de meios que usam técnicas moleculares os quais fazem a detecção de genes codificantes de enterotoxinas, *estA* para toxina termoestável (ST) e *eltB* para toxina termolábil (LT), utilizando técnicas de hibridização de DNA e PCR. A detecção por hibridização pode ser feita diretamente na cultura de bactéria de fezes usando sondas de DNA de polinucleotídeos ou oligonucleotídeos. E com ambas, a porcentagem de detecção de ETEC usando amostras de colônias ou de fezes não é inequívoca (SCHULTSZ et al, 1994).

Uso de métodos moleculares, em particular a PCR, para o diagnóstico de patógenos entéricos em amostras fecais é indicado devido a maior sensibilidade em relação aos métodos microscópicos ou fenotípicos convencionais de detecção. Estudos foram feitos comparando ensaios moleculares e microbiológicos convencionais nas mesmas amostras e obtiveram aumento significativo de positividade na detecção pelos métodos moleculares (FRICKMANN et al, 2015).

Vários ensaios de ETEC por PCR apresentam uma alta especificidade e sensibilidade quando usados diretamente em amostras clínicas ou isoladas de colônias de bactérias. O PCR multiplex é um exemplo de adaptação para a detecção de diversos patótipos diferentes de ETEC em uma mesma reação. Depois do PCR uniplex, a identificação do produto da reação pode ser detectada pelos seus diferentes tamanhos e pela sonda de hibridização não isotrópica (NATARO; KAPER, 1998).

2.7 Epidemiologia de infecções por ETEC

Os primeiros relatos sobre ETEC foram feitos em Calcutá em amostras de fluidos de pacientes crianças e adultos com cólera. Estudos documentam que a ETEC é geralmente encontrada nos países em desenvolvimento e frequentemente é tida como a causa de diarreia mais comum em crianças menores que 2 anos de idade, variando os

tipos de toxinas e fatores de colonização de acordo com o tipo de cepa endêmica encontrada em cada país. A incidência da infecção por ETEC diminuiu em pacientes dos 5 aos 15 anos, aumentando depois dos 15 e cerca de 25% das doenças causadas por ETEC são em adultos (QADRI et al, 2005).

No mundo inteiro acredita-se que morrem cerca de 157 mil pessoas por ano de diarreia causada por ETEC (QADRI et al, 2007). A quantificação dos dados ao nível mundial de mortalidade e morbidade de diarreia causada ETEC, entre os anos de 1990 e 2016, mostrou que a ETEC é a oitava causa de mortes por diarreia em grupos de todas as idades, estimando-se ser a causa de 51.186 mortes, o que representa de 2 a 3% dos casos de mortes por diarreia foram causados por ETEC. Não há diferença significativa na mortalidade por diarreia entre homens e mulheres. O número de mortes por ETEC foi maior entre crianças menores que 5 anos, com 18.669 mortes (KHALIL et al, 2018).

Um estudo comparativo entre os casos de diarreia entre os anos de 1990 e 2010, revelou que de forma global houve uma redução nos episódios de diarreia entre os anos de 1990 e 2010. A mortalidade causada pela infecção também reduziu no período investigado. As regiões em que os casos foram mais comuns foi nas regiões da África e sudeste asiático. A incidência de ETEC é maior em países de baixa renda (WALKER et al, 2013).

Em países como Bangladesh, México, Peru, Egito, Argentina, Índia, Nicarágua e Tunísia existe uma prevalência de 18-38% de ETEC como causa de diarreia em crianças sintomáticas. Existe também uma variação entre o tipo de enterotoxina de acordo com o país, LT é mais comum nas cepas isoladas do México, Peru, Argentina e Índia, enquanto que a expressão de ST é mais comum na Bangladesh, Egito e Nicarágua. Os fatores de colonização (FCs) expressos em LT são mais numerosos que em ST, e são acompanhados por infecções suaves (ISERI, et al, 2011).

Estudos sobre doenças diarreicas em crianças no Brasil e em outros países em desenvolvimento se concentraram em centros de saúde ou hospitais de emergência que tratam principalmente pacientes com diarreia moderada a grave e têm a capacidade de identificar enteropatógenos. Essa abordagem captura apenas um pequeno subconjunto da carga de doenças diarreicas no Brasil e limita o entendimento preciso sobre a prevalência de patógenos na região semiárida mais pobre do Brasil (LIMA et al, 2019).

A doença diarreica continua atingindo a população brasileira, a qual fornece um contexto único para examinar os padrões espaciais e sazonais das doenças diarreicas

devido ao seu grande tamanho, população socioeconomicamente diversa e clima heterogêneo. A literatura existente sobre as tendências das doenças diarreicas no país é tipicamente de curto prazo, limitada a crianças pequenas, ou limitada a determinadas regiões do Brasil (BAKER; ALONSO, 2017). A alta prevalência de doenças diarreicas em áreas em desenvolvimento é significativa porque inibe o crescimento normal, prejudica a função cognitiva e atrapalha o desenvolvimento físico e educacional em crianças (LIMA et al, 2019).

No Brasil a ETEC está entre os oito patógenos causadores de diarreia em crianças de até dois anos de vida (PLATTS-MILLS et al, 2015). Um estudo realizado por Ori e colaboradores (2018), analisou 5047 amostras de diarreia de pacientes entre 6 meses e 96 de idade, de diferentes regiões do Brasil, e detectaram ETEC em 43 pacientes (6,3%), onde 51% destes são crianças de 0-5 anos. Na região Sudeste, um estudo analisou 446 crianças hospitalizadas e 328 crianças em atendimento clínico, ambas com quadro de diarreia, e os resultados obtidos foram de 2,4% de infecção por ETEC (ARAÚJO et al, 2007). Na região Nordeste, poucos estudos relatam a detecção de ETEC, entretanto, no estado do Piauí, um estudo analisou 250 amostras de crianças com diarreia, demonstrou que a prevalência de ETEC é de 7,2% (NUNES et al, 2011).

O tratamento para ETEC geralmente é realizado com a reidratação de fluidos, e em casos mais persistentes, são usados antimicrobianos. No entanto, algumas das cepas de ETEC adquiriram resistência aos antimicrobianos mais comuns. Em Moçambique, por exemplo, foi reportado a existência 61% de resistência a sulfametoxazol e 46% para ampicilina. No Iran cepas de ETEC apresentaram multirresistência às drogas como ácido nalidíxico, co-trimoxazol. Ciprofloxacina e Imipenem são antimicrobianos considerados seguros para o tratamento de diarreia dos viajantes, provocados por ETEC (QADRI et al, 2005; ISERI, et al, 2011; TAGHADOSI et al, 2019).

Como ETEC é um dos principais organismos bacterianos causador da diarreia nos países em desenvolvimento (KOSEK et al, 2003), é importante caracterizar os genes de virulência para uma melhor compreensão. Isso ajuda a compreender a epidemiologia e patobiologia da infecção por ETEC em todo o mundo. Neste estudo, temos como objetivo analisar a distribuição dos genes que codificam enterotoxinas, FCs e FVNCs que ocorrem comumente em isolados de ETEC, além de observar as manifestações clínicas, socioeconômicas e coinfeções.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Caracterização dos genes de virulência de crianças com e sem diarreia infectadas por *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) no semiárido brasileiro.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver reações de PCR para o diagnóstico molecular de genes de virulência de ETEC;
- Avaliar a relação dos genes de virulência de ETEC em crianças com e sem diarreia no semiárido brasileiro com os desfechos clínicos, inflamação intestinal, desnutrição e fatores socioeconômicos;
- Correlacionar infecções por ETEC e outros enteropatógenos com a presença de diarreia em crianças do semiárido brasileiro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

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

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

Foram incluídas no estudo crianças de 2-36 meses de idade que tiveram o consentimento dos pais ou responsáveis. Protocolos de campo e laboratório para pesquisa foram desenvolvidos e equipes foram treinadas para execução das atividades. Um questionário (ANEXO C) com informações demográficas, epidemiológica, clínico, nutricional e laboratorial foi aplicado e amostras de fezes foram coletadas de cada criança para posterior análise molecular.

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

4.2 Descrição do estudo

4.2.1 Local do estudo

O projeto RECODISA foi um estudo epidemiológico, observacional, analítico, caso/controlado, que compreendeu a participação das cidades de Crato (CE), Picos (PI), Ouricuri (PE), Patos (PB), Souza (CE) e Cajazeiras (PB), que são representantes do Semiárido Brasileiro. O Semiárido Brasileiro (Figura 4) abrange uma área de 969.589,4 km² e compreende 1.133 municípios de nove estados do Brasil: Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (IBGE, 2011).

Figura 4 - Região do semiárido brasileiro.



Localização, inscrição e seleção dos participantes. A região semiárida inclui os estados do Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia da macro-região nordestina, mas não inclui o Maranhão e a região norte de Minas Gerais (Figura 4). A região semiárida cobre 969.589,4 km² e tem uma população de 23,5 milhões. A população estimada de crianças menores de cinco anos é de 2,3 milhões. A precipitação média anual é inferior a 800 mm e o índice de aridez pode chegar a 0,5, o que representa o balanço hídrico entre precipitação e evapotranspiração potencial. O risco de seca na região semiárida é superior a 60%. Cidades do nordeste brasileiro incluídas no estudo: Crato(CE), Picos (PI), Ouricuri(PE), Cajazeiras (PB), Souza (PB) e Patos (PB).

Fonte: LIMA et. al.,2019

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

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

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

4.2.2 Critérios de Inclusão e Exclusão da população do Estudo

Critérios de inclusão para o grupo caso:

- Crianças com idade variando entre 02 e 36 meses;
- Ter apresentado 3 ou mais evacuações líquidas nas últimas 24 horas;
- Não apresentava doença crônica ou hospitalização nas 12 horas seguintes à inscrição no estudo;
- Crianças residentes em um dos locais de estudo;
- Obtenção de consentimento livre esclarecido assinado pelo pai ou responsável da criança.

Critérios de inclusão do grupo controle:

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

Critérios de exclusão dos casos e controles.

- Os pais não fornecerem o termo de consentimento assinado;
- Relato de uso de antibióticos nos últimos 30 dias;

- Apresentaram doenças de base moderada a grave (por exemplo, pneumonia, infecção sistêmica, etc.).

4.3 Medidas antropométricas

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

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

4.4 Coleta das amostras

As crianças e seus pais que estiveram nas unidades de saúde ou comunidades foram abordados por um membro do grupo de pesquisa para recrutamento para o estudo e, caso tenham preenchido os critérios de inclusão, realizaram um processo de consentimento informado por escrito. O responsável coletou uma amostra de fezes em um coletor padrão. As amostras para o estudo etiológico no semiárido foram coletadas, armazenadas a -20 °C e em seguida enviadas para o Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI) na UPC & IBIMED /UFC, para os devidos procedimentos. O período de coleta realizado ocorreu durante um período de 19 meses, entre os meses de setembro de 2009 a março de 2011, período de chuva e com maior incidência de casos diarreicos.

4.5 Processamento das amostras fecais

Ao chegar ao laboratório, às amostras eram acondicionadas na temperatura entre 2/8°C até seu processamento. Os espécimes fecais foram aliquotadas em tubos estéreis

identificados por números, com capacidade para 1,8ml. Após esse passo, as alíquotas eram armazenadas em freezer -20°C para posterior extração do DNA fecal.

4.6 Extração de DNA fecal

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

Aproximadamente 200 mg de fezes foram incubadas com 1,4 mL de tampão ASL. A mistura foi homogeneizada fortemente por 1 minuto no bead beater. A mistura foi incubada por 5 minutos a 95 °C. O lisado foi homogeneizado por 15 segundos e centrifugado por 1 minuto para precipitação das partículas fecais.

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

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

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

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

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

Na segunda lavagem, 500 µL do tampão AW2 foram adicionados à membrana e submetidos à centrifugação por 3 minutos. Para que nenhum excesso de tampão

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

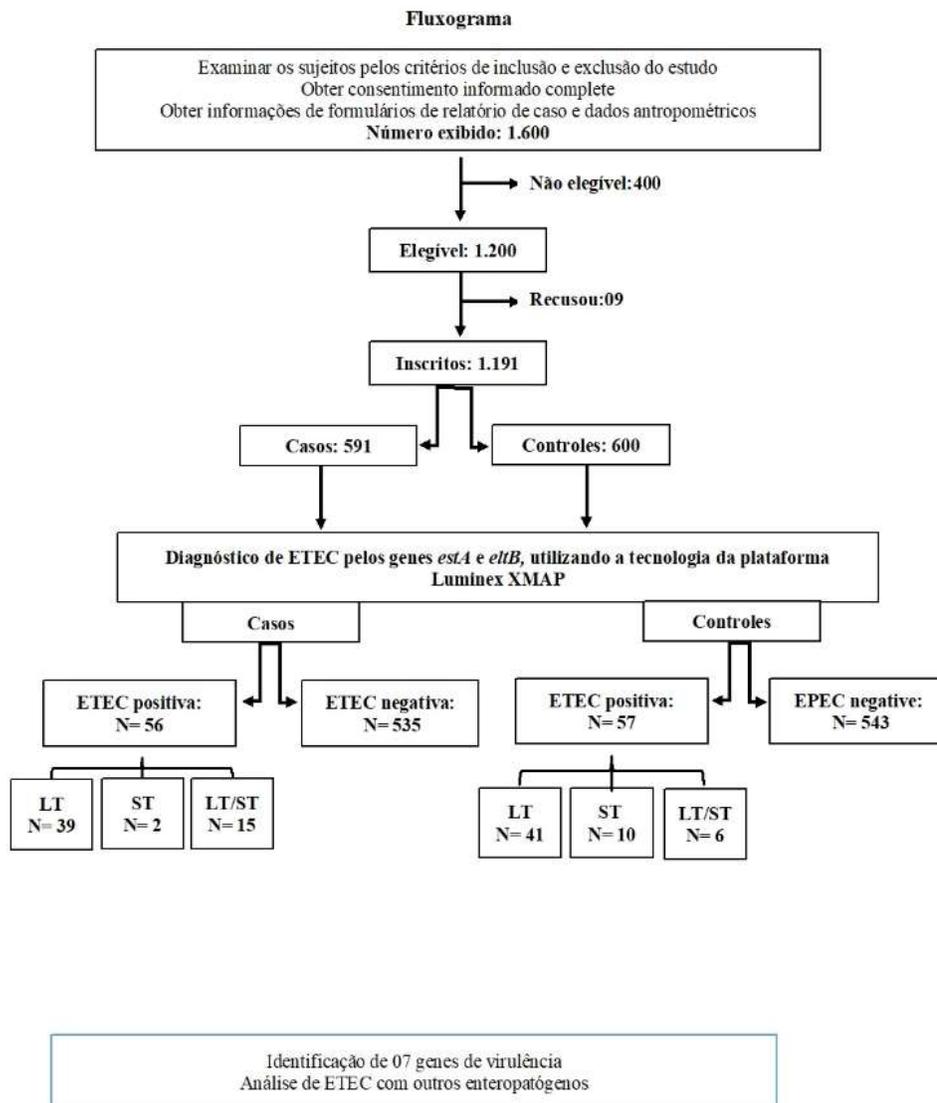
4.7 Diagnóstico molecular de ETEC

O diagnóstico de ETEC, escolhido para o presente estudo foi baseado na pesquisa de dois genes do microrganismo, *estA* e *eltB*. O gene *estA* codifica a enterotoxina estável ao calor (ST), enquanto o gene *eltB* codifica a enterotoxina termo lábil (LT).

A partir da colaboração com o pesquisador americano Eric Houpt da Universidade de Virgínia, o diagnóstico molecular de ETEC a partir do DNA fecal foi realizado utilizando a tecnologia XMap (LUMINEX). Esta tecnologia, foi inserida ao nosso grupo em Fortaleza, que emprega a técnica de PCR associada à hibridização de seus produtos com microesferas magnéticas fluorescentes (beads) incorporadas à sondas específicas para estes produtos de PCR. Estas microesferas de poliestireno, acopladas à sondas de hibridização específicas para cada alvo, permitem a realização de múltiplos ensaios em pequenas quantidades de amostras. As microesferas são coradas com substâncias fluorescentes com espectros distintos, permitindo que cada uma seja especificamente diferenciada de outra. Após a hibridização das beads com os produtos de PCR, o material obtido foi levado ao leitor de beads (BioPlex-200), que detectou o DNA do agente infeccioso. A vantagem desta tecnologia é a capacidade de detectar vários agentes em uma mesma amostra de DNA ou RNA fecal.

Esta análise com Luminex serviu como primeiro diagnóstico, triagem e ponto de partida para o presente estudo, tendo como resultado a detecção de DNA fecal de ETEC 9,5% (113/1200) das amostras fecais das crianças do estudo RECODISA (Figura 5).

Figura 5 – Fluxograma do estudo.



Fluxograma que indica o diagnóstico molecular de *Escherichia coli* enterotóxigena,

4.7 Pesquisa de genes relacionados à virulência

As amostras identificadas positivas para ETEC foram analisadas por Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) do tipo Uniplex (Promega Corporation, Madison, WI), quanto à presença de 7 fatores de virulência amplamente estudados na literatura: *etpA*, *cfaB*, *tia*, *faeG*, *eatA*, *csua1*, *csoA*, (Tabela 1), seguindo as instruções do fabricante.

Tabela 1 - Genes de diagnóstico relacionados com *Escherichia coli* enterotoxigênica, iniciadores utilizados, tamanhos dos produtos e suas funções.

Gene	Descrição	Iniciador	Tamanho	Fonte
<i>etpA</i>	Codifica pilina	S: GCGGCTAAGACGAACAGTGC A: AGCGTGTTGTTGCCAGCAAA	221 (PB)	Delcanto et al, 2012
<i>cfa B</i>	Proteína efetora secretada pelo sistema de secreção tipo III (T3SS)	S: AGCTTATTCTCCCGCATCAAA A:GAACATCTGTAAGCTGTGGTGT	197 (PB)	Donnenberg, 2006
<i>tia</i>	Determinante de invasão	S:GGCGTATTTTCAGCCCAGGC A:CAAAGTCCTGACGGAAGCGC	115 (PB)	Delcanto et al, 2012
<i>faeG</i>	Subunidade fimbrial maior	S: CTCCGCTGAACGTAGCAATT A: AGCGTGTTGTTGCCAGCAAA	105 (PB)	Xia, 2015
<i>eatA</i>	Auto transportador de toxina secretada	S: ATTGTCCTCAGGCATTTTAC A: ACGACACCCCTGATAAACAA	215(PB)	Patel, 2004
<i>csuaI</i>	Fimbrias	S: AGCCTTCGATCCGGTTGAGG A: CGTTAATGCCTTCGCGCTGT	464 (PB)	Liu et al, 2017
<i>csaA</i>	Subunidade fimbrial	S:ACCACTGAGCACAACAGGCA A:GTTAGTGCGCCGCCAGTTAC	135 (PB)	Liu et al, 2017

PB: Pares de base; A: Prime antisense; S: Prime senso.

As etapas para as reações de PCR incluíram um passo inicial de desnaturação (95°C) a 5 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação (95°C) por 45 segundos, anelamento (60 °C) por 45 segundos e extensão (72° C) por 1 min, além de uma extensão final (72° C) por 10 minutos. Os iniciadores utilizados nas reações estão descritos na Tabela 1. Os produtos de PCR foram visualizados e fotografados (ChemiDoc XRS, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) após eletroforese em gel de agarose a 2% e marcação com a enzima GoTaq®. A cepa protótipo de ETEC H10407, que possui os genes descritos na Tabela 1, foi utilizada como controle positivo e a água MiliQ autoclavada foi empregada como controle negativo em todas as reações.

4.8 Determinação da concentração da mieloperoxidase (MPO)

Os dados para o biomarcador de mieloperoxidase (MPO) foram obtidos de um banco de dados já existe, referente ao projeto RECODISA. O biomarcador foi medido em amostras de fezes para determinar a inflamação intestinal usando um kit da Immunodiagnostic (Bensheim, Alemanha) (LIMA et al, 2019).

4.9 Análise estatística dos dados

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

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

5 RESULTADOS

5.1 Prevalência das infecções por ETEC e caracterização da população

Durante o período deste estudo, 113 crianças, com amostras de fezes positivas para ETEC e na faixa etária entre 2 e 36 meses, foram analisadas, sendo provenientes das cidades de Crato-CE, Picos-PI, Ouricuri-PE, Cajazeiras-PB, Patos-PB e Souza-CE. Do total de crianças (113), 56 crianças foram classificadas como casos (diarreia) e 57 crianças controle (ausência de diarreia).

A prevalência total de ETEC na população foi de 9,5 % (113/1.191), apresentando prevalências iguais em casos e controles (9,5% - 56/591 para casos e 57/600 para controles). Houve maior prevalência de ETEC-LT em relação a ETEC-ST (6,7% - 80/1.191 vs 1,0% - 12/1.191), tanto em casos como em controles (Tabela 2). Considerando o total de infecções por ETEC, as infecções por ETEC-LT apresentaram prevalência de 70,8% (80/113), enquanto infecções por ETEC-ST apresentaram prevalência de 10,6% (12/113). As infecções por ETEC-LT-ST apresentaram a prevalência de 18,6% (21/113).

Tabela 2 – Distribuição de *Escherichia coli* enterotoxigênica em relação ao grupo casos e controle em crianças do semiárido brasileiro.

CLASSIFICAÇÃO ETEC	TOTAL (%)	Nº CASOS (%)	Nº CONTROLES (%)
ETEC (LT ou ST) (<i>eltB</i> ou <i>estA</i>)	113/1191 (9,5)	56/ 591 (9,5)	57 / 600 (9,5)
LT-ETEC (<i>eltB</i>)	80/1191 (6,7)	39/ 591 (6,6)	41 / 600 (6,8)
ST- ETEC (<i>estA</i>)	12/1191 (1,0)	2 / 591 (0,3)	10 / 600 (1,7)
ST_LT-ETEC (<i>eltB</i> e <i>estA</i>)	21/1191 (1,8)	15/ 591 (2,5)	6 / 600 (1,0)

Em relação à caracterização da população alvo neste estudo, os dados obtidos a partir das respostas das famílias ao questionário de dados socioeconômico estão dispostos na Tabela 3. Considerando as 113 fichas epidemiológicas preenchidas, 37,2% das crianças estudadas estavam na faixa etária entre 12 e 24 meses de idade. Em relação ao sexo das crianças estudadas, não houve prevalência significativa entre os sexos, onde 50,4% foram do sexo feminino.

Tabela 3 - Caracterização da população infantil positiva para *Escherichia coli* enterotoxigênica do semiárido brasileiro.

PARAMÊTROS	CASO (N=56)	CONTROLE (N=57)	TOTAL (N=113)	P valor*
Sexo				
Masculino	29 (51.8%)	27 (47.3%)	56 (49.5%)	0.7081
Feminino	27 (48.2%)	30 (52.6%)	57 (50.5%)	
Idade				
2 ≤ 12 m	21 (37.5%)	13 (22.8%)	34 (30.1%)	0.1036
> 12 ≤ 24 m	25 (44.6%)	17 (29.8%)	42 (37.1%)	0.1217
> 24 ≤ 36 m	10 (17.8%)	27 (47.3%)	37 (32.7%)	0.0012*
Alimentação				
Amamentação exclusiva	3 (5.3%)	1 (1.7%)	4 (3.5%)	0.3638
Amamentação não exclusiva	32 (57.1%)	17 (29.8%)	49 (43.3%)	0.0044**
Não amamenta mais	18 (32.1%)	33 (57.8%)	51 (45.1%)	0.0081**
Nunca mamou	3 (5.3%)	6 (10.5%)	9 (7.9%)	0.4897
Renda familiar (em salários mínimos)				
< ½ a ≤ 1	51 (91.0%)	48 (84.2%)	99 (87.6%)	0.3928
2 ≤ 5	5 (8.9%)	9 (15.7%)	14 (12.3%)	0.3928

< ½ a ≤ 1: Valores de salário mínimo menor que meio salário até um salário. 2 ≤ 5: Valores de salário mínimo entre dois e cinco salários. Teste exato de Fisher, (P <0,05).

As crianças com idade de 2 a 3 anos foram associadas à ausência de diarreia (P = 0,001). Além disso, a prática de amamentação não exclusiva foi associada às crianças com diarreia (P = 0,004). As outras variáveis analisadas pela ficha epidemiológica não apresentaram diferenças significativas entre casos e controles.

Dentro da variável forma de alimentação foi observado que dentro do grupo estudado a maioria dos participantes não tinha mais a alimentação baseada em amamentação (45,1%) ou não tinha amamentação como fonte de alimento exclusiva (43,4%).

Quanto às famílias destas crianças, a maioria na época do estudo apresentou renda familiar de até 2 salários mínimos (39,8%), enquanto que uma minoria (2,7%) das

famílias apresentou uma renda igual ou maior que 3 salários mínimos na época do estudo. A respeito do nível de escolaridade das mães 96,5% das crianças tinham algum grau de ensino, entretanto, nenhuma possuía ensino superior completo. E, e boa parte (32,7%), apresentou o secundário incompleto.

Em relação às condições de saneamento básico das casas onde habitavam as famílias 64,6% destas casas possuíam a fossa como tipo de esgoto sanitário, 24,8% tinham acesso ao esgoto público e 10,6% não tinham nenhum tipo de sistema de esgoto. Nas casas dessas famílias 93,8% possuíam sanitário dentro de casa, enquanto que apenas 6,2% não tinham.

5.2 Dados clínicos

De acordo com as respostas dos pais ao questionário, tivemos que no grupo caso: 56 das crianças apresentavam diarreia aguda. Quanto ao número de evacuações, foi constatado que, em média, as crianças apresentaram 3 evacuações/dia.

Dentre a população do grupo caso, os formulários foram completamente preenchidos, revelando a seguinte distribuição dos parâmetros clínicos: 14,3% (8/56) relataram a ocorrência de dor abdominal; 23,2% (13/56) apresentaram vômito e desidratação. Quando questionados sobre a ocorrência de diarreia nas últimas 24 horas, 98,2% (55/56) dos pais ou responsáveis responderam que “sim”. Não houve associação significativa entre a presença de ETEC-LT ou ETEC-ST e qualquer sintoma clínico investigado.

As manifestações clínicas adicionais à diarreia das crianças do grupo caso, ou seja, aquelas que apresentavam diarreia na época da coleta da amostra e estavam infectadas pelo patótipo ETEC, foram analisadas e encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 – Sintomatologia clínicas relatada pelos responsáveis das crianças positivas para *Escherichia coli* enterotoxigênica

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	CASOS N = 56 (%)
Desidratação	13 (23,2%)
Vômito	13 (23,2%)
Muco nas fezes	5 (8,92%)
Fraqueza	16 (28,6%)
Dor abdominal	8 (14,3%)
Inquietação	19 (33,9%)
Tosse ou outros sint. Respiratórios	5 (8,92%)
Sangue nas fezes	0 (0,0%)
Febre	14 (25%)

Observou-se baixa prevalência de sintomas clínicos entre as crianças caso. A maior prevalência foi observada para o dado clínico inquietação (33,9%, 19/56), seguida por fraqueza (28,6%, 16/56) e a menor taxa, depois de sangue nas fezes que não apresentou dados, foi muco nas fezes e tosse ou outros sintomas respiratórios (ambos com patamares de 8,92%, 5/56).

Quando questionados sobre a ocorrência de diarreia nas últimas 24 horas, 49,6% dos pais ou responsáveis responderam “sim” (Tabela 5). Como esse foi o critério adotado para a definição dos grupos a serem analisados, as crianças incluídas nesse estudo foram divididas em casos (56) e controles (57).

Tabela 5 - Distribuição da população de estudo quanto à ocorrência de diarreia nas últimas 24 horas.

OCORRÊNCIA DE DIARRÉIA NAS ÚLTIMAS 24 HORAS		
	QUANTIDADE	%
Sim	56	49,6%
Não	57	50,4%
Total	113	100%

5.3 Dados antropométricos

Os índices antropométricos, que incluíram altura, peso e circunferência da cabeça, foram obtidos em, pelo menos, 112 crianças e, juntamente com a idade, foram utilizados para o cálculo dos escores-z. As medidas de resumo dos índices antropométricos da população estudada estão descritas na Tabela 6.

Os escores-z altura-por-idade (HAZ), peso-por-idade (WAZ) e peso-por-altura (WHZ) foram convertidos a partir da altura, peso e idade das crianças e os valores obtidos foram comparados com o valor médio da população alvo do estudo. Essas medidas antropométricas permitem o acompanhamento do crescimento das crianças, e os valores encontrados no estudo e são baseados em cálculos estatísticos desenvolvidos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006).

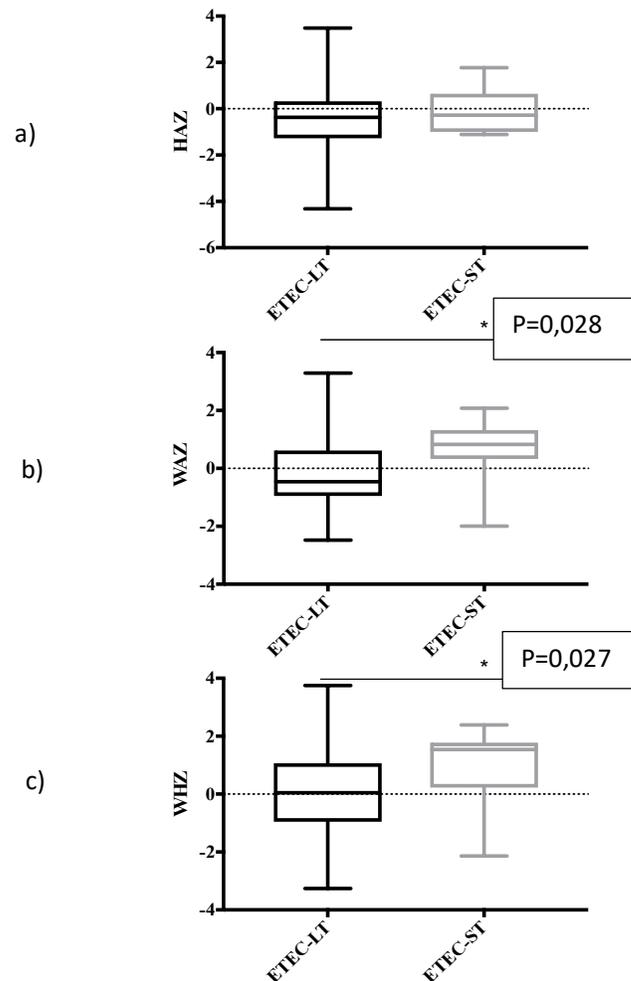
Tabela 6 - Medidas antropométricos das crianças positivas para *Escherichia coli* enterotoxigênica.

MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS		
	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Altura (cm)	79,2	10,7
Peso (Kg)	10,9	2,9
Circunferência da cabeça (cm)	46,6	3,3
HAZ	-0,2	1,4
WAZ	0,3	1,3
WHZ	0,5	1,4

Os escores-z altura-por-idade (HAZ), peso-por-idade (WAZ) e peso-por-altura (WHZ) foram convertidos a partir da altura, peso e idade das crianças e os valores obtidos foram comparados com o valor médio da população.

Os resultados dos cálculos de HAZ, WAZ e WHZ apresentaram um padrão de valores mais elevados entre as pessoas do grupo de caso, enquanto que o grupo controle apresentou resultados com dados mais baixos. A pesquisa pela significância estatística das medidas antropométricas entre os grupos caso e grupo controle demonstrou que WAZ teve valor de $P = 0,02$ e WAZ $P = 0,01$. Valores de P abaixo de $0,05$, demonstram a existência de significância estatística entre os grupos estudados, como mostra a Figura 6.

Figura 6 - Efeito de infecções por *Escherichia coli* enterotoxigênica produtora de toxina termolábil (ETEC-LT) e ETEC produtora de toxina termoestável (ETEC-ST) nos escores antropométricos de crianças sem diarreia (controle) do semiárido brasileiro.



Os escores-z altura-por-idade (HAZ), peso-por-idade (WAZ) e peso-por-altura (WHZ) foram convertidos a partir da altura, peso e idade das crianças e os valores obtidos foram comparados com o valor médio da população ($P < 0,05$).

Em relação à análise do efeito das infecções por ETEC em parâmetros antropométricos, fizemos análise comparativa entre as infecções ETEC-LT e ETEC-ST. Considerando-se apenas as crianças controle (sem diarreia), de modo a anular o efeito da diarreia nos parâmetros de peso e altura, foi possível observar que crianças infectadas por ETEC-LT possuem valores menores de WAZ e WHZ em relação a crianças infectadas

por ETEC-ST ($P = 0,028$ e $P = 0,027$ por Teste de Mann-Whitney, respectivamente), enquanto os valores de HAZ não foram alterados ($P > 0,05$) (Figura 6).

5.4 Distribuição geográfica dos isolados de ETEC

Dentre as 113 crianças infectadas por ETEC 32,7% (37/56) dos casos eram da cidade de Crato. Essa predominância da cidade de Crato, também foi observada entre o grupo de crianças controle 22/57 (19,5%). A cidade de Cajazeiras apresentou a menor incidência entre casos 3/113 (2,7%) e controles 5/113 (4,4%) entre as cidades pesquisadas. Como demonstrado na Tabela 7, os grupos caso e controle não diferiram de forma significativa quanto às cidades do estudo.

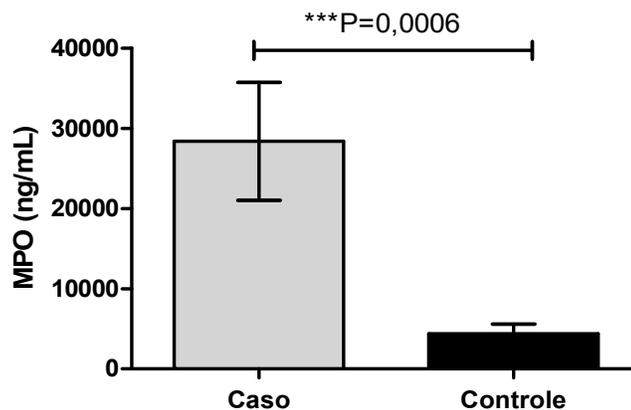
Tabela 7 - Distribuição de *Escherichia coli* enterotoxigênica por cidades do estudo em relação ao grupo caso e controle.

CIDADES DO ESTUDO	CASOS		CONTROLES		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
Cajazeiras	3	2,7%	5	4,4%	8	7,1%
Crato	15	13,3%	22	19,5%	37	32,7%
Ouricuri	4	3,5%	2	1,8%	6	5,3%
Patos	15	13,3%	13	11,5%	28	24,8%
Picos	10	8,8%	1	0,9%	11	9,7%
Souza	9	8,0%	14	12,4%	23	20,4%

5.5 Inflamação intestinal

Foram analisadas 28 amostras do caso e 37 amostras do controle para o biomarcador de inflamação intestinal mieloperoxidase (MPO). Os resultados mostraram associação com os casos, apresentando $P = 0,0006$. Os dados podem ser observados na Figura 7. Em relação aos efeitos das infecções por ETEC-LT ou ETEC-ST nos níveis de MPO, não houve diferença significativa.

Figura 7 – Concentração do marcador inflamatório mieloperoxidase (MPO)



Teste t de Student, para dados paramétricos, ($P < 0,05$).

5.6 Pesquisa dos genes de virulência de ETEC

Os resultados a respeito da prevalência dos genes de virulência característicos de ETEC pesquisados nos grupos caso e controle. Na Tabela 8, estão dispostas a distribuição de frequências dos genes *eatA*, *cfaB*, *etpA*, *csaA*, *csuA*, *faeG* e *tia*, de forma isolada, entre as amostras caso e controle.

Tabela 8 - Genes de virulência de *Escherichia coli* enterotoxigênica em relação ao grupo caso e controle.

ETEC genes de virulência	Nº casos (%) 56/113	Nº controles (%) 57/113	Total (%) 113	P	OR	95% CI
<i>eatA</i>	14 (25)	22(39,2)	36 (31,8)	0.1579	0.53	0.23 – 1.18
<i>cfaB</i>	3(5,3)	7(12,3)	10(8,8)	0.3212	0.40	0.22 – 1.53
<i>etpA</i>	8(14,3)	6(10,5)	14(12,4)	0.5808	1.41	0.45 – 4.38
<i>csaA</i>	3(5,3)	1(1,8)	4(3,5)	0.3638	3.17	0.31 – 31.4
<i>csuA</i>	11(19,6)	17(29,8)	28(24,8)	0.2765	0.57	0.24 – 1.37
<i>faeG</i>	5(8,9)	4(7,0)	9(7,9)	0.7424	1.29	0.33 – 5.11
<i>tia</i>	4(7,2)	9(15,8)	13(11,5)	0.2379	0.41	0.11 – 1.42

Teste exato de Fisher, ($P < 0,05$).

Nas amostras do grupo caso, os genes de maior prevalência foram o *eata* (25%, 14/56), *csuA* (19,6%, 11/56) e *etpA* (14,3%, 8/56), enquanto que, nos controles, os genes *eata* (39,2%, 22/57), *csuA* (24,8%, 17/57) e *tia* (15,8%, 9/57) foram mais prevalentes do que os demais. Não houve associação estatística significativa entre os genes de virulência e a subpopulação de controle ou casos do estudo.

A Tabela 9 dispõe os genes detectados no grupo de crianças com infecções por ETEC-LT. Foi observado maior frequência nos casos de *eata* (21,4%, 12/113), *csuA* (16,1%, 9/113) e *etpA* (12,5%, 7/113), e menor do gene *tia* (3,6%, 2/113). No grupo controle, foi observada a incidência de *eata* (35%20/113), *csuA* (28,1%, 16/113) e *tia* (14%, 8/113) e menor de *csuA* (1,7%, 1/113). Nessa perspectiva do estudo, também não foi observado significância estatística entre casos e controles.

Tabela 9 - Frequência de genes de virulência em amostras positivas para ETEC-LT de crianças com e sem diarreia do semiárido brasileiro.

ETEC genes de virulência	Nº casos (%) 39/113	Nº controles (%) 41/113	Total (%) 80/113	P	OR	95% CI
<i>eata</i>	12(21.4)	20(35)	32(28.3)	0.1439	0.50	0.21 – 1.16
<i>cfaB</i>	3(5.3)	7(12.2)	10 (8.8)	0.3212	0.40	0.09 – 1.65
<i>etpA</i>	7(12.5)	6(10.5)	13(11.5)	0.7764	1.21	0.38 – 3.87
<i>csuA</i>	3(5.3)	1(1.7)	4(3.53)	0.3638	3.17	0.31 – 31.45
<i>csuA</i>	9(16.1)	16(28.1)	25(22.1)	0.1737	0.49	0.19 – 1.22
<i>fueG</i>	4(7.1)	3(5.3)	7(6.2)	0.7165	1.38	0.29 – 6.49
<i>tia</i>	2(3.6)	8(14)	10(8.8)	0.0938	0.22	0.04 – 1.12

Teste exato de Fisher, (P <0,05).

Nas amostras de crianças caracterizadas como portadoras de ETEC com a enterotoxina ST, não foi identificada a expressão de nenhum dos genes pesquisados no estudo. Na Tabela 10, estão dispostas as frequências de genes de virulência para as

infecções por ETEC-ST/LT, apresentando maior prevalência no grupo caso do gene *eata* (13,3%) e menor em *cfaB* (0%) e *csaA* (0%).

Tabela 10 - Frequência de genes de virulência em amostras positivas para ETEC-ST/LT de crianças com e sem diarreia do semiárido brasileiro.

ETEC genes de virulência	Nº casos (%) 15/113	Nº controles (%) 6/113	Total (%) 21/113	P	OR	95% CI
<i>eata</i>	2(13.3)	2(33)	4(19)	1.000	1.01	0.13 – 7.4
<i>cfaB</i>	0	0	0			
<i>etpA</i>	1(6.6)	0	0	0.495	3.10	0.12 – 77.99
<i>csaA</i>	0	0	0			
<i>csuA</i>	1(6.6)	1(16.6)	2(9.5)	1.000	1.02	0.06 – 16.7
<i>faeG</i>	1(6.6)	1(16.6)	2(9.5)	1.000	1.02	0.06 – 16.7

Teste exato de Fisher, (P <0,05).

5.7 Coinfecções

A diarreia pode ser causada por uma associação entre patógenos que de forma sinérgica provocam os sintomas da doença. Dentro do estudo (Tabela 11) foi pesquisado a relação de incidência de copatogenicidade entre os agentes etiológicos EAEC, EPEC, EIEC/Shiguelia, EHEC, Adenovírus, Astrovírus, Norovírus, Rotavírus, Sapovírus, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp, *Aeromonas* spp, *Vibrio cholera*, *Entamoeba* spp, *Cryptosporidium* spp e *Giardia lamblia*. Verificou-se que em 93,8% (106/113) destas amostras positivas para o patotipo de ETEC apresentavam coinfeções. A maior prevalência de coinfeção foi com a bactéria *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC) (63,7%, 72/113), seguida de *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC) (48,7%, 55/113). As menores taxas, depois de *Vibrio cholerae* e *Entamoeba* spp. que não apresentaram coinfeção, foram dos vírus Astrovírus e Sapovírus com a prevalência respectivamente de 0,9% (1/113) e 1,8% (2/113).

Em relação a distribuição entre o grupo caso e controle, observou-se alta prevalência de coinfeções com pelo menos um outro enteropatógenos no grupo caso 94,6%, (53/56) e no grupo controle 93%, (53/57). A prevalência de coinfeções com cada enteropatógeno foi maior entre crianças do grupo caso. No entanto, essas diferenças não

mostraram significância estatística. As coinfeções com Astrovírus, Norovírus e Sapovírus foram observadas apenas no grupo caso.

Tabela 11 - Distribuição dos copatógenos entéricos em crianças positivas para *Escherichia coli* enterotoxigênica.

COPATÓGENOS	Nº CASOS (%)	Nº CONTROLES (%)	TOTAL (%)	P	OR	95% CI
EAEC	39(69.6)	33(57.9)	72(63.7)	0.241	1.66	0.76 – 3.62
EPEC	27(48.2)	28(49.1)	55(48.7)	1.000	0.96	0.46 – 2.01
EIEC/ <i>Shigella</i>	12(21.4)	12(21)	24(21.2)	1.000	1.02	0.41 – 2.52
EHEC	13(23.2)	6(10.5)	19(16.8)	0.083	2.57	0.89 – 7.33
Adenovírus	3(5.3)	1(1.7)	4(3.5)	0.363	3.17	0.31 – 31.45
Astrovírus	1(1.8)	0	1(0.9)	0.495	3.11	0.12 – 77.99
Norovírus	3(5.3)	0	3(2.6)	0.118	7.52	0.37 – 149.2
Rotavírus	5(8.9)	3(5.2)	8(7.1)	0.489	1.76	0.40 – 7.76
Sapovírus	2(3.6)	0	2(1.76)	0.243	5.27	0.24 – 112.5
<i>Salmonella</i> spp.	11(19.6)	14(24.6)	25(22.1)	0.651	0.75	0.30 – 1.83
<i>Campylobacter</i> spp.	6(10.7)	4(7)	10(8.8)	0.527	1.59	0.42 – 5.97
<i>Aeromonas</i> spp.	1(1.8)	2(3.5)	3(2.6)	1.000	0.50	0.04 – 5.67
<i>Vibrio cholera</i>	0	0	0			
<i>Entamoeba</i> spp.	0	0	0			
<i>Cryptosporidium</i> spp.	3(5.3)	6(10.5)	9(7.9)	0.489	0.48	0.11 – 2.02
<i>Giardia lamblia</i>	16(28.6)	10(17.5)	26(23)	0.491	1.42	0.56 – 3.57

Teste exato de Fisher, (P <0,05).

6 DISCUSSÃO

Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC) é um dos patógenos bacterianos mais importantes que contribuem para episódios de diarreia em todo o mundo (KOTLOFF et al 2013). A ETEC é caracterizado pela capacidade de produzir dois tipos de fatores de virulência; adesinas que promovem a ligação e colonização do epitélio intestinal e enterotoxinas responsáveis pela secreção de fluidos. A ETEC produz duas classes principais de enterotoxinas a toxina lábil ao calor (LT) e toxinas estáveis ao calor (ST) (DUBREUIL et al 2016). Desta forma a identificação do agente etiológico causador da diarreia é um aspecto relevante para a compreensão da epidemiologia e identificação dos perfis patofisiológicos envolvidos na doença (SOUSA et al, 2002). No presente estudo, amostras de fezes de crianças de dois a 36 meses de idade, de seis cidades do semiárido Brasileiro, positivas para ETEC (LIMA et al, 2019), foram analisadas com a finalidade de identificar os principais genes de virulência (GV) associados à patobiologia da infecção, além de características socioeconômicas, aspectos clínicos e os copatógenos.

Para este estudo foi considerada uma população amostral, já catalogada, de 591 casos e 600 controles dos quais foi possível identificar, 56 (9,5%) casos e 57 (9,5%) controles positivos para ETEC (LIMA et al, 2019). Observando as diferentes regiões do Brasil, na região Nordeste podemos identificar uma maior taxa na detecção de ETEC, por exemplo no estado do Piauí, onde houve uma prevalência de 7,2% (NUNES et al, 2011), corroborando com nosso estudo. Na região Sudeste, no estado de São Paulo, nas cidades de São Paulo e Ribeirão Preto, um estudo analisou crianças hospitalizadas e em atendimento clínico, menores de 5 anos de idade e com diarreia, e demonstrou uma prevalência de ETEC de 2,4% (ARAÚJO et al, 2007). Essa diferença entre as taxas de detecção de ETEC entre as regiões do Brasil, podem estar relacionadas com o fato de as regiões Norte e Nordeste serem menos desenvolvidas do que as demais regiões do país, levando em consideração que a infecção causada por ETEC está diretamente relacionada com locais com menores índices de desenvolvimento (GUERRANT et al, 2013).

Do total de 113 crianças positivas para ETEC, 30,1% se encontravam dentro da faixa etária de 2 a 12 meses e com maior prevalência (37,1%) entre >12 meses e ≤ 24 meses de vida. Corroborando com nosso estudo, Guerrant e colaboradores (1999) observaram que crianças em áreas urbanas com baixo poder aquisitivo do nordeste do Brasil, têm taxas de doenças diarreicas entre as mais altas do mundo em seus primeiros 2 anos de vida.

Os fatores que levam ao desenvolvimento de diarreia podem ser explicados por um modelo multicausal composto pelas características socioeconômicas, demográficos, políticas, sanitárias, ambientais e culturais inter-relacionados (TEIXEIRA; HELLER, 2005). O nível baixo de escolaridade dos pais e escassez de recursos financeiros para o acesso a alimentação adequada são fatores relacionados ao aumento da incidência de diarreias em crianças, principalmente em países em desenvolvimento (PLATTS-MILLS et al, 2015). Corroborando com a literatura, às famílias das crianças do presente estudo, apresentaram renda familiar de até 2 salários mínimos (39,8%), as mães relataram ter algum grau de escolaridade (96,5%), entretanto, nenhuma possuía ensino superior completo e em relação às condições de saneamento básico das casas onde habitavam as famílias 64,6% das casas possuíam a fossa como tipo de esgoto sanitário, enquanto que apenas 6,2% não tinham.

O aleitamento materno constitui um fator de prevenção contra diarreias em crianças de até dois anos, promovendo a redução de mortalidade e internações por diarreia. A análise da amamentação das crianças deste estudo, revelou que as crianças com amamentação não exclusiva foram associadas aos casos de diarreia. Um baixo índice de amamentação exclusiva (3,5% - 4/113) foi observado, o que podemos sugerir que, devido ao baixo grau de escolaridade das mães, pode-se representar um fator importante quanto à falta de conscientização sobre o aleitamento exclusivo, visto que a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2016), orienta amamentação exclusiva, até os seis meses de vida, implicando em menores chances dessas crianças desenvolverem diarreias agudas em comparação a crianças que se alimentam de fórmula.

Dentre os sintomas apresentados, os mais comuns foram inquietação (33,9%), fraqueza (28,6%), febre (25%), desidratação e vômito (23,2%), os quais são sintomas comuns de diarreia aguda. Corroborando com o presente estudo, na infecção por ETEC a diarreia causada é caracterizada por ser rápida, aquosa, sem quantidade considerável de sangue e pode ser acompanhada pelo aparecimento de febre baixa, outros sintomas como a dor abdominal, mal-estar, náuseas e vômito, também podem aparecer (EVANS, 1996).

A mieloperoxidase (MPO) é um biomarcador de inflamação, comumente encontrado em inflamações crônicas que atua na regulação de processos inflamatórios através de reações com peróxido de oxigênio (LAU; BALDUS, 2006). A análise de detecção de inflamação a partir do biomarcador MPO, apresentou diferença significativa entre o grupo caso e controle. O grupo caso teve valores de MPO superiores aos do grupo controle, sugerindo que a inflamação nessa população foi maior.

Quando analisado os índices antropométricos das crianças positivas para ETEC, observou-se que as infecções por ETEC-LT estão associadas a valores de WAZ e WHZ menores do que infecções por ETEC-ST. É importante destacar que esse resultado foi identificado em análise exclusiva de crianças sem diarreia (controles), de modo a excluir potenciais efeitos da diarreia no estado nutricional. Embora menores valores de índices antropométricos não reflitam necessariamente estados de desnutrição, este achado corrobora com estudo caso-controle em crianças de 6 a 23 meses de Bangladesh, onde a detecção molecular de ETEC-LT, mas não de ETEC-ST, foi associada com desnutrição de acordo com escore WAZ (PLATTS-MILLS et al, 2017). Por outro lado, as infecções por ETEC-ST têm sido mais associadas a casos de diarreia do que infecções por ETEC-LT. Dessa forma, nosso estudo corrobora com a maior potencialidade de impacto nutricional da infecção por ETEC-LT em crianças sem diarreia, provavelmente associando-se à condição de disfunção entérica ambiental (LIU et al, 2017; LIMA et al, 2019.).

Guerrant e colaboradores (2008) sugerem que uma proporção substancial dos casos de desnutrição seja devido à distúrbios na função da absorção intestinal advindas de infecções entéricas múltiplas e repetitivas. Essa perspectiva inclui infecções agudas recorrentes e persistentes com ou sem diarreia. Os impactos desse quadro patológico podem ser mais graves quando associados à outras doenças como AIDS, tuberculose, malária etc. Crianças desnutridas são mais suscetíveis à diarreia e quando acometidas, apresentam uma maior incidência, duração e gravidade nos processos infecciosos da patologia. As características genéticas e interações com fatores de risco ambientais também são condições que atuam na vulnerabilidade à diarreia.

A distribuição dos genes de virulência varia na ETEC de uma região geográfica para outra (BHAKAT et al, 2018). Neste estudo, examinamos genes toxigênicos (*eltA* e *estB*), genes do fator de colonização (FCs) e GVNCs. Nossos resultados concordam com a prevalência global de genes de toxinas, onde a presença de LT (60%) é superior que ST, isoladamente ou em combinação com LT (ST + LT) (ISIDEAN et al, 2011). Contrastando com esses dados, em Bangladesh (1996 –1998) e Xangai (2012–2013), a ST foi o principal tipo de toxina, com exceção ST + LT (QADRI et al, 2005). ST é maior que LT em Shenzhen, China, com prevalência de 81,5%, em pacientes ambulatoriais diarreicos durante 2009 e 2014 (LIU et al, 2017). Em nossas amostras não diarreicas baseadas na comunidade, descobrimos que o padrão é inverso, ou seja, ST foi a toxina menos prevalente e LT foi a predominante. Esse padrão de distribuição de enterotoxinas é

semelhante aos resultados obtidos em um estudo no norte da Colômbia, onde foram utilizadas amostras de isolados clínicos de ETEC de crianças com menos de 5 anos de idade com e sem diarreia (GUERRA et al, 2014). E na Guatemala, em um estudo utilizando isolados de ETEC de crianças de 6 a 36 meses que vivem em uma comunidade rural e de visitantes ocidentais no mesmo local durante as mesmas estações, foram analisadas (TORRES et al, 2015), sugerindo que a tendência deve ser $LT > ST > ST + LT$ (BHAKAT. et al 2018).

A análise dos genes de virulência relacionados às amostras positivas para ETEC, no presente estudo, observou que das 113 amostras, 106 (93,8%) foram positivadas para a presença de pelo menos um dos genes pesquisados. Dentre os genes, os mais prevalentes foram *eatA*, *csuA* e *etpA*, com 31,8%, 24,8 e 12,4% respectivamente.

O gene *eatA* codifica uma protease serina que é comumente encontrada em casos clínicos de ETEC e estudos sugerem que essa proteína é capaz de facilitar a entrada da toxina LT nas células endoteliais (FROEHLICH et al, 2005). Corroborando com o presente estudo, onde o gene *eatA* foi positivo em 31,8% das amostras positivas para ETEC, Bhakat e colaboradores (2018), quando analisaram amostras de fezes de pacientes com diarreia internados entre os anos de 2008 e 2014, em Calcutá, sugerem que o gene *eatA* tem uma maior prevalência (65%) dentre os fatores de virulência não clássicos.

O *csuA* (CS14) e o *cfab* (CFA/I) são fatores de colonização, e foram os FCs mais encontrados, com 24,8% e 8,8% respectivamente. Segundo Nunes e colaboradores (2011), o CS14 foi um dos fatores de colonização mais comuns em Teresina, Brasil, o que corrobora com nosso achado. Em contrapartida, em um estudo realizado por Liu e colaboradores (2017), onde avaliaram populações endêmicas locais e viajantes, detectaram o CFA/I como o FCs mais prevalente.

Entre os genes de virulência não clássicos, o *etpA* que codifica adesina/ invasina, apresentou a prevalência de 12,4%, no nosso estudo. Em cepas isoladas de Bangladesh coletadas entre 1998 e 2011, *eatA* (59%) e *etpA* (56%) estavam presentes em mais da metade dos isolados de ETEC (LUO et al, 2015), apesar deste estudo mostrar uma prevalência de *etpA* mais elevada em sua população, no presente estudo, este gene foi o terceiro mais prevalente. O gene *tia*, também codifica adesina/ invasina, foi detectado em 11,5% das amostras positivas para ETEC, o que condiz com os resultados obtidos por Gonzales e colaboradores (2013), que em cepas de ETEC isoladas de crianças bolivianas com idade <5 anos, o gene *tia* teve prevalência de 12%.

O gene *faeG* e o *csaA* foram os genes de virulência menos prevalentes nesse estudo, com 7,9% e 3,5%, respectivamente. O gene *faeG* é um codificador de adesina fimbrial (subunidade principal FaeG), constituindo a maior parte da estrutura da fimbria e mediando a adesão bacteriana (DUBREUIL et al, 2016). Entretanto, o gene *csaA*, que codifica o FC CS1, quando analisado por Qadri e colaboradores (2005), foi relacionado com uma alta incidência em amostras de ETEC provenientes de crianças de países em desenvolvimento.

A análise das frequências dos genes de virulência dentro dos subtipos específicos de ETEC (LT ou ST) também não mostrou associação significativa com crianças com ou sem diarreia. O limitado número de genes analisados neste estudo pode ter contribuído para tal achado. Além disso, o baixo número de amostras positivas para ETEC-ST também enfraqueceu o poder de análise deste grupo específico de infecções. É importante destacar a necessidade da realização de estudos genômicos para a investigação de genes relacionados a doenças em infecções por ETEC, principalmente devido à alta heterogeneidade e pouco conhecimento sobre a diversidade genética das cepas (SAHL et al, 2017). Além disso, a existência de múltiplos fatores do hospedeiro, como estado nutricional, composição do microbioma e sistema imune, podem interferir nos desfechos clínicos de infecções por ETEC.

Dentro do estudo verificou-se a interação de ETEC com outros patógenos, onde 93,8% das amostras positivas apresentaram pelo menos um copatógeno. O principal copatógeno encontrado foi a bactéria *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC) (63,7%), seguido por *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC) (48,7%). Lima e colaboradores (2018) e Hazen e colaboradores (2016) relatam que EAEC e EPEC, respectivamente, são os principais patógenos relacionados com diarreia infantil, no Brasil e no mundo, o que explica nosso achado. Sapovírus e Astrovírus, foram os menos prevalentes com 1,8% e 0,9%, respectivamente, mas não houve significância.

A prevalência de coinfeções quando analisada entre caso e controle, foi mais maior em crianças do grupo caso. Donnenberg e colaboradores (2015), em um estudo caso-controle de múltiplos locais (GEMS) na África subsaariana e no sul da Ásia, também descobriram que a detecção de enteropatógeno é mais comum em fezes diarreicas do que as não diarreicas. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo MAL-ED realizado na América do Sul, África e Ásia (PLATTS-MILLS et al, 2015). A análise

multivariada em relação aos copatógenos e a sintomatologia apresentada foi avaliada e não houve resultado significativo, o que sugere que os sintomas foram causados por ETEC.

9 CONCLUSÃO

- Este estudo demonstrou que houve associação significativa de diarreia em crianças infectadas pelo patotipo *Escherichia coli* enterotoxigênica no semiárido brasileiro.
- A análise das frequências dos genes de virulência dentro dos subtipos específicos de ETEC (LT ou ST) não mostrou associação significativa com crianças com ou sem diarreia;
- A maior prevalência de coinfeções se dá com EAEC, porém a sua associação não foi significativa.
- A análise de detecção a partir do biomarcador de inflamação intestinal mieloperoxidase, apresentou diferença significativa entre o grupo caso e controle. O grupo caso apresentou maior índice de inflamação do que o grupo controle.
- Verificou-se associação significativa entre os índices antropométricos das crianças positivas para ETEC-LT com o grupo controle.
- O presente estudo vem, portanto, contribuir para uma melhor compreensão da infecção por ETEC em crianças do semiárido brasileiro, por meio de detecção de genes de virulência específicos e da obtenção de dados epidemiológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANANTHA, R. P. et al. Evolutionary and functional relationships of colonization factor antigen and other class 5 adhesive fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 72, p. 7190–7201, 2004.

ARAUJO, Joel M. et al. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. *Journal of clinical microbiology*, v. 45, n. 10, p. 3396-3399, 2007.

ARRIAGA, Y. L.; HARVILLE, B.A.; DREYFUS, L.A. Contribution of individual disulfide bonds to biological action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. **Infection and immunity**, v.63, n. 12, p. 4715-4720, 1995.

BAKER, J.M.; ALONSO, W.J. A vacinação contra o rotavírus leva a assinatura sazonal da diarréia infantil de volta à era pré-saneamento no Brasil. **J Infect** . V. 76, p. 68–77, 2017.

BARTELT, L.A. et al. Persistent *G. lamblia* impairs growth in a murine malnutrition model. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 123, n. 6, p.2672-2684, 2013.

BASU, N.; ARSHAD, N.; VISWESWARIAH, S.S. Receptor guanylyl cyclase C (GC-C): regulation and signal transduction. **Molecular And Cellular Biochemistry**, v. 334, n. 1-2, p.67-80, 2009.

BHAKAT, D. et al. Identification of common virulence factors present in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from diarrhoeal patients in Kolkata, India. **J Appl Microbiol**. V.126, n. 1, p.255-265, 2019.

BINDER, H.J. Pathophysiology of acute diarrhea. **The American Journal Of Medicine**, v. 88, n. 6, p.2-4, 1990.

BLOUNT, Z.D. The unexhausted potential of *E. coli*. **Elife**, v. 4, p.1-12, 2015.

BOLICK, D. T. et al. Critical role of zinc in a new murine model of enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea. **Infection and immunity**, v. 86, n. 7, p. e00183-18, 2018.

BRASIL. **Guia de vigilância em saúde**. 1ª Ed., Brasília: Ministério da saúde, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Diarreia e desidratação. 2015. Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br/dicas-em-saude/2053-diarreia-e-desidratacao-2015>>. Acesso em: 10.09.2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças diarreicas agudas (DDA): causas, sinais e sintomas, tratamento e prevenção. Ago. 2019. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-diarreicas-agudas>> . Acesso em: 10.09.2019.

CARR, J.H. **CDC/ National Escherichia, Shigella, Vibrio Reference Unit at CDC: 10068**. 2006. Disponível em: <<https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=10068>>. Acesso em: 20 maio. 2019.

- CONNELL, T.D. Cholera toxin, LT-I, LT-IIa and LT-IIb: the critical role of ganglioside binding in immunomodulation by Type I and Type II heat-labile enterotoxins. **Expert Review Of Vaccines**, v. 6, n. 5, p.821-834, 2007.
- COUTINHO, B.P. et al, *Cryptosporidium* Infection Causes Undernutrition and, Conversely, Weanling Undernutrition Intensifies Infection. **Journal Of Parasitology**, v. 94, n. 6, p.1225-1232, 2008.
- CROXEN, M. A. et al. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p.822-880, 2013.
- CROXEN, M. A.;FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 26. 2010.
- CRYAN, B. Comparison of three assay systems for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n.4, p. 792-794. 1990.
- DEL CANTO, F., et al. Distribuição de genes de virulência clássicos e não clássicos em isolados de *Escherichia coli* enterotoxigênicos de crianças chilenas e triagem de genes de tRNA para locais de inserção putativos para ilhas genômicas . *J Clin Microbiol* 49 , 3198 – 3203, 2011.
- DHAMA, K. et al. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. **Veterinary Research Communications**, v. 33, n. 1, p.1-23, 2008.
- DONNENBERG MS, HAZEN TH, FARAG TH, et al. Bacterial Factors Associated with Lethal Outcome of Enteropathogenic *Escherichia coli* Infection: Genomic Case-Control Studies. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 9, e. 5, 2015.
- DUBREUIL J.D.; ISAACSON R.E.; SCHIFFERLI D.M. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **EcoSal Plus**. v.7, p.0006-2016, 2016
- DUBREUIL, J. D.; ISAACSON, Richard E.; SCHIFFERLI, D.M. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Ecosal Plus**, v. 7, n. 1, p.1-80, 2016.
- DUPONT, H. L. Acute Infectious Diarrhea in Immunocompetent Adults. **New England Journal Of Medicine**, v. 370, n. 16, p.1532-1540, 2014.
- ELSINGHORST, E. A.; WEITZ, J. A. Epithelial cell invasion and adherence directed by the enterotoxigenic *Escherichia coli* tib locus is associated with a 104-kilodalton outer membrane protein. **Infection and immunity**, v. 62, n. 8, p. 3463-3471, 1994.
- EVANS JR, D.J.; EVANS, D.G. *Escherichia coli* in diarrheal disease. In: **Medical Microbiology**. 4th edition. University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
- FAN, X.; SELLIN, J. H. Review article: small intestinal bacterial overgrowth, bile acid malabsorption and gluten intolerance as possible causes of chronic watery diarrhoea. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 29, n. 10, p.1069-1077, 2009.

- FEWTRELL, L.; COLFORD, J.M. Water, sanitation and hygiene in developing countries: interventions and diarrhoea—a review. **Water Science And Technology**, v. 52, n. 8, p.133-142, 2005.
- FITZWATER, S.; et al. **Infectious Diarrhea. Water and Sanitation-Related Diseases and the Changing Environment: Challenges, Interventions, and Preventive Measures**, c. 7, p. 63-93. 2019.
- FRICKMANN, H.; et al. PCR for enteric pathogens in high-prevalence settings. What does a positive signal tell us? **Infectious Diseases**, [s.l.], v. 47, n. 7, p.491-498, 2015.
- FROEHLICH, B.; et al. The pCoo Plasmid of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Is a Mosaic Cointegrate. **Journal Of Bacteriology**, 2005.
- FROST, L. S. et al. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 9, p.722-732, 2005.
- GAASTRA W, SVENNERHOLM AM. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends Microbiol.*, v. 11, p. 444-52,1996.
- GIANNELLA, R. A; DRAKE, K. W.; LUTRELL. M. Developmet of a radioimmunoassay for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin: comparasion with the suckling mouse bioassay. **Infection Immunity**, v. 33, p. 677-682, 1981.
- GONZALES, L, et al. Prevalence, seasonality and severity of disease caused by pathogenic *Escherichia coli* in children with diarrhoea in Bolivia. **Journal of medical microbiology**, v. 62, p 11, 2013.
- GUERRA, JA, et al. Caracterização fenotípica e genotípica de isolados clínicos de *Escherichia coli* enterotoxigênicos do norte da Colômbia, América do Sul . **Biomed Res Int.**, 2014.
- GUERRANT, R. L.; et al. The impoverished gut—a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, n. 4, p.220-229, 2012.
- GUERRANT, R.L.; et al. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. **Nutrition Reviews**, v. 66, n. 9, p.487-505, 2008.
- HARVILLE, B.A.; DREYFUS, L.A. Involvement of 5-hydroxytryptamine and prostaglandin E2 in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. **Infection and immunity**, v. 63., n. 3, p. 745-750, 1995.
- HAZEN TH, DONNENBERG MS, PANCHALINGAM S, et al. Genomic diversity of EPEC associated with clinical presentations of differing severity. **Nat Microbiol.** 1:15014, 2016.
- HENRY, F.J.; RAHIM, Z. Transmission of diarrhoea in two crowded areas with different sanitary facilities in Dhaka, Bangladesh. **The Journal of tropical medicine and hygiene**, v. 93, n. 2, p. 121-126, 1990.

HILL, D.R.; BEECHING, N.J. Travelers' diarrhea. **Curr Op Infect Dis**, v. 23, n. 40, p. 481-487. 2010

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

HONDA, T.; et al. Further evaluation of the Biken test (modified Elek test) for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* producing heat-labile enterotoxin and application of the test to sampling of heat-stable enterotoxin. **Journal of clinical microbiology**, v. 16, n.1, p. 60-62, 1982.

INGERSON-MAHAD; M. R.; A. *E. coli*: good, bad & deadly. **American Academy of Microbiology**, p. 113, 2011.

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

IŞERI, L.; et al. The prevalence of enterotoxigenic *E. coli* isolated from the stools of children aged 0-10 years with diarrhea in mid-anatolia region, Turkey. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 42, n. 1, p.243-247, 2011.

ISIDEAN, SD , RIDDLE, MS , SAVARINO, SJ E PORTER, CK. Uma revisão sistemática da epidemiologia do ETEC com foco no fator de colonização e na expressão de toxinas . **Vacina 29** , 6167 – 6178, 2011.

ITO, T.; KUWAHARA, S.; TOYOTA, T. Automatic and manual latex agglutination tests for measurement of cholera toxin and heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 17, n.1, p.7-12, 1983.

JAFARI, A.; ASLANI, M. M.; BOUZARI, S. *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. **Iranian journal of microbiology**, v., n.3, 102-16, 2012.

JOFFRÉ, E.; et al. Identification of new heat-stable (STa) enterotoxin allele variants produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **International Journal Of Medical Microbiology**, v. 306, n. 7, p.586-594, 2016.

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

KEUSCH, G.T., et al. Diarrheal diseases. In: chapter 4, Diarrheal Diseases. 3 ed. V. 2, 2016.

KHALIL, I., et al. Morbidity and mortality due to shigella and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea: the Global Burden of Disease Study 1990–2016. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p.1229-1240, 2018.

KOSEK, M.; BERN, C.; GUERRANT, R. L. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bulletin of the world health organization**, v. 81, p. 197-204. 2003.

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, p. 209 – 222, 2013.

LAU D 1 , BALDUS S . Mieloperoxidase e seu papel contributivo na doença vascular inflamatória. **Pharmacol Ther.** Julho de 2006 ; 111 (1): 16-26, 2006.

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.; FONTELES, M.C. From *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to mammalian endogenous guanylin hormones. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 47, n. 3, p.179-191, 2014.

LIMA, A.A.M; SOARES, A.M.; FILHO, J.Q.S.; HAVT A, LIMA, I.F.N.; LIMA, N.L, et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* Subclinical Infection and Coinfections and Impaired Child Growth in the MAL-ED Cohort Study. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**; 66(2):325–333, 2018.

LIU J, SILAPONG S, JEANWATTANALERT P, LERTSEHTAKARN P, BODHIDATTA L, SWIERCZEWSKI B, et al. Multiplex real time PCR panels to identify fourteen colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **PLoS ONE** 12(5), 2017.

LUO Q, QADRI F, KANSAL R, RASKO DA, SHEIKH A, FLECKENSTEIN JM. Conservation and immunogenicity of novel antigens in diverse isolates of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 9(1):e0003446, 2015.

MACDONALD, E. et al. An outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infection in Norway, 2012: a reminder to consider uncommon pathogens in outbreaks involving imported products. **Epidemiology And Infection**, v. 143, n. 3, p.486-493, 2014.

MENDES, P.S.; RIBEIRO, H.D.A.C; MENDES, C.M. 2013. Temporal trends of overall mortality and hospital morbidity due to diarrheal disease in Brazilian children younger than 5 years from 2000 to 2010. **J Pediatr**, v.89, p. 315–325, 2013.

MIRHOSEINI, A.; AMANI, J.; NAZARIAN, S. Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic *Escherichia coli* and vaccines against it. **Microbial Pathogenesis**, v. 117, p.162-169, abr. 2018.

MOORE, S.R. et al. Prolonged episodes of acute diarrhea reduce growth and increase risk of persistent diarrhea in children. **Gastroenterology**, v. 139, n. 4, p.1156-1164, 2010.

MORAES, A.C.; CASTRO, Fernando, M.M. Diarreia aguda. **J Bras Med.**, p. 41-50, 2012.

MOTTA, M.E.F.; SILVA, G.A.P. Diarreia por parasitas. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 2, n. 2, p.117-127, 2002.

- NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, v.11, n.1, p. 142-201, 1998.
- NUNES, M.R. et al., *Escherichia coli* enterotoxigênica em crianças com diarreia aguda e controles em Teresina / PI, Brasil: distribuição de genes da enterotoxina e do fator de colonização . **J Appl Microbiol**, v. 111, p. 224 – 232, 2011
- ORI, E.L; TAKAGI, E.H.; ANDRADE, T.S., et al. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* in Brazil: pathotypes and serotypes over a 6-year period of surveillance [published online ahead of print, 2018 Sep 19]. **Epidemiol Infect.**; v.147, p.1–9, 2018.
- PATEL, S.K. et al. Identification and molecular characterization of EatA, an autotransporter protein of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, v. 72, n. 3, p. 1786-1794, 2004.
- PENGPENG, X. et al. F4+ enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) adhesion mediated by the major fimbrial subunit *FaeG*. **Journal of Basic Microbiology**, v.55, n.9, p. 1118-1124, 2015.
- PENNINGTON, H. *Escherichia coli* O157. **The Lancet**, v. 376, n. 9750, p.1428-1435, 2010.
- PLATTS-MILLS, J.A.; et al. Use of quantitative molecular diagnostic methods to assess the aetiology, burden, and clinical characteristics of diarrhoea in children in low-resource settings: a reanalysis of the MAL-ED cohort study. **Lancet Glob Health**. 2018.
- PLATTS-MILLS, J.A.; MAL-ED Network Investigators. Pathogen-specific burdens of community diarrhea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). **Lancet Glob Health**, v. 3, n. 9, p. 564-575, 2015
- QADRI, F, et al. M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* diarrhea, Bangladesh, 2004. **Emerging infectious diseases**, v.11, n. 7, 1104, 2005.
- QADRI, F. et al. Disease Burden Due to Enterotoxigenic *Escherichia coli* in the First 2 Years of Life in an Urban Community in Bangladesh. **Infection And Immunity**, v. 75, n. 8, p.3961-3968, 2007.
- QADRI, F. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 3, p.465-483, 2005.
- RASHEED, J. K.; GUZMÁN-VERDUZCO, L.; KUPERSZTOCH, Y. M. Two precursors of the heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: evidence of extracellular processing. **Molecular Microbiology**, v. 4, n. 2, p.265-273, 1990.
- RIDDLE, M.S; DUPONT, H.L; CONNOR, B. ACG Clinical Guideline: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Acute Diarrheal Infections in Adults. **American Journal Of Gastroenterology**, v. 111, n. 5, p.602-622, 2016.

- ROCHE, J.K. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) Impairs Growth while Malnutrition Worsens EAEC Infection: A Novel Murine Model of the Infection Malnutrition Cycle. **The Journal Of Infectious Diseases**, v. 202, n. 4, p.506-514, 15, 2010.
- RODRIGUEZ, G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. **Salud pública Méx**, v. 44, n.5, p. 10-11, 2002.
- ROY, K. et al. The EtpA exoprotein of enterotoxigenic *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and is a protective antigen in an experimental model of murine infection. **Infection and immunity**, v. 76, n. 5, p. 2106-2112, 2008.
- SAHL JW, SISTRUNK JR, BABY NI, et al. Insights into enterotoxigenic *Escherichia coli* diversity in Bangladesh utilizing genomic epidemiology. **Sci Rep.**, 7(1):3402, 2017.
- SCHULTSZ, C. et al. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 32, n.10, p. 2393-2397, 1994.
- SCOTLAND, S.M.; RICHMOND, J.M.; ROWE, B. Adhesion of enteropathogenic strains of *Escherichia coli* (EPEC) to HEp-2 cells is not dependent on the presence of fimbriae. **Fems Microbiology Letters**, v. 20, n. 2, p.191-195,1983.
- SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 1, p. 167-215, 1996.
- SECRETÁRIA DE ESTADO DA SAÚDE PARAÍBA, Boletim epidemiológico. Coordenação de vigilância epidemiológica, ano I N°. 012006, p. 1-8, out. 2006.
- SHEIKH, I.A.; AMMOURY, R.; GHISHAN, F.K.. Pathophysiology of Diarrhea and Its Clinical Implications. **Physiology Of The Gastrointestinal Tract**, p.1669-1687, 2018.
- SO, M.; MCCARTHY, B. J. Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 77, n. 7, p. 4011-4015, 1980.
- SOLI, K.W., et al. Detection of enteric viral and bacterial pathogens associated with paediatric diarrhoea in Goroka, Papua New Guinea. **International Journal Of Infectious Diseases**, v. 27, p.54-58, 2014.
- SOUSA, C.P. *Escherichia coli* as a specialized bacterial pathogen. **Revista de biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n.2, p. 102-112, 2006.
- SVENNERHOLM, A.; HOLMGREN, J. Identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM1-ELISA) procedure. **Current Microbiology**, v. 1, n. 1, p.19-23, 1978.
- TAGHADOSI, R.; et al. Antibiotic resistance, ESBL genes, integrons, phylogenetic groups and MLVA profiles of *Escherichia coli* pathotypes isolated from patients with

diarrhea and farm animals in South-east of Iran. **Comp immunol microbiol infect dis.**, v. 63, p.117-126, 2019.

TEIXEIRA JC1, HELLER L. Impact of water supply, domiciliary water reservoirs and sewage on faeco-orally transmitted parasitic diseases in children residing in poor areas in Juiz de Fora, Brazil. **Epidemiol Infect.**, 134(4):694-8, 2006.

THIAM, S. et al. Prevalence of diarrhoea and risk factors among children under five years old in Mbour, Senegal: a cross-sectional study. **Infectious Diseases Of Poverty**, v. 6, n. 1, p.1-17, 2017.

TORRES OR, GONZÁLEZ W, LEMUS O, et al. Toxinas e fatores de virulência de *Escherichia coli* enterotoxigênicos associados a cepas isoladas de crianças indígenas e visitantes internacionais de uma comunidade rural da Guatemala. **Epidemiol Infect**, 143 (8), 2015.

TRABULSI, L.R.; KELLER, R.; GOMES, T.A.T. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p.508-513, 2012 .

VIDAL, J.E., et al. Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Salud publica de Mexico**, v. 49, n. 5, p. 376-386. 2007.

WALKER, C.L.F. et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. **The Lancet**, v. 381, n. 9875, p.1405-1416, 2013.

WANG, H. et al. Heat-Stable Enterotoxins of Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Their Impact on Host Immunity. **Toxins**, v. 11, n. 1, p.24-40, 2019.

WANG, W.; ZIJLSTRA, R.T.; GÄNZLE, M.G. Identification and quantification of virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* by high-resolution melting curve quantitative PCR. **Bmc Microbiology**, v. 17, n. 1, p.1-10, 2017.

WHO – WORD HEALTH ORGANIZATION; UNICEF. Integrated global action plan for the prevention and control of pneumonia and diarrhoea. **Geneva: World Health Organization/New York: United Nations Children’s Fund**, 2013.

WHO MULTICENTRE GROWTH REFERENCE STUDY GROUP, et al. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. **Acta paediatrica Supplement**, v. 450, n. 76, 2006.

WIEDERMANN, U.; KOLLARITSCH H. Vaccines against traveler’s diarrhea and rotavirus disease – a review. **Wein Klin Wochenscher**; v. 118, p. 2-8, 2006.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 338/09

Fortaleza, 20 de novembro de 2009

Protocolo COMEPE nº 238/05

Pesquisador responsável: Aldo Ângelo Moreira Lima

Dept^o./Serviço: Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFC

Título do Projeto: "Intervenção com micronutrientes e impacto a longo prazo no Brasil - Subprojeto 2A"

Levamos ao conhecimento de V.S^a . que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará — COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde — Ministério da Saúde, Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou a realização do subprojeto 2A na reunião do dia 19 de novembro de 2009 nas cidades de Crato, Picos, Cajazeiras, Sousa, Limoeiro e Pacajus cujas declarações de anuência foram apresentadas.

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

Atenciosamente,



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

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

Nome do Participante _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

O que estamos tentando descobrir:

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

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

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

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

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

O que acontecerá:

Existem duas partes para este estudo:

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

Benefícios:

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

ANEXO C - Checklist de elegibilidade etiologia de diarreia do semiárido.RECODISA: *Estudo da Etiologia de Diarreia Infantil no Semiárido Brasileiro*

CHECKLIST DE ELEGIBILIDADE ETIOLOGIA DE DIARREIA DO SEMI-ÁRIDO		<div style="border: 2px solid black; width: 100px; height: 80px; margin: 0 auto;"></div>	
Caso não exista resposta para alguma pergunta, escreva ND como resposta.			
#	Questão	Código ou Dado	Resposta
01	Sua criança reside atualmente em qual cidade? CASO NÃO RESIDA EM ALGUMA DAS OPÇÕES AO LADO, EXCLUIR DO ESTUDO.	Crato, CE; Pacajus, CE; Limoeiro do Norte, CE; Ouricuri, PE; Picos, PI; Cajazeiras, PB; Sousa, PB; Patos, PB.	_____
02	Sua criança já participou desse mesmo estudo antes? SE SIM, EXCLUIR DO ESTUDO	1=sim; 2=não	<input type="checkbox"/>
03	Existe alguma criança da família participando desse mesmo estudo? SE SIM, EXCLUIR DO ESTUDO	1=sim; 2=não	<input type="checkbox"/>
04	Sua criança esteve internada em alguma unidade de saúde por mais de 12 horas? SE SIM, EXCLUIR DO ESTUDO	1=sim; 2=não	<input type="checkbox"/>
05	Sua criança veio transferida de algum outro hospital? SE SIM, EXCLUIR DO ESTUDO	1=sim; 2=não	<input type="checkbox"/>
06	Sua criança tomou antibiótico nos últimos 30 dias? SE SIM, EXCLUIR DO ESTUDO	1=sim; 2=não	<input type="checkbox"/>

Nome Entrevistador: _____

Assinatura: _____

Data:

_____/_____/_____