



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

**ANA KAROLINA SILVA DOS SANTOS**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*  
ENTEROPATOGÊNICA (EPEC) E CRIANÇAS DESNUTRIDAS RESIDENTES  
EM FORTALEZA-CEARÁ, BRASIL: UM ESTUDO CASO-CONTROLE**

**FORTALEZA**

**2022**

**ANA KAROLINA SILVA DOS SANTOS**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*  
ENTEROPATOGÊNICA (EPEC) E CRIANÇAS DESNUTRIDAS RESIDENTES  
EM FORTALEZA-CEARÁ, BRASIL: UM ESTUDO CASO-CONTROLE**

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

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

**FORTALEZA**

**2022**

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)

---

- S233a Santos, Ana Karolina Silva dos.  
Associação entre cepas de Escherichia coli (EPEC) e crianças desnutridas residentes em Fortaleza-Ceará, Brasil: Um estudo caso-controle. / Ana Karolina Silva dos Santos. – 2022.  
76 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.
1. Escherichia coli. 2. Desnutrição. 3. Virulência. 4. Diarreia. I. Título.

CDD 616.9

---

**ANA KAROLINA SILVA DOS SANTOS**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*  
ENTEROPATOGÊNICA (EPEC) E CRIANÇAS DESNUTRIDAS RESIDENTES  
EM FORTALEZA-CEARÁ, BRASIL: UM ESTUDO CASO-CONTROLE**

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

Aprovada em: 30/04/2021.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima (Orientador)

Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cecília Leite Costa

Centro Universitário Christus - UNICHRISTUS

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Orleânicio Gomes Ripardo de Azevedo

Faculdade de Medicina Estácio de Canindé

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento

Universidade Estadual do Ceará – UECE

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Maurício Fraga Van Tilburg

Universidade Federal Rural do Semi-árido – UNIFERSA

“A Deus, obrigada por tudo!”

Aos meus pais, Josenira Costa e Mário Filho, que mesmo estando distantes,  
transmitiram amor e cuidado durante toda a minha vida.

À minha tia Perpétua, que sempre me apoiou e incentivou ao longo dessa caminhada.

À todos os meus familiares e amigos que contribuíram para este trabalho.

Obrigada!

## **AGRADECIMENTO**

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

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

Aos professores participantes da banca examinadora Cecília Leite, Nilberto Nascimento, Orleânco Ripardo e Maurício Fraga pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Alexandre Havt, pelos momentos em que se dedicou a me auxiliar durante a execução da pesquisa.

Aos meus amigos de laboratório, Herlice Veras, Marília Maia, Rafaela Pankov, Natália Kelly, Mariana Bona, Thiago Freitas, Cléber Ferreira, Priscilla Souto, Ivna Viana. Muito obrigada por sempre estarem dispostos, prestativos e atenciosos a me ajudar. Pela amizade, apoio, sabedoria, paciência e por todo o conhecimento transmitido. Vocês foram fundamentais para este trabalho.

Á toda a família do Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI) pela grande amizade, convivência e troca de experiência.

Aos demais pós-graduandos, alunos de iniciação científica e voluntários do Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI), da Unidade de Pesquisas Clínicas Instituto de Biomedicina (UPC/IBIMED), da UFC, pela companhia, carinho, incentivo e apoio principalmente nas extrações de DNA e nas reações de PCR.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**A todos... Muito Obrigada!**

“Nenhum saber é saber completo.”

(Galileu Galilei)



## RESUMO

**Introdução:** *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) é uma das principais causas de diarreia em crianças de países em desenvolvimento e apresenta alta taxa de variabilidade genética. **Objetivo:** caracterizar a distribuição dos genes relacionados à virulência de EPEC e copatógenos em associação com déficit físico, enteropatia, diarreia e deficiência de micronutrientes em crianças residentes na cidade de Fortaleza-CE. **Material e Métodos:** um estudo caso-controle de desnutrição foi realizado em 402 crianças de 6-24 meses de idade na cidade de Fortaleza, CE/Brasil. Este estudo fez parte de um estudo multicêntrico intitulado “Etiologia, Fatores de Risco e Interações de Infecções Entéricas e Desnutrição e as Consequências para a Saúde Infantil”, ou estudo MAL-ED. Os casos foram definidos como crianças desnutridas através do índice de escore Z de baixo peso para idade (WAZ <-2) e os controles foram definidos como crianças nutridas pelo escore Z (WAZ ≥ -1) de baixo peso para idade. Amostras dessas crianças foram coletadas e os dados antropométricos e epidemiológicos foram identificados de cada criança. Foi realizada extração de DNA bacteriano oriundas de amostras fecais de 402 crianças, no período de agosto de 2010 a maio de 2013. A detecção de EPEC foi realizada através de PCR multiplex, por meio dos genes *eaeA* e *bfpA*. Uma ampla avaliação molecular de enteropatógenos foi realizada, e as crianças positivas para EPEC foram investigadas para 18 genes de virulência (VGRs) usando cinco painéis de PCRs multiplex. **Resultados:** EPEC foi detectada em 30.3% da população do estudo, com proporções semelhantes entre casos e controles. Infecções por aEPEC apresentaram maior prevalência 67.2% (82/122). Crianças infectadas com EPEC mostraram valores de WHZ significativamente mais baixos do que crianças sem infecção por EPEC (p=0.0495). O gene de virulência *espD*, um translocador de proteínas do T3SS, foi associado (p=0.0001) a desnutrição em crianças positivas para EPEC. Os genes *espD*, *nleBe* *ler* (p= 0.0001; p=0.0004; p=0.0018), foram associados a crianças positivas para aEPEC. *Campylobacter spp.* Foi associada ao grupo caso em crianças com EPEC por uma análise univariada (p=0.0290; OR=0.22; IC95%=0.05-0.082). A presença dos biomarcadores MPO (p=0.0078) e CD14s (p=0.0001) foram associados ao grupo controle. **Conclusão:** aEPEC apresentou uma elevada prevalência; EPEC apresentou uma diminuição em HAZ comparado com crianças sem infecção; Coinfecção de *Campylobacter ssp.* foi associada com desnutrição.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*. Desnutrição. Virulência. Diarreia.

## ABSTRACT

**Introduction:** Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is one of the main causes of diarrhea in children in developing countries and has a high rate of genetic variability. **Objective:** to characterize the distribution of genes related to EPEC virulence and copathogens in association with physical deficit, enteropathy, diarrhea and micronutrient deficiency in children living in the city of Fortaleza-CE. **Material and Methods:** a case-control study of malnutrition was carried out in 402 children aged 6-24 months in the city of Fortaleza, CE/Brazil. This study was part of a multicenter study entitled “Etiology, Risk Factors and Interactions of Enteric Infections and Malnutrition and the Consequences for Child Health”, or the MAL-ED study. Cases were defined as malnourished children using the underweight-for-age Z-score index ( $WAZ < -2$ ) and controls were defined as nourished children using the underweight-for-age Z-score ( $WAZ \geq -1$ ) index. Samples from these children were collected and anthropometric and epidemiological data were identified for each child. Bacterial DNA extraction from fecal samples of 402 children was performed, from August 2010 to May 2013. EPEC detection was performed using multiplex PCR, using the *eaeA* and *bfpA* genes. A comprehensive molecular evaluation of enteropathogens was performed, and EPEC-positive children were investigated for 18 virulence genes (VGRs) using five panels of multiplex PCRs. **Results:** EPEC was detected in 30.3% of the study population, with similar proportions between cases and controls. aEPEC infections had a higher prevalence 67.2% (82/122). Children infected with EPEC showed significantly lower WHZ values than children without EPEC infection ( $p=0.0495$ ). The *espD* virulence gene, a T3SS protein translocator, was associated ( $p=0.0001$ ) with malnutrition in EPEC-positive children. The genes *espD*, *nleBe* and *ler* ( $p=0.0001$ ;  $p=0.0004$ ;  $p=0.0018$ ), were associated with aEPEC-positive children. *Campylobacter* spp. It was associated with the case group in children with EPEC by a univariate analysis ( $p=0.0290$ ;  $OR=0.22$ ;  $95\%CI=0.05-0.082$ ). The presence of biomarkers MPO ( $p=0.0078$ ) and CD14s ( $p=0.0001$ ) were associated with the control group. **Conclusion:** aEPEC had a high prevalence; EPEC showed a decrease in HAZ compared to children without infection; Coinfection of *Campylobacter* ssp. was associated with malnutrition.

**Keywords:** *Escherichia coli*. Malnutrition. Virulence. Diarrhea.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Ciclo vicioso	21
<b>Figura 2</b> - Contribuição dos elementos genéticos móveis para evolução de <i>E. coli</i> patogênica	23
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática dos três estágios de patogênese de EPEC	28
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática do Sistema de Secreção do Tipo III T3SS	29
<b>Figura 5</b> - Estágio da infecção por EPEC e a interação entre intimina/ <i>Tir</i>	30
<b>Figura 6</b> - Fatores de Virulência e suas funções na patobiologia da infecção por EPEC	31

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Escores-Z antropométrico utilizados para avaliar o estado nutricional	23
<b>Tabela 2 -</b>	Descrição dos genes relacionados à virulência utilizados no estudo	40
<b>Tabela 3 -</b>	Genes de virulência investigados do estudo com suas respectivas funções elucidadas	43
<b>Tabela 4 -</b>	Prevalência de genes de diagnóstico de EPEC entre nutridos e desnutridos	46
<b>Tabela 5 -</b>	Características da população do estudo entre nutridos e desnutridos positivos para EPEC	47
<b>Tabela 6 -</b>	Caracterização clínica da população do estudo entre os grupos do estudo	48
<b>Tabela 7 -</b>	Positividade dos fatores de virulência entre os grupos caso e controle	50
<b>Tabela 8 -</b>	Distribuição dos genes de virulência entre as crianças positivas para tEPEC e aEPEC	51
<b>Tabela 9 -</b>	Distribuição de copatógenos em crianças nutridas e desnutridas	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

<b>espC</b>	Gene codificador da entero toxina <i>espC</i>
<b>espD</b>	Proteína efetora secretada pelo T3SS
<b>espG</b>	Proteína efetora (destruição de microtúbulos e ruptura de tight junctions)
<b>espH</b>	Proteína efetora (polimerização de actina)
<b>espJ</b>	Inibe fagocitose
<b>espP</b>	Gene que codifica a serina protease extracelular; autotransportadora
<b>espZ</b>	Bloqueador de translocação de efetores de T3SS
<b>ETEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
<b>F</b>	Primer senso
<b>HAZ</b>	Altura-por-idade (height-for-age)
<b>IMC</b>	Índice de massa corporal
<b>LDI</b>	Laboratório de Doenças Infecciosas
<b>LEE</b>	Locus of enterocyte effacement
<b>Ler</b>	Gene regulador de proteína
<b>LT</b>	Termolábil
<b>MAL-ED</b>	Study of Malnutrition and Enteric Diseases
<b>map</b>	Proteína efetora da <i>E. coli</i> enteropatogênica
<b>nleB</b>	Gene que codifica a proteína não-LEE efetora B
<b>nleC</b>	Gene que codifica a proteína não-LEE efetora C
<b>nleD</b>	Gene que codifica a proteína não-LEE efetora D

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

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>Cm</b>	Centímetros
<b>G</b>	Gramas
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>H</b>	Horas
<b>Kg</b>	Quilogramas
<b>µg</b>	Microgramas
<b>µL</b>	Microlitros
<b>Mg</b>	Miligramas
<b>mL</b>	Mililitros
<b>Ng</b>	Nanogramas
<b>Pb</b>	Pares de base
<b>%</b>	Porcentagem



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>22</b>
<b>2.1</b>	<b>DESNUTRIÇÃO INFANTIL: impacto no mundo e no Brasil</b>	<b>22</b>
<b>2.2</b>	<b><i>ESCHERICHIA COLI</i></b>	<b>26</b>
<b>2.3</b>	<b><i>Escherichia coli</i> enteropatogênica</b>	<b>26</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Definição, classificação e diagnóstico</b>	<b>27</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Epidemiologia</b>	<b>28</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Patogênese</b>	<b>30</b>
<b>2.3.4</b>	<b>Fatores de virulência de EPEC</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Objetivo Geral</b>	<b>39</b>
<b>4.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>40</b>
<b>5.1</b>	<b>População do Estudo</b>	<b>41</b>
<b>5.2</b>	<b>Descrição do Estudo e Considerações Éticas</b>	<b>41</b>
<b>5.3</b>	<b>Coleta de Dados</b>	<b>41</b>
<b>5.4</b>	<b>Isolamento das Cepas Bacterianas</b>	<b>42</b>
<b>5.5</b>	<b>Extração de DNA bacteriano</b>	<b>42</b>
<b>5.6</b>	<b>Quantificação do DNA extraído</b>	<b>43</b>

<b>5.7</b>	<b>Diagnóstico Molecular de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC)</b>	<b>44</b>
<b>5.8</b>	<b>Avaliação de Genes de Virulência</b>	<b>44</b>
<b>5.9</b>	<b>Análise de coinfeção</b>	<b>44</b>
<b>5.10</b>	<b>Detecção de Biomarcadores de Inflamação</b>	<b>45</b>
<b>5.11</b>	<b>Análise Estatística dos Dados</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>55</b>
<b>6.1</b>	<b>Caracterização da população do estudo e prevalência de EPEC</b>	<b>56</b>
<b>6.2</b>	<b>Caracterização Clínica</b>	<b>61</b>
<b>6.3</b>	<b>Distribuição dos genes de virulência entre os grupos nutridos e desnutridos</b>	<b>63</b>
<b>6.4</b>	<b>Distribuição de Copatógenos</b>	<b>64</b>
<b>6.5</b>	<b>Análise de Biomarcadores</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>73</b>



## 1. INTRODUÇÃO

As infecções entéricas são de grande importância para a saúde pública mundial, caracterizando-se pela ruptura da barreira intestinal a partir da ação de bactérias, vírus ou parasitas, e estima-se que um terço das crianças de países em desenvolvimento é acometido por infecções entéricas, com ou sem eventos diarreicos envolvidos (GUERRANT *et al.*, 2013). Quando associadas a eventos diarreicos, é considerada a segunda causa de morte em crianças abaixo de cinco anos em todo o mundo (LAMBERTI *et al.*, 2012).

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

As relações causais entre infecção e desnutrição foram confirmadas em modelos animais, onde infecções entéricas com patógenos como *Cryptosporidium* ou *Escherichia coli* enteroagregativa causam enteropatia e crescimento retardado. Este ciclo vicioso é frequentemente relacionado à disfunção entérica ambiental, condição caracterizada por um conjunto de alterações inespecíficas do intestino delgado sem manifestações clínicas evidentes, que afetam crianças provenientes de famílias com baixo nível socioeconômico com elevada taxa de contaminação ambiental, ausência de saneamento básico, ingestão alimentar deficiente e desmame precoce (FAGUNDES-NETO *et al.*, 2003; GUERRANT *et al.*, 2013). Neste contexto, emerge também a necessidade da mudança do tipo de problema a ser investigado. Em vez de focar atenção para diarreia, a colonização intestinal por patógenos parece causar danos silenciosos, por vezes assintomáticos, até pouco tempo não desvendados (BARTELT *et al.*, 2013).

O impacto a longo prazo das doenças diarreicas e infecções entéricas na população infantil tem sido cada vez mais investigado. Vários estudos têm mostrado uma contribuição importante do microbioma intestinal para as consequências das infecções entéricas e desnutrição (BLANTON *et al.*, 2016; LINDSAY *et al.*, 2015; MILLION *et al.*, 2017). A ocorrência de diarreias persistentes e algumas infecções entéricas assintomáticas nos primeiros anos de vida podem prejudicar o crescimento da

criança, bem como o seu desenvolvimento físico e cognitivo. (BERKAMAN, 2002; NIEHAUS, 2002; FISCHER, 2012). Estudos sugerem ainda que crianças com crescimento prejudicado e repetidas infecções entéricas são mais propícias a desenvolver obesidade e comorbidades cardiovasculares (DEBOER *et al.*, 2012; GUERRANT *et al.*, 2013). Ainda, doenças diarreicas geram uma elevada demanda sobre os serviços ambulatoriais e, secundariamente, sobrecarregando a rede hospitalar (VASCONCELOS *et al.*, 2008). Neste sentido, o impacto econômico destas condições é aparentemente negligenciado (BARTELT *et al.*, 2013).

Neste contexto, o projeto internacional multicêntrico “Etiologia, Fatores de Risco e Interações de Infecções Entéricas e Desnutrição, e as Consequências para a Saúde Infantil: Um consórcio global para o estudo da Desnutrição e Doenças Entéricas” (do inglês “Etiology, Risk Factors, and Interactions of Enteric Infections and Malnutrition and the Consequences for Child Health; A Global Consortium for the Study of Malnutrition and Enteric Diseases, MAL-ED”) foi desenvolvido com o objetivo de investigar efeitos da desnutrição, infecção entérica e mecanismos associados no impacto do desenvolvimento infantil físico, cognitivo e imunológico (Investigadores do MAL-ED *et al.*, 2014).

Considerando a importância da EPEC na etiologia das infecções entéricas e a necessidade de elucidar o impacto deste patógeno em crianças com quadro clínico não relacionado à diarreia moderada a severa, foram necessários estudos de associação de determinantes genéticos com dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos a fim nestas populações.

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

Tendo em vista o papel da *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) nas doenças diarreicas na população infantil, torna-se de fundamental importância do estudo desse patógeno. Este trabalho teve como base determinar as associações entre determinantes genéticos de EPEC em crianças do estudo MAL-ED, assim como avaliar o impacto da infecção por EPEC em crianças nutridas e desnutridas e investigar a importância de

alguns fatores de virulência na indução da desnutrição de EPEC, ajudando a entender o curso da infecção.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

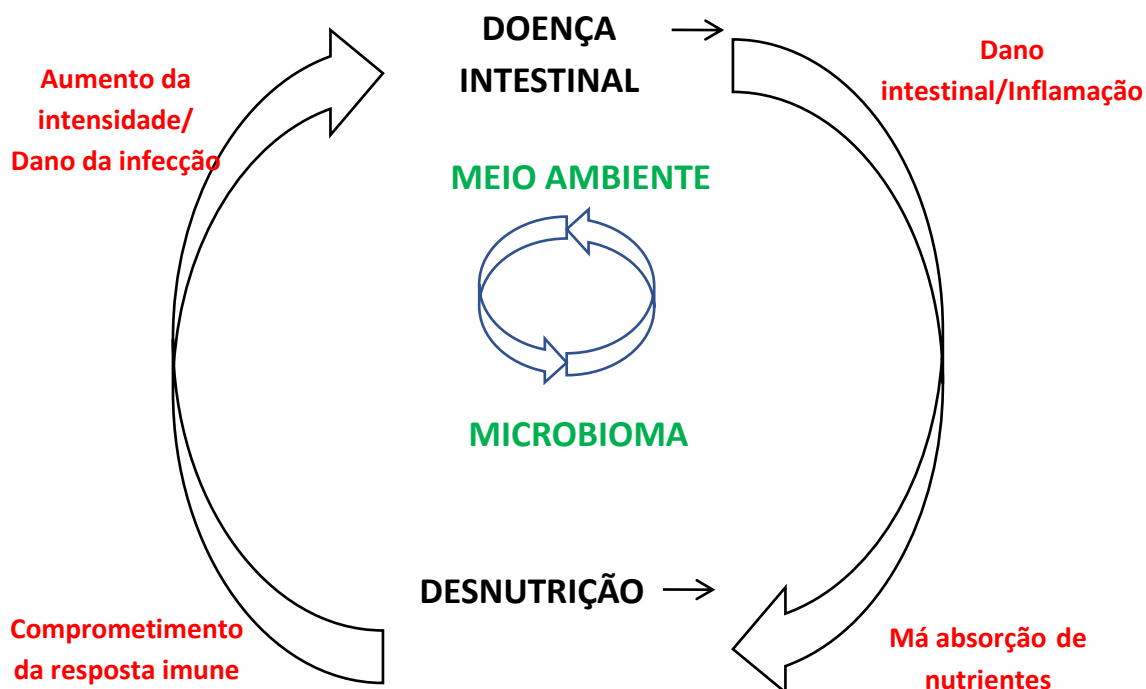
### 2.1 DESNUTRIÇÃO INFANTIL: Impacto no mundo e no Brasil

A nutrição é um fator importante para uma boa saúde. Nos países em desenvolvimento, a desnutrição infantil é o principal problema de saúde pública e uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil. Para a desnutrição, as crianças com menos de cinco anos de idade são as mais vulneráveis, cerca de 150 milhões de crianças menores de cinco anos de idade têm baixo peso para a sua idade. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que cerca de 20 milhões de crianças nascem com baixo peso a cada ano (BLACK *et al.*, 2013; OMS, 2000). A desnutrição nas primeiras fases da vida pode aumentar o risco de infecções, juntamente com a diminuição do desenvolvimento mental e cognitivo. O efeito da desnutrição infantil é duradouro e vai além da infância. A desnutrição durante a idade precoce diminui o desempenho educacional e a produtividade do trabalho e aumenta o risco de doenças crônicas na idade avançada (BLACK *et al.*, 2013; OMS, 2013).

No Brasil, a análise no Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional do Ministério da Saúde revela que, em 2013, as taxas de desnutrição aguda e crônica estavam estimadas em 4,71% e 10,8%, respectivamente. No entanto, a distribuição da desnutrição apresenta diferenças regionais, onde o Norte e Nordeste apresentam as maiores prevalências (BRASIL, 2014).

A desnutrição infantil persistente é considerada parte de um ciclo vicioso de infecções recorrentes, com ou sem diarreia, tem sido associado a diversas consequências negativas ao desenvolvimento humano, como, retardo no crescimento, prejuízo cognitivo e na capacidade absorptiva intestinal, comprometendo os mecanismos imunológicos e agravando a progressão da doença (GUERRANT *et al.*, 2013; KAU *et al.*, 2011). Algumas alterações na microbiota intestinal que podem impactar ou ser impactadas por respostas imunes, infecção e estado nutricional foram reconhecidas como parte do ciclo vicioso (**Figura 1**).

**Figura 1**–Ciclo vicioso envolvendo diarreia e desnutrição.



Fonte: Adaptado de Guerrant, R. L., *et al.*, Nutrition Reviews. 2008 Sep; 66(9): 487-505.

Infecções enteropatogênicas repetidas ou infecções subclínicas podem danificar o intestino e produzir uma condição que alguns pesquisadores têm chamado de “Disfunção Entérica Ambiental” caracterizada por um conjunto de alterações morfológicas e funcionais do intestino delgado, sem manifestações clínicas evidentes, em indivíduos quem vivem em situação de risco com alta contaminação ambiental por enteropatógenos, ausência de saneamento básico, desmame precoce e deficiência alimentar (HARPER *et al.*, 2018).

Os sinais mais comuns de desnutrição infantil são os sinais clínicos e as medidas antropométricas. Em crianças, o estado nutricional é medido por escores Z, que incorporam medidas antropométricas de altura/comprimento e/ ou peso, de acordo com os Padrões de Crescimento Infantil da Organização Mundial da Saúde. A desnutrição infantil é classificada como aguda ou crônica. A aguda ou de baixo peso (do inglês, *wasting*) é definida por escores Z de baixo peso para altura (WHZ) e é dividida em moderada, com escores de WHZ entre dois e três desvios padrão abaixo da mediana (> -

2 a 3) e grave, com medidas WHZ > -3. Enquanto a desnutrição crônica ou nanismo (do inglês, *stunting*) é definida por escores Z (HAZ) de altura para a idade > -2, resultante de uma condição subótima de saúde e/ou nutrição. Em contrapartida, a subnutrição é definida com o índice de baixo peso para idade (WAZ), ou seja, é influenciado tanto pelo índice WHZ como pelo índice HAZ, culminando numa interpretação complexa (**Tabela 1**) (ACF, 2010; OMS, 2017).

**Tabela 1.** Escores-Z antropométricos utilizados para avaliar o estado nutricional.

<b>Índices antropométricos</b>	<b>Diagnóstico nutricional</b>	<b>Percentil</b>	<b>Escore Z</b>	<b>% déficit de mediana</b>
Altura / Idade ("height-for-age")	Desnutrição crônica ("stunted")	HAP	HAZ	HAM
Peso / Idade ("weight-for-age")	Déficit ponderal isolado ("underweight")	WAP	WAZ	WAM
Peso/ Altura ("weight-for-height")	Desnutrição aguda ("wasted")	WHP	WHZ	WHM

## **2.2 *Escherichia coli***

A bactéria *Escherichia coli* é um bacilo Gram negativo, positivos para produção de indol, anaeróbio facultativo, portanto capaz de crescer em aerobiose e anaerobiose, preferencialmente a 37°C, geralmente isolado a partir de amostras fecais por plaqueamento em meios seletivos e diferenciais, como, por exemplo, o ágar MacConkey, onde crescem colônias de coloração rosa, indicando fermentação da lactose), oxidase negativa e apresenta cepas móveis (CROXEN *et al.*, 2010). É um membro da família *Enterobacteriaceae*, gênero *Escherichia* tendo sido descrita pela primeira vez por Theodore Escherichem 1885, que a denominou de *Bacterium coli commune*, indicando à

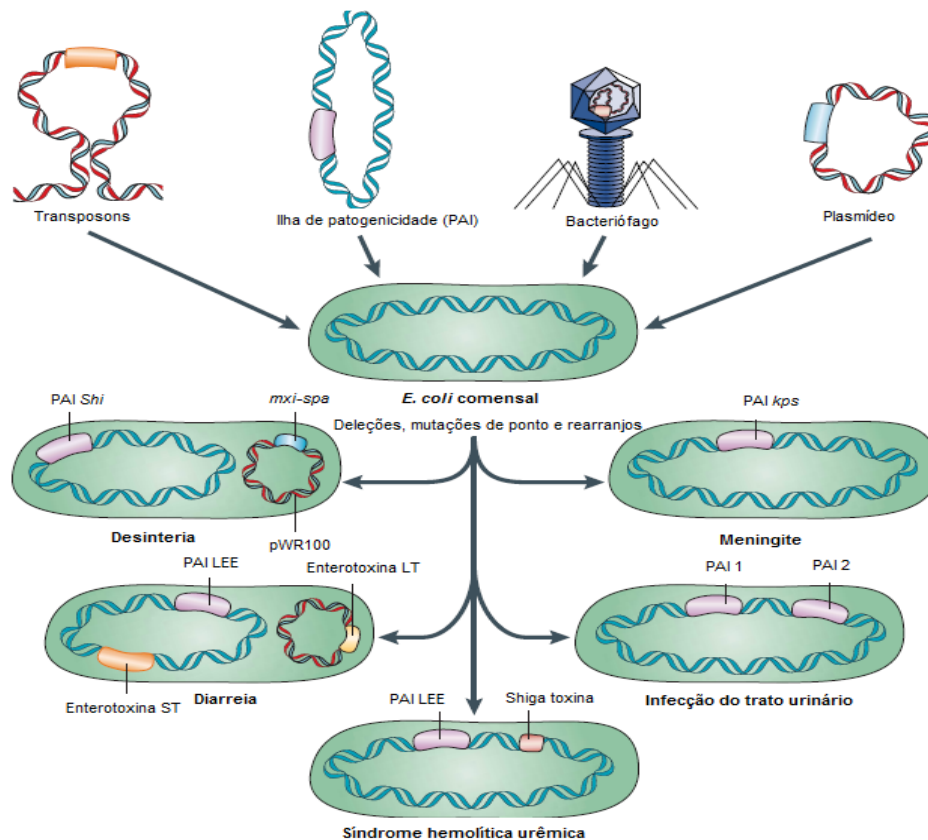


ocorrência universal desta bactéria no intestino de indivíduos saudáveis (NATARO; KAPER, 1998; RODRIGUEZ-ANGELEZ, 2002; VIDAL et al., 2007).

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

A **figura 2** mostra a contribuição de elementos genéticos móveis para a evolução de *E. coli* patogênica. Fatores de virulência de *E. coli* podem ser codificado por vários elementos genéticos móveis, incluindo transposons, enterotoxina estável ao calor, plasmídeos, enterotoxina termo lábil e fatores de invasão, bacteriófago e ilhas de patogenicidade. O locus de apagamento (LEE) de EPEC/EHEC e de outras *E. coli* também podem sofrer deleções resultando em “buracos negros”, pontos de mutações ou outros rearranjos de DNA que podem contribuir para a virulência. Essas adições, deleções e outros alterações genéticas podem dar origem a formas patogênicas de *E. coli* capazes de causar diarreia (EPEC, EHEC, EAEC e DAEC), disenteria (EIEC), síndrome hemolítico-urêmica (EHEC), infecções do tratourinário (UPEC) e meningite (MNEC) (KAPER *et al.*, 2004; CROXEN; FINLAY, 2010; TORRES, 2010).

**Figura 2**– Contribuição dos elementos genéticos móveis para evolução de *E. coli* patogênica.



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

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

As *Escherichia coli* diarreio gênicas (ECD) apresentam-se como um dos principais agentes infecciosos nos casos de diarreia e desnutrição infantil (ALI *et al.*, 2014; ROGAWSKI *et al.*, 2017; TANIUCHI *et al.*, 2013).

Nos próximos tópicos serão abordados temas relacionados à EPEC, incluindo o histórico da descrição da bactéria e de sua associação com o desenvolvimento de diarreia,

epidemiologia, o papel dos fatores de virulência descritos, fisiopatologia, diagnóstico e caracterização das cepas.

### **2.3 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)**

*Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) é uma das principais causas de diarreia infantil e em países em desenvolvimento, foi descrita, pela primeira vez em 1955, quando uma série de cepas de *E. coli*, epidemiologicamente associadas a surtos nas décadas de 1940 e 1950, foram descritas (NETER *et al.*, 1955).

Um fenótipo característico da EPEC é a indução de uma histopatologia distinta conhecida como lesão de inserção e apagamento (A / E), que é caracterizada pelo apagamento das microvilosidades intestinais e a adesão íntima da bactéria à superfície epitelial do hospedeiro (NATARO *et al.*, 1998).

#### **2.3.1 Definição, classificação e diagnóstico**

EPEC foi inicialmente classificada com base na sua identificação por meio de testes sorológicos dos antígenos O e H e que se associou com os casos de diarreia infantil, recebendo este nome a fim de se diferenciar este tipo virulento de *E. coli* das cepas comensais presentes na microbiota humana (TRABULSI *et al.*, 2002; VIDAL *et al.*, 2007; WONG *et al.*, 2011; ARENAS-HERNANDEZ *et al.*, 2012). Um fenótipo característico da EPEC é a indução de uma histopatologia distinta conhecida como lesão de inserção e apagamento (A / E), que é caracterizada pelo apagamento das microvilosidades intestinais e a adesão íntima da bactéria à superfície epitelial do hospedeiro (NATARO *et al.*, 1998). Após entrar no trato gastrointestinal, a EPEC adere à mucosa do intestino delgado e grosso e pelo menos três etapas para a patogênese foram descritas (OCHOA *et al.*, 2008). As cepas de EPEC são capazes de produzir esta lesão A/E devido a determinantes específicos de virulência codificados por um plasmídeo denominado “EPEC Adherence Factor” (EAF) e por um ailha de patogenicidade cromossomal chamada de “Locus of Enterocyte Effacement” (LEE) (ARENAS-HERNANDEZ *et al.*, 2012; CROXEN; FINLAY, 2010; DEAN *et al.*, 2005; NATARO; KAPER, 1998).

Neste contexto, o diagnóstico de EPEC tem se baseado em técnicas moleculares que investiguem a presença de gene *eaeA* (codificador da adesina intimina), sendo classificadas como EPEC típica ou atípica pela presença ou ausência do gene *bfpA*

(codificador da pili formadora de feixe), respectivamente (DONNENBERG *et al.*, 2013). Esta classificação é inicialmente baseada na presença do plasmídeo EAF (fator de adesão EPEC) (pEAF) (TRABULSI *et al.*, 2002). O gene *bfpA* é um locu importante codificado no plasmídeo, com o *bfpA* codificando o pilus formador de feixe tipo IV, que promove a formação de micocolônia bacteriana (BIEBER *et al.*, 1998). As cepas de tEPEC são mais homogêneas em seus traços de virulência do que aEPEC.

A maioria das cepas típicas produzem os fatores de virulência codificados pela região LEE e pelo plasmídeo EAF (TRABULSI *et al.*, 2002). aEPEC pode possuir toxina estável ao calor e outros fatores de virulência não codificados no LEE, como uma hemolisina (TRABULSI *et al.*, 2002). EPEC pertence a sorotipos O:H específicos e pelo menos treze grupos O são representativos dessas cepas: O26, O39, O55, O86, O88, O103, O111, O114, O119, O125ac, O126, O127, O128ab, O142, O145, O157 e O158 (TOZZOLI *et al.*, 2014). Algumas cepas de aEPEC estão mais intimamente relacionadas a *E. coli* produtora de toxina Shiga, em suas características genéticas e propriedades de virulência. As cepas de tEPEC e aEPEC também têm padrões de aderência diferentes. Enquanto cepas de tEPEC exibem o padrão de aderência localizado, as cepas de aEPEC podem produzir uma aderência do tipo localizada, uma aderência difusa ou um padrão de aderência agregativo (TRABULSI *et al.*, 2002). As tEPEC são raramente encontradas em animais e humanos são o principal reservatório, enquanto aEPEC está presente em animais saudáveis e doentes e em humanos (HERNANDES *et al.*, 2009; TRABULSI *et al.*, 2002).

Os casos de diarreia causados por EPEC variam de infecções subclínicas a fatais (TORRES *et al.*, 2010). As cepas de tEPEC podem causar diarreia secretora abundante com muco e perdas significativas de água e eletrólitos nas fezes (ARENAS-HERNANDEZ *et al.*, 2012). Além disso, aEPEC pode levar a grave má absorção de nutrientes, que evolui para o agravamento nutricional e persistência da diarreia (FAGUNDES-NETO *et al.*, 2000). Para aEPEC, o papel como patógeno diarreiogênico em doenças ainda é controverso. Acredita-se que a patogenicidade de aEPEC possa estar relacionada aos sorotipos (GOMES *et al.*, 2010).

### 2.3.2 Epidemiologia

Estima-se que a EPEC seja reponsável por 5 a 10% das diarreias infantis em países em desenvolvimento, como Brasil, Chile, Peru e Irã (OCHOA *et al.*, 2008). Por muitos anos, tEPEC foi considerada fortemente associada à diarreia infantil em países em desenvolvimento. Em vários estudos, tEPEC foi considerada a principal causa de diarreia endêmica em crianças com menos de um ano de idade e foram consideradas raras em países industrializados, onde aEPEC parecia ser uma causa mais importante de diarreia (AFSET *et al.*, 2003; TRABULSI *et al.*, 2002). A frequência da infecção por tEPEC diminui com o aumento da faixa etária e os adultos raramente apresentam episódios diarreicos (OCHOA *et al.*, 2008). Isso pode ser devido ao desenvolvimento da imunidade ou à perda de receptores que interagem com algumas adesinas específicas. Embora as cepas de tEPEC fossem os principais agentes de diarreia aguda em crianças até a década de 1990, há um declínio em muitos países (TRABULSI *et al.*, 2002).

O estudo Global Enteric Multicenter (GEMS) foi um estudo de caso-controle de base populacional incluindo sete países na África e na Ásia com o objetivo de identificar a etiologia, a carga e a mortalidade por diarreia aguda, moderada e grave em crianças com menos de cinco anos de idade (KOTLOFF *et al.*, 2013). Na maioria dos locais de estudo do GEMS, as cepas de tEPEC não estavam entre os principais patógenos que causam diarreia aguda, moderada e grave. As razões para a redução dos casos não são conhecidas, mas podem ser decorrentes de melhorias nas medidas de saúde pública como: condições sanitárias, intervenções ativas, terapia e controle de infecções hospitalares (TOZZOLI *et al.*, 2014; TRABULSI *et al.*, 2008). No entanto, a infecção por tEPEC parece estar associada a um risco 2,8 vezes maior de morte entre crianças de 0-11 meses (KOTLOFF *et al.*, 2013).

Estudos sugerem que aEPEC são mais prevalentes do que tEPEC em ambos os países desenvolvidos e em desenvolvimento (OCHOA *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2019). E foram consideradas raras em países industrializados, onde aEPEC parecia ser uma causa mais importante de diarreia (AFSET *et al.*, 2003; TRABULSI *et al.*, 2002). No geral aEPEC foram responsáveis por 78% de todos os casos de EPEC em crianças menores de 5 anos de idade com diarreia (com base em um estudo) (OCHOA *et al.*, 2008).

aEPEC continua sendo frequentemente detectada em países em desenvolvimento e países industrializados até hoje (OCHOA *et al.*, 2011). De modo frequente, aEPEC está associada à diarreia e em alguns países superaram as infecções por tEPEC.

A distribuição dos agentes patogênicos no ambiente hospitalar representa os casos mais graves. Neste contexto, EPEC foi a segunda causa mais comum de diarreia depois

de rotavírus (OCHOA *et al.*, 2012). No entanto, há variações regionais e temporais importantes. Com base em um estudo, EPEC foi responsável por 29,4% de diarreia em crianças menores de 5 anos de idade (SANTOS *et al.*, 2019).

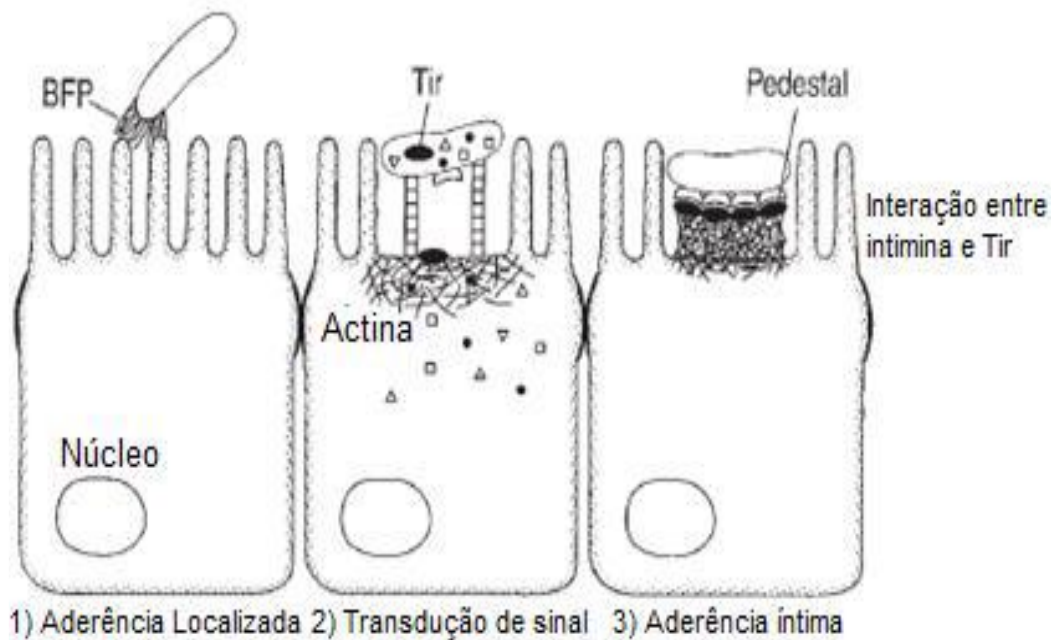
Entretanto, ainda há certa controvérsia sobre a patogenicidade desse micro-organismo, pois alguns trabalhos não encontraram diferenças significativa na prevalência desse patógeno em crianças com ou sem diarreia (OCHOA; CONTRERAS, 2011; RAJENDRAN *et al.*, 2010).

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

### 2.3.3 Patogênese

EPEC induz uma lesão histopatológica característica conhecida por lesão A/E, o qual é caracterizado por uma ligação íntima de bactérias à superfície epitelial e a destruição do enterócito. A lesão A/E se manifesta na destruição das microvilosidades intestinais, adesão íntima e acentuada reorganização das proteínas do citoesqueleto dos enterócitos, culminando no aparecimento de estruturas na forma de pedestais sobre as quais a EPEC se encontra intimamente aderida (NATARO; KAPER, 1998). Existem três estágios na patogênese de EPEC (**Figura 3**): Aderência inicial; Translocação de proteínas bacterianas e Fixação bacteriana íntima com a formação de pedestal (CHEN; FRANKEL, 2005; GARMENDIA *et al.*, 2005; NATARO; KAPER, 1998; VALLANCE; FINLAY, 2001).

**Figura 3** –Representação esquemática dos três estágios de patogênese de EPEC.



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

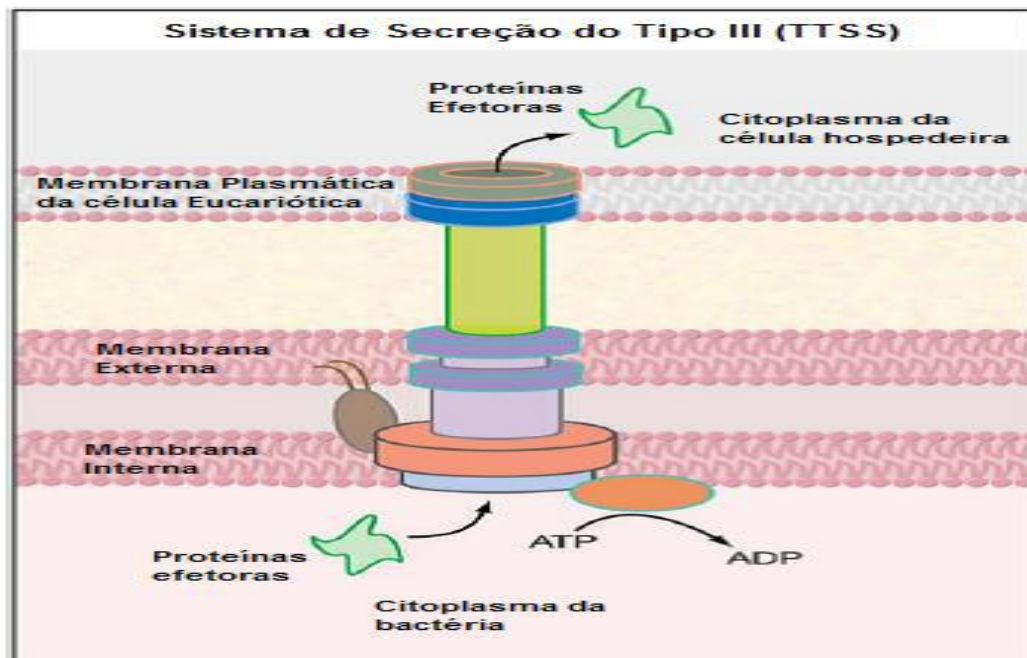
1) Aderência Localizada (mediada pelo BFP); 2) Transdução de sinal (montagem do TTSS e injeção de proteínas efetoras); 3) Aderência íntima (mediada pela interação entre a intimina e seu receptor Tir), que promovem alterações no citoesqueleto e o estabelecimento da lesão A/E.

No primeiro estágio da patogênese, o contato inicial entre EPEC e a célula hospedeira é mediado por fímbrias do tipo IV, expressas na superfície bacteriana e denominadas *bundle forming pili* (BFP). Essas fímbrias promovem a formação de microcolônias com aderência localizada em culturas de células epiteliais (GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1991). Os genes que codificam BFP estão localizados no plasmídeo EAF (EPEC adherence factor) (BALDINI *et al.*, 1983), que contém 14 genes (SOHEL *et al.*, 1996; STONE *et al.*, 1996). O gene *bfpA* codifica a principal subunidade pili de BFP (DONNENBERG *et al.*, 1992). Nesta etapa, EPEC forma microcolônias compactas na superfície das células devido ao BFP, que permite a ligação bactéria-bactéria (NATARO; KAPER, 1998; CROXEN; FINLAY, 2013).

Após à aderência inicial de EPEC ao enterócito, ocorre a montagem do T3SS, que forma um poro na membrana da célula hospedeira para que ocorra a injeção de várias proteínas secretadas (*espS*) e a uma proteína bacteriana translocada denominada *Tir*, no citoplasma da célula hospedeira. O T3SS consiste em uma estrutura basal cilíndrica que abrange as duas membranas da célula bacteriana, e o peptidoglicano, ligado a uma agulha

oca, seguido por filamentos (**Figura4**) (NATARO; KAPER, 1998; VALLANCE; FINLAY, 2000; PIZARRO-CERDÁ; COSSART, 2006; WAGNER *et al.*, 2010).

**Figura 4** – Representação esquemática do Sistema de Secreção do Tipo III.

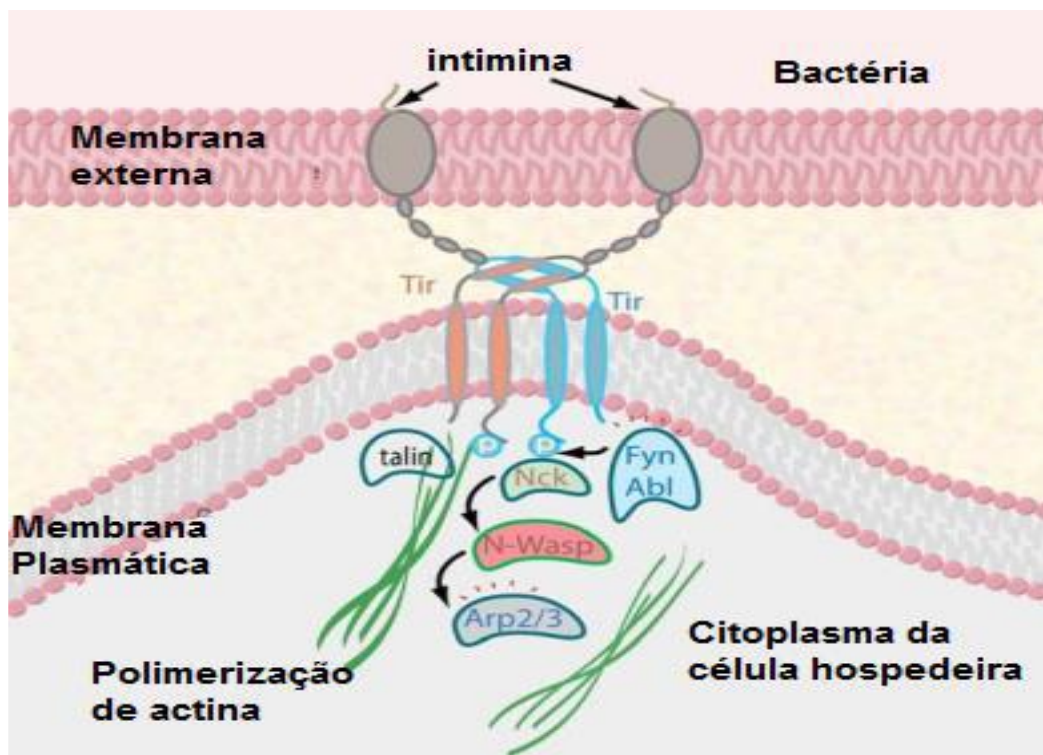


Fonte: Adaptado de PIZARRO-CERDÁ & COSSART, 2006.

O terceiro e último estágio da infecção de EPEC é caracterizado pela Lesão A/E, que tem como característica a aderência íntima da bactéria na superfície do enterócito, devido à destruição das microvilosidades intestinais e formação de uma estrutura semelhante a pedestal (**Figura 5**) (NATARO; KAPER, 1998; PIZARRO-CERDÁ; COSSART, 2006; CROXEN; FINLAY, 2013; CLEMENTS *et al.*, 2012). O fator que participa da adesão íntima de EPEC com as células epiteliais é a intimina, produto do gene *eaeA*, uma proteína de membrana externa de peso molecular igual a 94 kDa (JERSE; KAPER, 1991). Esta proteína liga-se ao receptor *Tir* (*translocated intimin receptor*), também inserido por sistema de secreção do tipo III (T3SS). O domínio citoplasmático de *Tir* interage com a proteína adaptadora Nck que sinaliza as moléculas N-WASP (Proteína neural da síndrome de Wiskott-Aldrich) e o complexo Arp 2/3 (Proteínas relacionadas à actina 2/3). Assim, o citoesqueleto de actina é reorganizado e resulta na formação da estrutura de pedestal e da lesão A/E (GRUENHEID *et al.*, 2001).

**Figura 5-** Estágio da infecção por EPEC e interação entre intimina/*Tir*.





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

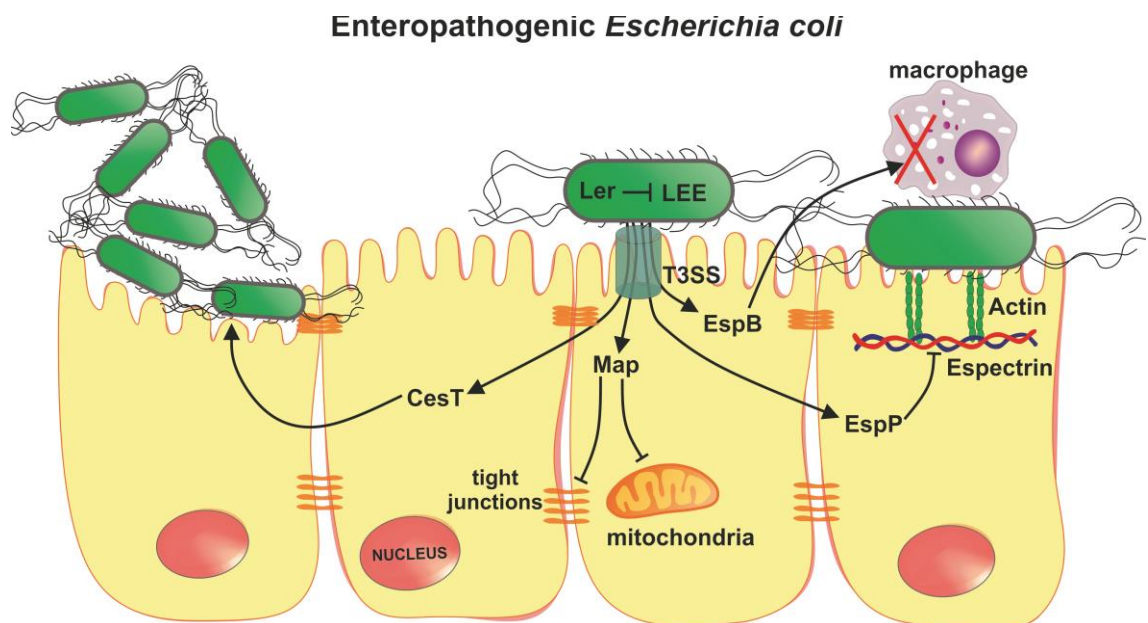
Todo este mecanismo complexo de patogenicidade apresentado por EPEC acarreta o desenvolvimento da doença diarreica pela dramatic perda da atividade de absorção pela microvilosidade, fato ocasionado devido à lesão A/E causada pela bactéria, levando o estabelecimento da diarreia devido à má absorção dos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

### 2.3.4 Fatores de Virulência de EPEC

A virulência da EPEC depende principalmente do sistema de secreção do tipo 3 (relacionado aos genes *esc* e *sep*), capaz de liberar proteínas efetoras dentro das células intestinais, alterando funções celulares que culminam na morte celular. Os genes relacionados à virulência que contribuem para os mecanismos patobiológicos da doença EPEC estão localizados principalmente na ilha de patogenicidade denominada locus de apagamento de enterócitos (LEE) (**Figura 6**). Genes localizados no LEE codificam componentes estruturais de um aparelho de secreção-translocação do tipo III, fatores que permitem à bactéria aderir intimamente às células epiteliais intestinais (genes *eae* e *tir*),

proteínas segregadas e efetoras (genes *espF*, *espG*, *espH*, *map* e *espZ*) e proteínas translocadoras (genes *espA*, *espB* e *espD*) os mais importantes descritos (OCHOA *et al.*, 2012). Além disso, outros genes não localizados no LEE também estão envolvidos na modulação dos principais processos celulares, incluindo à inibição de proteínas endoplasmáticas (*espI* e *nleA*), sinalização do reticulopró-inflamatório (*nleB*, *nleC*, *nleD* e *nleE*) e fagocitose (*espJ* e *nleH*) que favorecem a colonização e doença por EPEC (DEAN *et al.*, 2009; WONG *et al.*, 2011). Neste contexto, há uma complexa rede de intensa regulação transcricional deste aparato gênico (FRANZIN *et al.*, 2015). Estes efetores são altamente conservados na lesão A/E promovendo a aderência de bactérias e de actina e rearranjos para alterar a função de barreira epitelial e potencial de membrana mitocondrial, entre outros eventos celulares (GARCIA-ÂNGULO *et al.*, 2012).

**Figura 6-** Fatores de Virulência e suas funções na patobiologia da infecção por EPEC



Fonte: Santos *et al.*, 2019

A **figura 6** destaca alguns dos principais fatores de virulência de EPEC e suas respectivas funções relacionadas a patobiologia da infecção por EPEC. O gene *Ler* é um auto regulador negativo do locus de apagamento de enterócitos (LEE), no qual vários genes de virulência de EPEC são localizado, incluindo componentes do sistema de secreção do tipo III (T3SS), sendo assim, *Ler* pode atenuar a virulência de cepas de EPEC;

o gene *Map* é uma proteína efetora codificada por LEE que altera as funções mitocondriais das células; o gene *cesT* é um importante gene para o T3SS, o que facilita a colonização intestinal por EPEC; o gene *espB* é um componente do T3SS e induz a morte de células imunes; o gene *espP* é um auto transportador de serina-protease que contribui para a formação de biofilme e a modulação da defesa do hospedeiro.

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

O T3SS, a intimina, e o *Tir* são determinantes essenciais na adesão íntima do patógeno. Um processo que requer a inserção *Tir* para a membrana plasmática, dependente de T3SS, para atuar como um receptor para a ligação bacteriana através da interação da intimina (KENNY, 2002). No entanto, a interação *Tir*-intimina também desencadeia cascatas de sinalização que conduzem a respostas, incluindo a fosforilação de fosfolipases do hospedeiro, e recrutamento de proteínas do citoesqueleto, beneficiando a aderência bacteriana. Intimina também pode subverter processos celulares independentemente de *Tir* (KENNY, 2002; DEAN *et al.*, 2006; MA *et al.*, 2006; CAMPELLONE, 2010).

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

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

A capacidade das bactérias para administrar proteínas efetoras para células hospedeiras é dependente da presença de um sistema de translocação que compreende filamentos que se estendem a partir da superfície bacteriana às membranas das células do hospedeiro. Em EPEC, *escF*, *espA*, *espB* e *espD* são hipoteticamente para formar este aparelho de translocação das proteínas (LUO; DONNENBERG, 2006). O gene *cesT* é

necessário para a secreção eficiente de vários efetores do tipo 3 codificados dentro e fora do LEE (THOMAS *et al.*, 2005).

*EspB* é uma parte importante da maquinaria T3SS, contribuindo para injeção de várias proteínas efetoras no hospedeiro, e também induzir a morte celular em células do Sistema imunológico (BAUMANN *et al.*, 2018). É um fator de virulência essencial de EPEC em seres humanos e em modelos animais (DENG *et al.*, 2004). Juntamente com *espA*, *espD* e *espB* forma o aparelho de translocação. Sem estas proteínas e sem a proteína citoplasmática *espL*, proteínas efetoras são secretadas mas não translocadas (LUO; DONNENBERG, 2006). *espA* forma uma estrutura em forma de agulha que se projeta a partir da superfícies bacteriana a membrana plasmática da célula hospedeira. Após a ligação bacteriana, *espB* e *espD* interagem na formação de poros na membrana do hospedeiro (LUO *et al.*, 2006).

Entre as muitas proteínas efetoras translocadas, *Tir* desempenha um papel crítico na ligação íntima através da ligação a intimina proteína da membrana externa (HARTLAND *et al.*, 2013). Enquanto a interação intimina-*Tir* tem sido intensamente estudada, nem todas as proteínas efetoras contribuem para a lesão A/E e alterações do citoesqueleto. Revelou-se que várias proteínas efetoras desempenham um papel na atenuação da resposta inflamatória (NEWTON *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2011).

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

### **3. JUSTIFICATIVA**

Considerando a importância da EPEC na etiologia das infecções entéricas e a necessidade de elucidar o impacto deste patógeno em crianças com quadro clínico de desnutrição não relacionado à diarreia moderada a severa, são necessários estudos de

associação de determinants genéticos com dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos.

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

Tendo em vista o papel da *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) nas doenças diarreicas e desnutrição na população infantil, torna-se de fundamental importância o estudo desse patógeno. Este estudo teve como base definir a prevalência de EPEC nas crianças do estudo MAL-ED, Brasil, assim como avaliar o impacto da infecção por EPEC em crianças com e sem desnutrição e investigar a importância de alguns fatores de virulência na indução de desnutrição por *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), ajudando a entender o curso da infecção.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Investigar os genes relacionados à virulência de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) em associação com déficit físico, enteropatia, diarreia e deficiência de micronutrientes em crianças residentes na cidade de Fortaleza-CE.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver completo painel de genes de virulência de EPEC por Reações Múltiplas em Cadeia da Polimerase;
- Realizar reações de PCR-múltiplas para o diagnóstico de genes de virulência de EPEC;
- Determinar a prevalência de EPEC entre casos (crianças desnutridas) e controle (crianças nutridas) residentes na cidade de Fortaleza-CE;
- Caracterizar a distribuição dos determinantes: populacional, socioeconômico, dados antropométricos, e clínicos na infecção por EPEC em crianças nutridas e desnutridas residentes em Fortaleza-CE;
- Determinar associações entre infecções por EPEC e outros patógenos em crianças nutridas e desnutridas;
- Avaliar a presença de biomarcadores de inflamação intestinal nos grupos caso e controle, tais como: Mieloperoxidase (MPO), Neopterin (NEO), alpha-1-antitripsina (ALA), gene regenerador 1 $\beta$  (REG1B) e calprotectina (CALPRO).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 População de Estudo

As crianças serão provenientes de grande estudo multicêntrico internacional intitulado “Etiologia, Fatores de Risco e Interações de Infecções Entéricas e Desnutrição, e as Consequências para a saúde infantil: Um consórcio global para o estudo da Desnutrição e Doenças Entéricas” (do inglês “Etiology, Risk Factors, and Interactions of Enteric Infections and Malnutrition and the Consequences for Child Health; O Global Consortium for the Study of Malnutrition and Enteric Diseases, MAL-ED”) e teve aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (COMEPE nº. 246/09). O MAL-ED tem como objetivo investigar as múltiplas interações entre infecção entérica, desnutrição, função intestinal e efeitos sinérgicos relacionados ao desenvolvimento físico, cognitivo e resposta imune. Caracteriza-se por um grande estudo coorte que analisa crianças desde o nascimento até os 2 anos de idade provenientes de 8 países, onde os índices de desnutrição e enteropatia ambiental são altos (Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal, Paquistão, Peru, África do Sul e Tanzânia). O estudo analisou 1.600 crianças, sendo 200 de cada país participante. A primeira criança do estudo entrou em novembro de 2009, enquanto a última coleta de amostra ocorreu em fevereiro de 2014.

Além disso, no Brasil e em Bangladesh, há dois estudos caso-controle, onde são analisadas crianças de 6 a 18 meses de idade: desnutridas (determinado pelo peso por idade em escores Z (WAZ)  $< -2$ ) ou nutridas (controles pareados por idade, sexo e bairro de residência apresentando WAZ  $> -1$ ). No Brasil, o estudo caso-controle utilizou crianças do Instituto da Promoção da Nutrição e do Desenvolvimento Humano (IPREDE), uma clínica especializada em desnutrição infantil em Fortaleza. O estudo coorte foi realizado na comunidade Parque Universitário.

### 5.2 Descrição do Estudo e Considerações Éticas

O presente estudo foi realizado no período de agosto de 2010 a maio de 2013, com um total de 402 crianças participantes, sendo determinados 201 casos e 201 controles, sendo definidas como controle crianças nutridas, que apresentaram *weight-for-age z score* (WAZ)  $\geq -1$ , e como casos crianças desnutridas, apresentando WAZ  $< -2$ . Foram incluídas no estudo crianças de dois-24 meses de idade saudáveis sem histórico de doença específica e sem febre, que tiveram o consentimento dos pais ou responsáveis. Os critérios

de exclusão utilizados foram crianças que necessitaram de hospitalização prolongada ou tiveram graves problemas de saúde, tais como vírus da imunodeficiência humana (HIV), tuberculose, doença neonatal, doença renal, insuficiência cardíaca crônica, doença hepática, fibrose cística, condições congênitas ou enteropatia (por exemplo, doença de Crohn, doença celíaca, colite ulcerativa ou doença de má absorção) diagnosticada por um médico, e por fim, a criança ter um dos pais ou cuidador primário com deficiências cognitivas ou com menos de 16 anos de idade (LIMA *et al.*, 2014).

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 do no Sistema de Segurança e Gerenciament de Dados (SSGD), na Unidade de Pesquisas Clínicas/Instituto de Biomedicina (UPC/IBIMED), na UFC.

Este estudo foi aprovado com parecer favorável pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (COMEPE/UFC) (oficionº. 246/09), descrito em **Anexo 1**. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 2**) foi assinado pelos pais ou responsáveis da criança e obtido pelo agente de saúde.

### **5.3 Coleta de Dados**

A inclusão de crianças do estudo iniciou-se a partir do nascimento, sendo coletada data de nascimento, sexo, peso, altura, circunferência da cabeça, informação sobre aleitamento e manifestações clínicas, tais como: vômito, febre e diarreia. Vigilância ativa sobre doenças infecciosas, condições de saúde e alimentação da criança foi realizada em visitas às casas duas vezes por semana. Visitas adicionais em variados intervalos por agentes de saúde para coleta de informações sobre vacinação, dieta, medidas antropométricas e testes cognitivos, além de coletas de urina e sangue para análises de biomarcadores e um *swab* com fezes em meio de transporte Cary-Blair das crianças do estudo. A primeira coleta de fezes foi realizada após a entrada da criança no estudo e a segunda coleta, após três meses a primeira coleta. Todas essas informações foram coletadas a partir do formulário padronizado (**Anexo 3**) e respondido pelos pais ou responsáveis pela criança. As amostras foram transportadas ao Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI), da UPC/IBIMED, da Faculdade de Medicina, UFC. Em todos os oito centros, as crianças foram acompanhadas até os 24 meses de vida.



#### 5.4 Isolamento das cepas bacterianas

Em cada centro, as amostras fecais foram transportadas em meio Cary-Blair para o Laboratório de Microbiologia, da UPC/IBIMED, sendo semeadas em meio MacConkey, e mantidas na estufa a 37°C por até 18h. Colônias fermentadoras de lactose com morfologia indicativa de *Escherichia coli* foram coletadas para diagnóstico molecular de *E. coli* diarréio-gênicas (*E. coli* enteroagregativa - EAEC, *E. coli* enteropatogênica - EPEC, *E. coli* enterotoxigênica - ETEC, *E. coli* enterohemorrágica - EHEC e *E. coli* enteroinvasiva EIEC) por detecção de genes específicos em Reação em Cadeia da Polimerase. Estas colônias foram isoladas em ágar triptona de soja (TSA) e mantidas em estufa a 37°C por até 18h, em seguida, foi realizado teste indol com as colônias (BD DMACA Indole, Fisher Scientific) obedecendo ao manual do fabricante. Foi feito um *pool* de cinco colônias indol positivo e realizou-se em seguida, a extração de DNA destas colônias através do método de ebulição.

#### 5.5 Extração de DNA bacteriano

A extração do DNA bacteriano foi realizada a partir do *pool* de cinco colônias teste indol positivo para *E. coli* pelo método de ebulição, de acordo com Boisenet *al.*, 2012. As colônias foram incubadas com 1mL de água deionizada do tipo *MilliQ* (Millipore – Billerica, MA, USA) autoclavada e acrescida de 5µL de Triton X-100. Em seguida, a solução foi agitada fortemente por 1 minuto em vortex até que as colônias estivessem totalmente homogeneizadas. A solução foi incubada por 20 minutos a 95°C. O lisado foi homogeneizado novamente por 15 segundos e centrifugado por 10 minutos. Em seguida, 1mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo eppendorf e armazenado a -20°C até sua utilização para o diagnóstico molecular.

#### 5.6 Quantificação do DNA extraído

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

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

### 5.7 Diagnóstico Molecular de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

Foi utilizada a técnica de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) do tipo Multiplex para a detecção dos genes de diagnóstico. A técnica de Multiplex-PCR é uma das variantes do PCR que usa múltiplos pares de iniciadores de DNA para a detecção de vários genes em uma única reação, ocorrendo assim, a amplificação simultânea de sequências de DNA de tamanhos diferentes. Cada reação incluía 12,5µl da enzima Multiplex PCR Mastermix, 1µl do mix de pares de iniciadores específicos para os genes de cada agente mencionado (**Tabela 2**), 5,5µl de água mili-Q autoclavada, 2µl de solução Q e 4µl de DNA da amostra. Primer mix é constituído 0,4µM de primers de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), 0,4µM *Escherichia coli* enteopatogênica (EPEC), 0,4µM *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), 0,4µM *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) e 0,4µM *Escherichia coli* produtora de toxinashiga (EHEC). No protocolo do multiplex-PCR foi incluído um passo inicial de desnaturação (95°C) por 15 minutos, seguido por 40 ciclos com as seguintes etapas: desnaturação (95°C) por 30 segundos, anelamento (55°C) por 30 segundos e extensão (72°C) por 30 segundos, e por fim uma extensão final (72°C) por 10 minutos e manutenção a 4°C. Este protocolo foi desenvolvido pelo grupo dos pesquisadores americanos Eric Houpt e Mami Taniuchi, da Universidade da Virgínia, Estados Unidos (Haupt *et al.*, 2014).

**Tabela2.** Descrição dos genes relacionados à virulência utilizados no estudo.

Gene	Iniciadores	Produto (PB)	Fonte
<i>espB</i> (Z21555.1)	F: ATGGCAGCAAAAGAGCCTAA R: ATGGTCACCACATTGCAAGA	179 (PB)	Santos <i>et al.</i> , 2019
<i>espD</i> (AF022236.1)	F: TGCCGGGTAAAAATAGCTG R: TGCAAGCTCTGGCTATCCTT	304 (PB)	Santos <i>et al.</i> , 2019
<i>Tir</i> (AF013122.1)	F: CTGCAGCGACCTCATCATAA R: GATGCGAAGGGAAATGCTAT	535 (PB)	Santos <i>et al.</i> , 2019
<i>nleB</i> (FM180568.1)	F: ATATCGCCCTGTAGCGGATG R: GAAAGGGTATCAAGCGGCAT	252 (PB)	Santos <i>et al.</i> , 2019
<i>Map</i> (FM180568.1)	F: AGTCCAACGGCAATGGTAGG R: AAAGCGCGATACAACAGCCT	357 (PB)	Santos <i>et al.</i> , 2019
<i>espJ</i> (FM180568.1)	F: TAACCACCACTCCCACACCA R: CCAGAAACAGTCAGGCTGGA	514 (PB)	Santos <i>et al.</i> , 2019
<i>espL</i> (FM180568.1)	F: TCAGGCCCTTCAAAATGGAC R: ACCTAAGCGAGTTCAGCGGA	661 (PB)	Santos <i>et al.</i> , 2019

<i>espC</i> (U69128.1)	F: TGATTCCGGGGCTTATTTTG R: CTCATTCTGGTATGCCGGT	118 (PB)	Santos <i>et al.</i> , 2019
<i>espZ</i> (AF022236.1)	F: CACTGGCAGCCACAATCAAT R: GCAATGTGTGTTGACGACCC	169 (PB)	Santos <i>et al.</i> , 2019
<i>espH</i> (FM180568.1)	F: GCCATGCGTCATGGAATAAG R: TATGGAGGCGTTACGAAGGC	274 (PB)	Santos <i>et al.</i> , 2019
<i>Ler</i> (AF200363.1)	F: TGCGAGAGCAGGAAGTTCAA R: TGAAGAAGGGCAGACCTGGT	168 (PB)	Santos <i>et al.</i> , 2019
<i>espG</i> (AF453442.1)	F: GGGCCTACACCATTCAGCTC R: AGAAGCAGCAACGGCCATAT	280 (PB)	Santos <i>et al.</i> , 2019
<i>nleE</i> (FM180568.1)	F: CAGGGCGTGTCCCCTATAAA R: TGTGAGCTTCCGGACATTTG	371 (PB)	Santos <i>et al.</i> , 2019
<i>nleF</i> (FM180568.1)	F: CCAACAAGTGGTTCTTCAGCA R: AAATGCCTCGTGGAAGGATG	485 (PB)	Santos <i>et al.</i> , 2019
<i>cesT</i> (AB246811.1)	F: TGTGGAAAATTCCCGACAGA R: TCAGGAGCACAATCGCTGTT	119 (PB)	Santos <i>et al.</i> , 2019

<i>espP</i> (FM180568.1)	F: AGCCACAGATGGAGCTGGTT R: GAACGGAGAAACGGTTCTGC	222 (PB)	Santos <i>et al.</i> , 2019
<i>nleD</i> (FM180568.1)	F: TTCGTTTCCAGGGGACTGAT R: AAATGGGGAGCGTTTGAAAG	348 (PB)	Santos <i>et al.</i> , 2019
<i>nleC</i> (FM180568.1)	F: CATTTTCGTGATGCCGTAAGC R: ATGCAGAGCCAGAACGTGAA	434 (PB)	Santos <i>et al.</i> , 2019

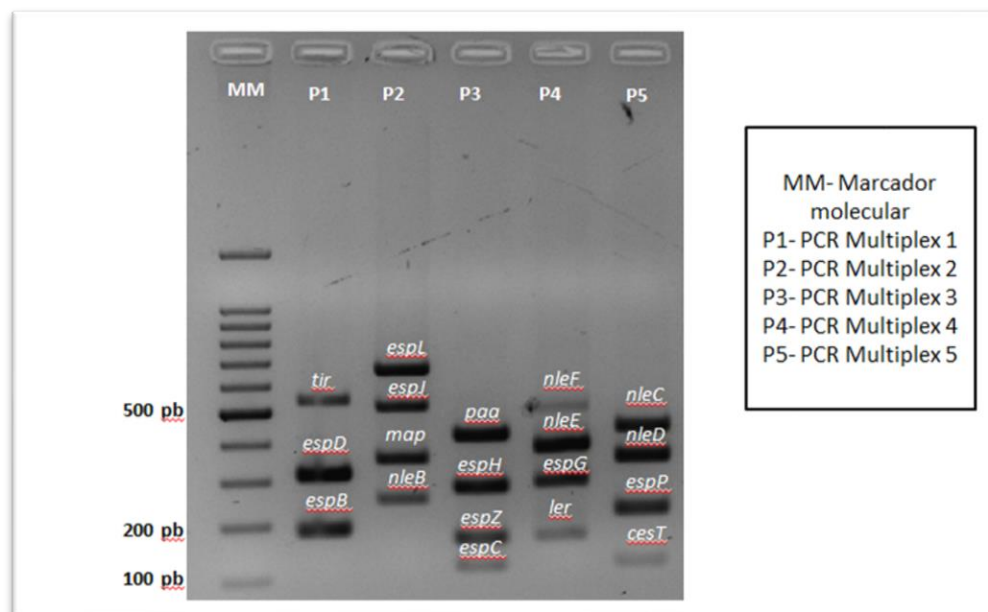
### 5.8 Avaliação de Genes de Virulência

As amostras positivas para EPEC foram testadas quanto à presença de 18 genes relacionados à codificação de fatores de virulência (GRVs), amplamente investigados na literatura, completando um completo painel de virulência deste patógeno: *espB*, *espD*, *tir*, *espC*, *espZ*, *espL*, *Ler*, *map*, *espG*, *espH*, *nleE*, *nleF*, *nleB*, *nleC*, *nleD*, *espJ*, *cesT* e *espP* (**Tabela 3**).

Os painéis de PCR-Multiplex utilizados neste estudo foram descritos em estudo de Santos *et al.*, 2019. Todos os genes foram amplificados através de Reações múltiplas em Cadeia da Polimerase (**Figura 7**), utilizando a enzima *Master Mix PCR Multiplex Platinum®* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), com o seguinte protocolo: (1) 2 minutos de desnaturação inicial a 95°C, (2) com 40 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 95°C e 90 segundos de anelamento com a temperatura adequada para cada painel de reação e 60 segundos de extensão 72°C e (3) extensão final de 10 minutos por 72 °C, utilizando equipamento *MyCycler™ thermal cycler* (BioRad Laboratories, Hercules, CA).. O *kit* é composto por uma DNA polimerase pré-otimizada, deoxinucleotídeos e cloreto de magnésio diluído em tampão específico. Seu emprego possibilita a amplificação de dois ou mais produtos simultaneamente em um único tubo de reação. Os iniciadores utilizados nas reações estão descritos na **Tabela 3**. Os produtos de PCR foram visualizados e fotografados em transiluminador ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) após eletroforese em gel de agarose a 3% e marcação com corante Brometo

de Etídio (0,5µg/ mL) por aproximadamente 15 minutos. A cepa protótipo de EPEC 2348/69, que possui todos os genes descritos acima, foi utilizada como controle positivo; e a água foi empregada como controle negativo em todas as reações.

**Figura 7:** Visualização das bandas obtidas após amplificação por PCR dos genes de fatores de virulência.



**Tabela3:** Genes de virulência investigados do estudo com suas respectivas funções elucidadas.

Gene	Descrição	Fonte
<i>espB</i>	Proteína efetora secretada pelo T3SS	Donnenberg, 2006
<i>espD</i>	Proteína efetora secretada pelo T3SS	Donnenberg, 2006
<i>tir</i>	Receptor translocado de intimina	Hartland <i>et al.</i> , 2013
<i>espC</i>	EnterotoxinaespC	Abreu, 2012
<i>espZ</i>	Bloqueador de translocação de efetores de T3SS	Ochoa <i>et al.</i> , 2008
<i>espL</i>	Proteína efetora não codificada por LEE	Donnenberg, 2006

<i>ler</i>	Regulador global de LEE	Dean <i>et al.</i> , 2005
<i>Map</i>	Proteína efetora (alteração da morfologia da mitocôndria)	Ochoa <i>et al.</i> , 2008
<i>espG</i>	Proteína efetora (destruição de microtúbulos e ruptura de tight junctions)	Ochoa <i>et al.</i> , 2008
<i>espH</i>	Proteína efetora (polimerização de actina)	Ochoa., 2008
<i>nleB</i>	Proteína efetora B não codificada por LEE	Garcia-Ângulo <i>et al.</i> , 2012
<i>nleE</i>	Proteína efetora E não codificada por LEE	Garcia-Ângulo <i>et al.</i> , 2012
<i>nleF</i>	Proteína efetora F não codificada por LEE	Garcia-Ângulo <i>et al.</i> , 2012
<i>nleC</i>	Proteína efetora C não codificada por LEE	Garcia-Ângulo <i>et al.</i> , 2012
<i>Paa</i>	Proteína associada à lesão A/E	Zhang <i>et al.</i> , 2011
<i>nleD</i>	Efetora não codificada	Garcia-Ângulo <i>et al.</i> , 2012
<i>espJ</i>	Proteína efetora não codificada por LEE (inibição de fagocitose)	Garcia-Ângulo <i>et al.</i> , 2012
<i>cesT</i>	Chaperona modificadora de diversos efetores de T3SS	Thomas <i>et al.</i> , 2005
<i>espP</i>	Serino-protease autotransportadora	Abreu, 2012

### 5.9 Análise de coinfeccção

Foi realizado o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), no qual foi utilizado para adeteccção de *Campylobacter*, Adenovírus, Astrovírus, Rotavírus (ProSpecT, Remel, Lenexa, KS, USA), *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Entamoeba*

*histolytica* (TechLab, Blacksburg, VA, USA), onde a metodologia obedeceu o manual do fabricante.

### **5.10 Detecção de Biomarcadores de Inflamação**

Os biomarcadores de inflamação foram medidos em amostras fecais (alfa-1-antitripsina, mieloperoxidase, neopterin e gene de regeneração  $1\beta$  - REG1B) e amostras de soro (amilóide sérica A - SAA, proteína intestinal de ligação de ácidos graxos - I-FABP, proteína de ligação lipopolissacarídica LBP, forma solúvel de CD14 - sCD14 e calprotectina) por Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). Os kits para substâncias do soro foram adquiridos da HycultBiotech (Uden, Holanda), enquanto os kits de lactoferrina, alfa-1-antitripsina, mieloperoxidase, neopterin e REG1B foram adquiridos da TechLab (Blacksburg, Estados Unidos), Immuchrom (Heppenheim, Alemanha), Immundiagnostik (Bensheim, Alemanha), GenwayBiotech (San Diego, Estados Unidos) e TechLab (Blacksburg, Estados Unidos), respectivamente. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

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

### **5.11 Análise de Dados**

Os testes de associações de genes de virulência de EPEC com diferentes dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos foram realizados a partir do uso das informações coletadas ao longo do estudo MAL-ED. Condições como déficit físico, déficit cognitivo,



diarreia, enteropatia e deficiência de micronutrientes foram relacionadas à EPEC e seus genes de virulência. Medidas antropométricas, dosagem de biomarcadores de inflamação (como lactoferrina, neopterinina, mieloperoxidase e alfa-1-antitripsina). Todos os dados gerados foram codificados em planilha Excel, MICROSOFT® (New York, NY, USA). As análises estatísticas foram realizadas pelo programa *GraphPad Prism* (*GraphPad software*, versão 5.01, San Diego, CA, EUA). O teste de Fisher foi empregado para comparar a proporção de ocorrência de uma variável entre os grupos. O intervalo de confiança foi de 95% e o teste foi considerado estatisticamente significativo quando  $P < 0.05$ . Para a análise descritiva dos dados foram empregadas tabelas e figuras. Para as análises de biomarcadores de inflamação, foram utilizadas a média e o erro padrão, por meio do teste U Mann-Whitney.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Caracterização da população do estudo e prevalência de EPEC

Durante o período deste estudo, 402 crianças na faixa etária de dois-24 meses foram analisadas, sendo 50% (201/402) crianças desnutridas, grupo caso. E 50% (201/402) crianças nutridas, grupo controle. Não houve diferença estatisticamente significativa para os genes de diagnóstico entre nutridos e desnutridos (**Tabela 4**).

**Tabela 4.** Prevalência de genes de diagnóstico de EPEC entre nutridos e desnutridos

	Casos n= 201 (%)	Controles n= 201 (%)	Total n= 402 (%)	P value	OddsRatio	95% IC
<i>eaeA</i>	26 (12.9)	35 (17.4)	61 (15.1)	0.2660	0.70	0.40-1.22
<i>bfpA</i>	10 (4.97)	11 (5.47)	21 (5.22)	1.0000	0.90	0.37-2.18
<i>eaeA + bfpA</i>	21 (10.4)	19 (9.45)	40 (9.95)	0.8679	1.11	0.58-2.14
<b>Total</b>	57 (28.3)	65 (32.3)	122 (30.3)			

### 6.2 Caracterização clínica

EPEC foi detectada em 30.3% (122/402) de todas as crianças, 53.2% (65/122) eram crianças do grupo controle e 46,7% (57/122) crianças do grupo caso. Apenas 32,7%

(40/122) foram classificadas como tEPEC, enquanto 67,2% (82/122) foram diagnosticadas como aEPEC. Entre as crianças, 50,8% (62/122) eram do sexo masculino e a faixa etária era de 6-24 meses (média, 11,71 meses; mediana, 10,62 meses), com 54,1% (66/122) das crianças sendo entre 6-12 meses. Não houve associação significativamente estatística entre infecções por EPEC e as crianças do grupo caso. Em relação a amamentação dessas crianças, 83,6% (102/122) tiveram contato com o colostro (**Tabela 5**).

**Tabela 5.** Características da população do estudo entre nutridos e desnutridos positivos para EPEC

Características	Total (n= 122)	Caso (n= 57)	Controle (n= 65)	P value
	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	
<b>Sexo</b>				
Masculino	62 (50,8%)	33 (57,8%)	29 (44,6%)	0,1520
Feminino	60 (49,2%)	24 (42,2%)	36(55,3%)	
<b>Idade</b>				
6-12 meses	66 (54,1%)	22 (38,5%)	44 (67,6%)	<b>0,0019**</b>
13-24 meses	56 (45,9%)	35 (61,5%)	21 (32,4%)	0,5693
<b>Amamentação</b>				
Colostro	102 (83,6%)	40 (70,1%)	61 (93,8%)	<b>0,0006***</b>
Amamentação pré lactéa	20 (16,4%)	17 (29,9%)	4 (6,2%)	0,0621

\*valores de p significativos

Avaliamos o impacto das infecções por EPEC no estado nutricional da população do estudo. Crianças com diagnóstico positivo para EPEC apresentaram valores de HAZ mais baixos do que crianças sem infecção por EPEC (P 0.5415). Ao compararmos dados antropométricos, os escores Z entre os grupos caso e controle, crianças infectadas com EPEC mostraram valores de WHZ significativamente mais baixos do que crianças sem infecção por EPEC ( $-0.64 \pm 1.49$  x  $-0.32 \pm 1.45$ ; P 0.0495) (**Tabela 6**).

De acordo com as respostas dos pais ou responsáveis ao formulário sobre a sintomatologia (**Tabela 6**), tosse foi o mais relatado com 63.9% (75/122), seguido por vômito com 31.1% (38/122) e diarreia 30.3% (37/122). Dor de ouvido foi o sintoma menos presente nas crianças com apenas 1.6% (2/122). Não houve diferenças significativas entre os grupos caso/controle e a sintomatologia dessas crianças.

Parâmetros	Total (n=122)	Caso (n= 57)	Controle (n= 65)	P value
<b>Dados Antropométricos</b>				
HAZ <sup>1</sup> (Média ± SD)	-1.762 ± 1.404	-1.804 ± 1.504	-1.744 ± 1.360	0,5415
WAZ <sup>2</sup> (Média ± SD)	-1.341 ± 1.589	-1.227 ± 1.670	-1.390 ± 1.553	0,4934
WHZ <sup>3</sup> (Média ± SD)	-0.5557 ± 1.487	-0.6419 ± 1.494	-0.3231 ± 1.452	<b>0,0495*</b>
Peso (kg; Média ± SD)	8.283 ± 1.714	8.088 ± 1.540	8.366 ± 1.780	0,1318
<b>Sintomas</b>				
Diarreia	37 (30,3)	27 (47,3)	10 (15,3)	1,0000
Vômito	38 (31,1)	19 (33,3)	19 (29,2)	0,5159
Tosse	75 (63,9)	47 (72,3)	28 (49,1)	0,1640
Dor de ouvido	5 (4,09)	3 (5,2)	2 (3,1)	0,1664
Falta de ar	7 (5,7)	6 (9,2)	1 (1,7)	0,6803

1 Height-for-age z-scores (HAZ), 2 weight-for-age z-scores (WAZ), 3 weight-for-height z score (WHZ).

\*valores de p significativos

### 6.3 Distribuição dos genes de virulência entre os grupos nutridos e desnutridos

Foram pesquisados ao todo 18 genes de virulência de EPEC, a prevalência desses genes analisados nos grupos caso e controle apresentaram-se de forma heterogênea. A **tabela 7** mostra a distribuição de positividade dos genes *espB*, *espD*, *tir*, *espC*, *espZ*, *espL*, *Ler*, *Map*, *espG*, *espH*, *nleE*, *nleF*, *nleB*, *nleC*, *nleD*, *espJ*, *cesT* e *espP*, isoladamente, entre as crianças positivas para EPEC dos grupos nutridos e

desnutridos. Todas as 122 crianças do estudo foram positivas para pelo menos um gene de virulência. Um total de 28.6% das crianças (35/122) foram positivas para até nove VRGs diferentes. O gene mais prevalente foi o *espB* (79.5%), seguido por *nleB* (72.9%), *espP*, *tir* (68.1%) e *map* (67.2%). O gene menos prevalente foi o *nleF* (36.8%). Uma tabela completados VRGs de EPEC e sua prevalência pode ser visto na **tabela 7**.

O gene *espD* é um gene translocador de proteínas do sistema T3SS, responsável pela sinalização de retículo pró-inflamatório, foi associado a crianças desnutridas ( $p=0.0001$ ; OR=31.55; IC95%= 11.5-86.5).

Ao compararmos a distribuição dos genes de virulência entre as crianças positivas para tEPEC e aEPEC, observou-se que as amostras positivas para aEPEC continham mais genes. Especificamente, crianças positivas para aEPEC foram significativamente associadas à presença dos genes *espD*, *nleB* e *ler* ( $p= 0.0001$ ;  $p=0.0004$ ;  $p=0.0018$ ), respectivamente (**Tabela 8**). A análise das combinações dos genes de virulência associadas ao grupo desnutrido não apresentou resultados significativos.

**Tabela7.** Positividade dos fatores de virulência entre os grupos caso e controle

<b>Genes de virulência de EPEC</b>	<b>Caso Nº (%)</b>	<b>Controle Nº (%)</b>	<b>Total (%)</b>	<b>P valor</b>	<b>OR</b>	<b>95% IC</b>
<i>espB</i>	48 (84.2)	49 (75.3)	97 (79.5)	0.2661	1.741	0.70 – 4.32
<i>espD</i>	50 (87.7)	12 (18.4)	62 (50.8)	<b>0.0001***</b>	31.55	11.5 – 86.5
<i>tir</i>	35 (61.4)	48 (73.8)	83 (68.1)	0.1744	0.56	0.26 – 1.21
<i>nleB</i>	44 (77.1)	45 (69.2)	89 (72.9)	0.4145	1.50	0.66 – 3.39
<i>map</i>	43 (75.4)	39 (60.0)	82 (67.2)	0.0835	2.04	0.93 – 4.47
<i>espJ</i>	27 (47.3)	33 (50.7)	60 (49.1)	0.7207	0.87	0.42 – 1.77
<i>espL</i>	21 (36.8)	32 (49.25)	53 (43.4)	0.2016	0.60	0.29 – 1.24
<i>espC</i>	38 (66.6)	32 (49.2)	70 (57.3)	0.0668	2.06	0.98 – 4.30
<i>espZ</i>	22 (38.5)	26 (40.0)	46 (37.7)	1.0000	0.94	0.45 – 1.95
<i>espH</i>	29 (50.8)	31 (47.6)	60 (49.1)	0.8561	1.13	0.55 – 2.31
<i>ler</i>	23 (40.3)	37 (56.9)	60 (49.1)	0.0731	0.51	0.24 – 1.05
<i>espG</i>	26 (45.6)	39 (60.0)	65 (53.2)	0.1459	0.55	0.27 – 1.14
<i>nleE</i>	20 (35.1)	34 (52.3)	54 (44.2)	0.0686	0.49	0.23 – 1.02
<i>nleF</i>	19 (33.4)	26 (40.0)	45 (36.8)	0.4595	0.75	0.35 – 1.57
<i>cesT</i>	27 (47.3)	23 (35.3)	50 (40.9)	0.2002	1.64	0.79 – 3.40
<i>espP</i>	43 (75.4)	40 (61.5)	83 (68.1)	0.1213	1.92	0.87 – 4.20
<i>nleD</i>	31 (54.3)	32 (49.2)	63 (51.6)	0.5908	1.23	0.60 – 2.50
<i>nleC</i>	22 (38.5)	36 (55.3)	58 (47.5)	0.0718	0.50	0.24 – 1.04

**Tabela 8.** Distribuição dos genes de virulência entre as crianças positivas para tEPEC e aEPEC

Genes de virulência de EPEC	EPEC típica	EPEC atípica	Total	P valor	OR	95% IC
	Nº (%)	Nº (%)				
<i>espB</i>	38 (66.6)	51 (62.2)	89 (72.9)	0.1581	0.54	0.24 – 1.23
<i>espD</i>	24 (60)	56 (68.2)	80 (65.5)	<b>0.0001***</b>	0.11	0.04 – 0.28
<i>tir</i>	7 (17.5)	12 (14.6)	19 (15.5)	0.4547	0.61	0.22 – 1.69
<i>nleB</i>	25 (43.8)	49 (59.7)	74 (60.6)	<b>0.0004***</b>	0.25	0.11 – 0.55
<i>map</i>	40 (70.1)	51 (62.1)	91 (74.5)	0.3067	0.64	0.28 – 1.46
<i>espJ</i>	18 (31.5)	26 (31.7)	44 (36.1)	0.3518	0.69	0.32 – 1.46
<i>espL</i>	22 (38.5)	18 (21.9)	40 (32.7)	0.2472	1.64	0.76 – 3.51
<i>espC</i>	28 (49.1)	40 (48.7)	68 (55.7)	0.2024	0.60	0.29 – 1.24
<i>espZ</i>	31 (54.3)	46 (56.1)	77 (63.1)	0.0901	0.49	0.23 – 1.03
<i>espH</i>	21 (36.80)	33 (40.2)	54 (44.2)	0.1456	0.56	0.27 – 1.16
<i>ler</i>	37(64.9)	58 (70.7)	95 (77.8)	<b>0.0018**</b>	0.22	0.08 – 0.58
<i>espG</i>	24 (42.1)	34 (52.3)	58 (47.5)	0.2807	0.66	0.32 – 1.35
<i>nleE</i>	13 (32.5)	18 (27.6)	31 (25.4)	0.6773	0.77	0.33 – 1.75
<i>nleF</i>	7 (17.5)	13 (20)	20 (16.3)	0.3288	0.56	0.20 – 1.51
<i>cesT</i>	27 (47.3)	32 (49.2)	59 (48.3)	0.8578	0.92	0.45 – 1.89
<i>espP</i>	35 (61.4)	50 (60.9)	85 (69.6)	0.0768	0.47	0.21 – 1.04
<i>nleD</i>	16 (40)	18 (27.6)	34 (27.8)	1.0000	1.01	0.46 – 2.25
<i>nleC</i>	19 (33.3)	23 (28.1)	42 (34.4)	0.0668	0.48	0.23 – 1.01

#### 6.4 Distribuição de copatógenos

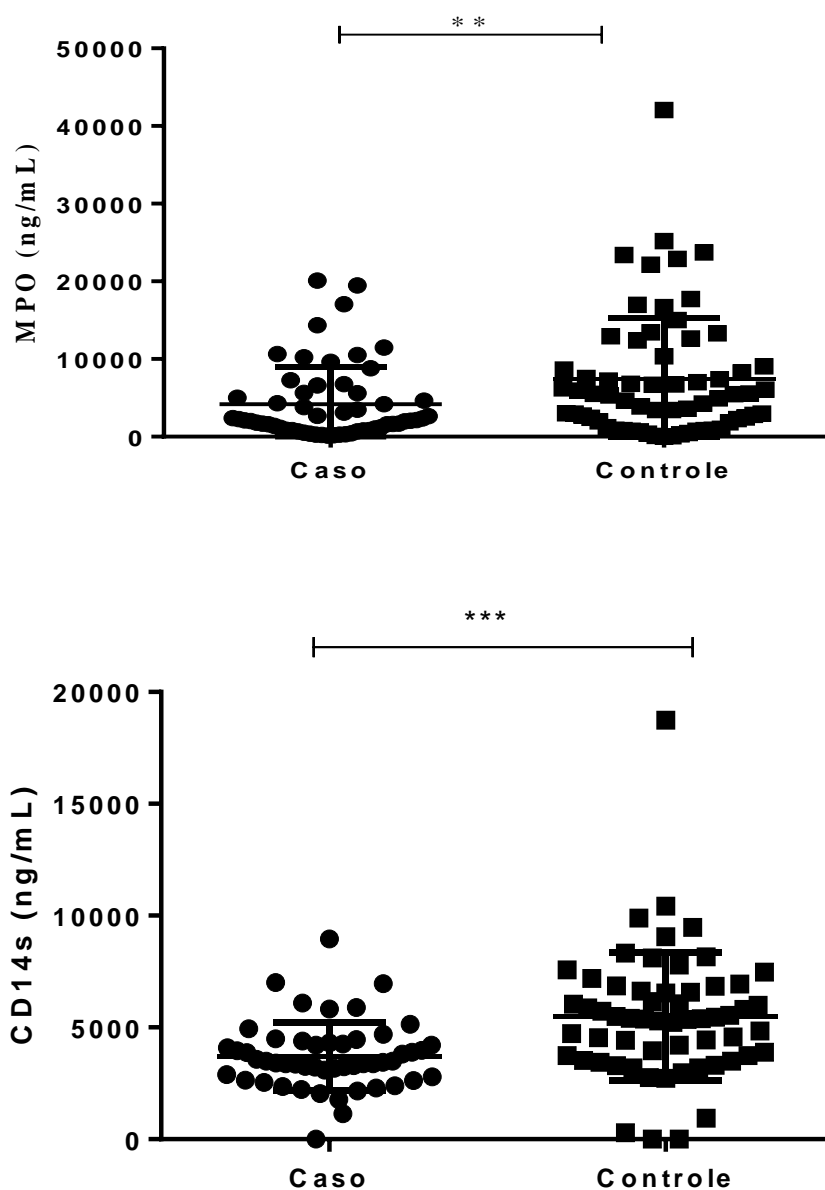
Em relação aos enteropatógenos analisados, observamos uma alta prevalência de coenteropatógenos em crianças com infecções com EPEC: 71.3% (87/122) e 51.6% (63/122) das crianças infectadas com EPEC apresentaram pelo menos um e dois outros copatógenos, respectivamente. Todas as amostras positivas para EPEC foram positivas para pelo menos outro patógeno. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) foi o principal copatógeno detectado 25.4% (31/122), seguido por EIEC/*Shigella* 18.9% (23/122) e *Giardia lamblia* 17.2% (21/122). Curiosamente, *Campylobacter spp.* foi associada ao grupo caso (desnutrição) em crianças com EPEC por uma análise univariada ( $p=0.0290$ ;  $OR=0.22$ ;  $IC95\%=0.05-0.082$ ) (**Tabela 9**). Nenhum copatógeno foi associado a quaisquer sintomas clínicos.

**Tabela 9.** Distribuição de copatógenos em crianças nutridas e desnutridas

Copatógenos	No. (%) de crianças			Análises Univariadas			Análises Multivaridas		
	Casos n=57 (%)	Controles n=65 (%)	Total n=122 (%)	P value <sup>b</sup>	OR	95% CI	P value <sup>b</sup>	OR	95% CI
<b>Bactéria</b>									
EAEC	15 (26.3)	16 (24.6)	31 (25.4)	0.8382	1.09	0.48-2.47	0.68	1.21	0.5-2.93
EIEC/ <i>Shigella</i>	11 (19.3)	12 (18.5)	23 (18.9)	1.0000	1.05	0.42-2.62	0.77	0.85	0.27-2.62
ETEC	8 (14)	4 (6.2)	14 (11.5)	0.2227	2.49	0.70-8.76	0.37	1.89	0.48-7.15
<i>Campylobacter spp.</i>	13 (22.8)	3 (4.6)	16 (13.1)	<b>0.0290*</b>	0.22	0.05-0.82	0.03	0.22	0.06-0.84
<b>Vírus</b>									
<i>Adenovirus</i>	1 (1.8)	1 (1.5)	2 (1.6)	1.0000	1.14	0.06-18.71	0.98	0.97	0.06-16.43
<i>Astrovirus</i>	2 (3.5)	0	2 (1.6)	0.2116	5.90	0.27-125.6	1.00	17.46	-
<b>Protozoários</b>									
<i>Entamoeba spp.</i>	1 (1.8)	1 (1.5)	2 (1.6)	1.0000	1.14	0.06-18.71	0.98	0.97	0.06-16.43
<i>Cryptosporidium spp.</i>	1 (1.8)	3 (4.6)	4 (3.3)	0.6221	0.36	0.03-3.65	0.35	0.30	0.02-3.71
<i>Giardia lamblia</i>	9 (15.8)	12 (18.5)	21 (17.2)	0.8115	0.82	0.32-2.13	0.49	0.70	0.25-1.93

## 6.5 Análise de Biomarcadores

Em relação às análises de detecção de biomarcadores de inflamação dos grupos nutridos e desnutridos, a presença dos biomarcadores MPO ( $p=0.0078$ ) e CD14s ( $p=0.0001$ ) foram associados aos controles (**Gráfico 1**). Não houve associação significativa entre a detecção dos outros biomarcadores analisados neopterin, REG-1B, FABP-1, IgA e IgG anti-LPS e alpha-1-antitripsina com os grupos caso e controle.





## 7. Discussão

A desnutrição infantil constitui um importante problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, com conseqüências agudas e, ainda mais frequentemente, de longo prazo. No ano de 2010, 103 milhões de crianças com idade menor que cinco anos estavam desnutridas (MONTE *et al.*, 2000). A desnutrição e seus problemas associados atingem todas as faixas etárias, mas são mais prevalentes entre crianças com até cinco anos de idade. A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 20 milhões de crianças nasça com baixo peso e que 150 milhões de crianças menores de cinco anos de idade têm baixo peso para sua idade (OMS, 2000). A desnutrição infantil, incluindo crescimento lento e deficiência em micronutrientes, constitui cerca de 35% das causas de morte em crianças menores de cinco anos de idade (WHO, 2012).

A desnutrição infantil é a principal causa de carga global de doenças, dentre as principais causas de morte em crianças, 60% são resultantes de diarreia, 53% de doenças respiratórias, 44% de sarampo e 57% de malária são atribuíveis à desnutrição ao mesmo tempo (CAULFIELD *et al.*, 2004). As infecções entéricas estão associadas com prejuízos ao ganho de peso e altura, alto risco para desnutrição, que conseqüentemente, gera um aumento na frequência e duração de novos episódios diarréicos. O ciclo vicioso entre desnutrição e diarreia é bastante conhecido e pode ocorrer associado às infecções entéricas sem eventos de diarreia. Estudos no Brasil e Peru relataram o impacto em longo prazo de diarreia sobre o desenvolvimento infantil, com efeitos prejudiciais sobre a cognição e aprendizado (GUERRANT *et al.*, 2002; ORIA *et al.*, 2010).

EPEC está entre os patógenos mais importantes que infectam crianças menores de dois anos de idade em países em desenvolvimento. A prevalência de EPEC varia de acordo com as diferenças na população do estudo, faixa etária, critérios de diagnóstico, e métodos usados para o diagnóstico. Com base em métodos moleculares, a EPEC é responsável, em média, por 5 a 10% de episódios diarréicos em crianças. Quando o diagnóstico é feito com base no padrão de aderência, as taxas de prevalência são mais altas, em média 10-20%, com uma grande variabilidade entre os estudos (OCHOA *et al.*, 2008). Infecções por EPEC têm sido associadas a diferentes desfechos clínicos (SANTOS *et al.*, 2019), tornando-se um desafio para o entendimento da sua patobiologia. Contudo, EPEC representa um grupo altamente importante de enteropatógenos que apresentam

uma alta variabilidade genética e uma alta prevalência em países em desenvolvimento, sendo uma das principais causas de diarreia persistente (LANATA, 2002).

O propósito deste estudo foi investigar a genética de EPEC e determinar sua prevalência, os determinantes socioeconômicos, genéticos, o papel de seus fatores de virulência, as coinfeções que favorecem a infecção por EPEC e a presença de biomarcadores imunoinflamatórios, que podem ser responsáveis por resultados clínicos em tEPEC e infecções por aEPEC em crianças nutridas e desnutridas, com idade de seis a 24 meses de vida. Para a detecção de EPEC, as técnicas de biologia molecular são importantes ferramentas de diagnóstico (ALBERT *et al.*, 2009; ARAÚJO *et al.*, 2007).

Com tais técnicas, torna-se praticável a elucidação da epidemiologia de cada categoria de *E. coli* diarreiogênicas, que pode, então, variar de acordo com a área geográfica (DUPONT, 2005; NATARO; KAPER *et al.*, 1998; OKEKE, 2009; REYES *et al.*, 2010), uma vez que hoje os patógenos intestinais possuem uma mobilidade sem precedentes. Portanto, a vigilância ativa da infecção intestinal é essencial para a determinação do padrão de cepas em circulação, a fim de determinar estratégias de prevenção e tratamento adequados para doenças associadas (NUNES *et al.*, 2012; PAYMENT; RILEY, 2002).

A prevalência de EPEC neste estudo foi de 30,3%, o que corrobora com dados de um estudocaso/controle do grupo, onde foi analisado amostras de 1191 crianças com idade entre dois e 36 meses da região Nordeste do Brasil, no qual foi encontrada uma prevalência de 28,2% de infecção por EPEC (SANTOS *et al.*, 2019). A alta prevalência de EPEC neste estudo foi caracterizada principalmente pela alta frequência de aEPEC em vez de tEPEC. Estudos epidemiológicos já haviam constatado uma frequência maior de isolados de EPEC atípica quando comparadas a EPEC típica (OCHOA *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2019).

Em relação à colonização do patógeno, esta pode ser resultado de uma complexa interação de fatores, como condições ambientais, a idade da criança, aleitamento materno, os fatores de proteção da mãe e seu estado nutricional e imunológico do indivíduo, incluindo a susceptibilidadedeste à infecção (CONTRERAS *et al.*, 2010). No presente estudo, foi demonstrado que aEPEC, 67,2% (82/122), era comum tanto em crianças do grupo caso (desnutridas), como em crianças do grupo controle (nutridas), demonstrando uma colonização do patógeno, nessas últimas, sem à indução da doença. Esses relatos

também foram discutidos em estudos realizados anteriormente, tanto em países desenvolvidos, quanto em desenvolvimento (AFSET et al., 2003; BLANCO et al., 2006; KNUTTON et al., 2001; OCHOA et al., 2008).

Com relação ao fator de amamentação, a OMS aconselha que esta ocorra até os seis meses de idade da criança, e que só após este período sejam realizados a introdução de outros alimentos. Em estudo publicado em 2012 foi possível verificar que crianças com acesso ao colostro e amamentação exclusiva até os seis meses de vida, tiveram uma menor taxa de morbidade por infecções entéricas (KRAMER; KAKUMA, 2012). E no presente estudo, demonstramos que, 83,6% (102/122) das crianças tiveram contato com o colostro, gerando uma maior proteção contra infecções entéricas, o aleitamento materno é frequentemente associado a um melhor desenvolvimento neurológico até o início da idade adulta (AGOSTINI; BASELLI; MAZZONI, 2012), uma vez que a alta frequência de infecções entéricas em crianças pode provocar deficits cognitivos (GUERRANT, 2013).

Estudos têm demonstrado que crianças amamentadas com leite materno apresentam uma microbiota mais saudável, quando comparadas às crianças que não tiveram contato com o leite materno (WHARTO *et al.*, 1994; TURIN, OCHOA, 2014). A microbiota normal é estabelecida pela amamentação, que consiste em uma maior proteção contra doenças diarreicas e outras doenças, contribuindo para o desenvolvimento e a maturação do trato gastrointestinal (SCHIFFRIN, BLUM, 2002; SOLIS *et al.*, 2002).

Outro foco deste estudo foi a avaliação se as infecções por EPEC poderiam ser associadas a dados antropométricos do Z score. Observamos uma diminuição do escore HAZ em crianças infectadas com EPEC em comparação com aquelas crianças não infectadas com EPEC, e isto foi atribuído principalmente a alta frequência de aEPEC. Além disso, a infecção por EPEC foi associada a diminuições de WHZ. De fato, este estudo corrobora com o estudo de SANTOS *et al.*, 2019, onde demonstra os encargos da EPEC sobre a desnutrição. Dados do estudo MAL-ED reforçam a importância de até infecções entéricas assintomáticas como causa de comprometimento do crescimento em crianças de países em desenvolvimento (KOSEK *et al.*, 2017; MAL-ED *et al.*, 2017).

Quanto às características clínicas das crianças do estudo, de acordo com as respostas dos pais ou responsáveis, foram resumidos em diarreia (30,3%), vômito

(31,1%), tosse (63,9%) e falta de ar (5,7%). Apenas 37 das crianças positivas para EPEC tiveram diarreia com duração inferior a 14 dias. A diarreia do tipo persistente consiste em um importante inductor da morbidade de infecções entéricas, pois esta amplia o risco de entrada da criança no ciclo vicioso diarreia-desnutrição, mencionado anteriormente e já descrito como um limitante da capacidade absorptiva intestinal, contribuindo para o déficit físico e cognitiva dessas crianças (WALKER *et al.*, 2007).

A fim de elucidar aspectos que fazem parte da patogênese da infecção por EPEC, este trabalho analisou 18 fatores de virulência distribuídos em cinco painéis de PCR multiplex. Os painéis foram utilizados para a detecção de genes relacionados à virulência das crianças analisadas do presente estudo. A presença dos genes de virulência codificados pela ilha de patogenicidade éssencial para a capacidade de EPEC causar a lesão A/E, que é uma característica dominante de tEPEC (MOHAMMA *et al.*, 2013). Os resultados deste e de outros estudos poderia apontar as diferenças evolutivas destes isolados em relação ao rearranjo do genoma, devido à transferência horizontal de genes (OCHOA *et al.*, 2012).

Outro fator determinate da virulência de tEPEC é o regulador codificado pelo plasmídeo EAF, que está envolvido no auto agregação e elevada expressão do BFP, proteínas e o gene *tir* durante a infecção (IIDA *et al.*, 2010). Assim, as EPECs típicas se mostram mais homogêneas em suas características de virulência quando comparadas às cepas de aEPEC (TRABULSI *et al.*, 2002). Porém, mesmo com o conhecimento das diferenças de ambas as cepas, são escassos os dados disponíveis sobre a distribuição geográfica da EPEC típica, provavelmente porque nem sempre esta cepa é distinguida das formas atípicas nos estudos epidemiológicos, especialmente em países com recursos limitados (SANTONA *et al.*, 2013).

Por outro lado, houve um aumento na identificação de aEPEC tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, apresentando uma prevalência de 10,5% na Alemanha e 9,3% no Iran, dentre outros (ARAUJO *et al.*, 2007; BLANCO *et al.*, 2006; HERNANDES *et al.*, 2009). No Brasil, esta cepa tem sido cada vez mais relatada e apontada como uma causa de diarreia em diferentes centros urbanos (ÁRAUJO *et al.*, 2007; FRANZOLIN *et al.*, 2007; MORENO *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2019; SPANO *et al.*, 2008). Embora existam diferenças na população estudada, a prevalência de aEPEC,

neste e em outros estudos, ressalta o surgimento dessas cepas no Brasil (LOZER *et al.*, 2013).

Por isso, este estudo analisou o papel de alguns dos genes de virulência de EPEC, como *espB*, *espD*, *tir*, *espC*, *espZ*, *espL*, *ler*, *Map*, *espG*, *espH*, *nleE*, *nleF*, *paa*, *nleC*, *nleD*, *espJ*, *cesT* e *espP*, de maneira isolada, entre as amostras positivas para EPEC dos grupos caso e controle. Muitos destes genes compõem a patobiologia da EPEC, portanto, são importantes para o estabelecimento do mecanismo da infecção.

Observamos que os genes *espB* e *nleB* foram os mais prevalentes entre todas as crianças infectadas por EPEC, com taxa de 79,5% e 72,9%, respectivamente, seguido por *tir* (68,1%) e *map* (67,2%). Estes resultados corroboram com os dados da literatura, estudo apresentou a detecção de 70% do gene *espB* (KIM *et al.*, 2009).

O gene *espB*, é um component importante do T3SS, contribuindo para a injeção de várias proteínas efetoras no hospedeiro, e também induz a morte celular em células do sistema imunológico (BAUMAN *et al.*, 2018). Embora não tenha sido associado com o grupo caso, essas descobertas sugerem que esse gene é importante para a composição da virulência de EPEC e reforça a diferença na patogênese entre tEPEC e aEPEC.

Ao analisar os genes de virulência com amostras de tEPEC e aEPEC, descobrimos que os genes *espD*, *nleB* e *ler* foram associados significativamente com aEPEC, mostrando que os genes localizados na ilha de patogenicidade podem ser associados aos subgrupos de EPEC. Em geral, a bactéria aEPEC mostram uma variabilidade genética maior do que as cepas de tEPEC (ABREU *et al.*, 2013; SALVADOR *et al.*, 2014).

A variação da presença de diferentes genes codificadores de virulência entre cepas de EPEC isolados de casos e controles confirmam a heterogeneidade do grupo. A presença dos genes pesquisados nem sempre está relacionada com a doença. O número de genes encontrados nas cepas pode ser um marcador de virulência das cepas. Neste trabalho, inúmeras amostras apresentaram mais de um dos genes de virulência pesquisados (SANTOS *et al.*, 2015). Na verdade, as interações altamente complexas entre as estratégias de virulência de EPEC e o processo inflamatório da resposta do hospedeiro levam a diferentes resultados clínicos. Este trabalho segue a mesma proposta do estudo de Santos *et al.*, 2019 que correlacionam genes de virulência de EPEC com desnutrição em crianças.

Os diversos desfechos clínicos das infecções por EPEC também podem ser influenciados pela infecção com outros copatógenos. Portanto, um dos objetivos do estudo foi investigar se os coenteropatógenos podem se correlacionar com a infecção por EPEC e seus resultados. *Campylobacter spp.* foram associados à desnutrição. Estas observações corroboram com estudos que destacaram a importância das coinfeções na diarreia associada a EPEC em crianças de países em desenvolvimento (PLATTSMILLS *et al.*, 2018). Além disso, observou-se EAEC como um importante copatógeno que pode exacerbar os efeitos de outras infecções entéricas em crianças (LIMA *et al.*, 2018). É importante lembrar que EAEC e *Campylobacter spp.* foram os dois principais enteropatógenos associados a decréscimos de crescimento em um estudo multicêntrico de etiologia e enteropatia ambiental de crianças em países em desenvolvimento (MAL-ED, 2017), e este estudo reforça a maior carga desses patógenos.

Avaliamos a presença de biomarcadores de inflamação intestinal nessas crianças, o I-FABP é uma proteína de ligação aos ácidos graxos presentes no epitélio intestinal, a sua presença no sangue, sugere lesão da barreira intestinal (ADRIANSE *et al.*, 2013). A presença dos anticorpos IgA e IgG anti-LPS sugere uma translocação microbiana (GABE *et al.*, 2001), não houve associação significativa entre a presença desses biomarcadores e os grupos caso e controle.

A análise dos biomarcadores MPO e CD14s foram associados ao grupo controle (crianças infectadas nutridas), sendo o MPO um marcador de migração de polimorfonucleares, no qual indica processo inflamatório intestinal (HAMPTON, KETTLE, WINTERBOURN, 1998). A proteína CD14s é uma proteína de fase aguda envolvida na inibição do crescimento microbiano. Portanto, a associação da presença desses biomarcadores em crianças nutridas sugere que há uma boa resposta imunológica na população do estudo, no qual indica o não comprometimento das defesas imunológicas do hospedeiro contra a infecção pelo patógeno.

Este estudo tem limitações, tais como: o protocolo do projeto MAL-ED não avaliou a associação entre doença e desnutrição em crianças, a falta de dados de morbidade não foi coletada e dados da quantidade do consumo alimentar das crianças não foram informados, o que poderia influenciar nos dados de desnutrição. As análises de biomarcadores não foram realizadas em todas as crianças do estudo. Além disso, outras Enterobacteriaceae, especialmente outras cepas de *E. coli* diarréogênicas, como EHEC

e EAEC podem compartilhar sequências genéticas de virulência semelhantes com EPEC (ANDRADE *et al.*, 2017).

No entanto, é importante destacar que infecções entéricas podem ocorrer em ambientes com altos níveis de contaminação ambiental. Além disso, as altas taxas de coinfeções sugerem que outros patógenos desempenham um papel nos resultados da infecção e indicam uma provável etiologia multifatorial de desnutrição e enteropatia em crianças infectadas com EPEC.

## 8. Conclusão

Em conclusão, este estudo caracterizou infecções por EPEC em muitas crianças nutridas e desnutridas de Fortaleza, CE. O estudo mostrou que aEPEC apresenta uma elevada prevalência. É importante ressaltar que a infecção de EPEC apresentou uma diminuição em HAZ em comparação com crianças sem infecções por EPEC. Contudo, o grupo caso foi associado a um WHZ mais baixo do que o grupo controle. Além disso, usamos um painel para detecção de dezoito genes de virulência de EPEC. Coinfecção de *Campylobacter spp.* foi associada com desnutrição em crianças infectadas com EPEC. Os dados apresentados neste estudo aumentam a compreensão da carga e dos determinantes genéticos da infecção por EPEC em crianças de países em desenvolvimento.



## 9. Referência Bibliográficas

ABREU AG, BUERIS V, PORANGABATM, SIRCILIMP, NAVARRO-GARCIA F, ELIAS WP. 2013. Auto TransporterProtein-Encoding Genes Of Diarrheagenic *Escherichia coli* Are Found In Both Typical And Atypical Enteropathogenic *E. Coli* Strains. **Applied and Environmental Microbiology** 79:411– 414.

ARAUJO, J. M. Typical Enteroaggregative and Atypical Enteropathogenic Types Of *E. Coli* Are the Most Prevalent Diarrhea-Associated Pathotypes Among Brazilian Children. **Journal Of Clinical Microbiology**, V. 45, P. 3396-3399, 2007.

ARENAS-HERNÁNDEZ, M. M. P.; MARTÍNEZ-LAGUNA, Y.; TORRES, A. G. Clinical Implications Of Entero Adherent *Escherichia Coli*; **Current Gastroenterology Reports.**, V. 14, P. 386-394, 2012.

BARTELT, L.A. et al. “Barriers” To Child Development and Human Potential: The Case for Including The “Neglected Enteric Protozoa” (Nep) And Other Enteropathy-Associated Pathogens In The Ntds. **Plos Neglected Tropical Diseases**, V. 7, N. 4, 2013.

BAUMANN D, SALIA H, GREUNE L, NORKOWSKI S, KORNER B, UCKELEYZM, FRANKEL G, GUENOT M, RUTER C, SCHMIDT MA. 2018. Multitalented Espb Of Enteropathogenic *Escherichia Coli* (Epec) Enters Cells Autonomously And Induces Programmed Cell Death In Human Monocytic Thp-1 Cells. **International Journal of Medical Microbiology** 308:387– 404.

BLACK, R. E. et al. Maternal and Child Undernutrition and Overweight In Low-Income And Middle-Income Countries. **The Lancet**, V.382, N. 9890, P.427–451, 2013.

Brasil. **Sistema De Vigilância Alimentar E Nutricional - Sisvan**. Disponível Em: <[Http://Dabsistemas.Saude.Gov.Br/Sistemas/Sisvan/Relatorios\\_Publicos/Relatorios.Php](http://dabsistemas.saude.gov.br/sistemas/sisvan/relatorios_publicos/relatorios.php)>. Acesso Em: 10 Abr. 2021.

CROXEN, A. M.; LAW, J. R.; SCHOLZ, R.; KEENEY, M. K.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia Coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, V. 24, N. 4, P. 822-880, 2013.

DONNENBERG, M. S. et al. Bacterial Factors Associated with Lethal Outcome Of Enteropathogenic *Escherichia Coli* Infection: Genomic Case Control Studies. **Plos Neglected Tropical Diseases**, 2015.

DONNENBERG, M. S.; FINLAY, B.B. Combating Enteropathogenic *Escherichia Coli* (EPEC) Infections: The Way Forward. **Trends In Microbiology**. Vol. 21, No. 7, 2013.

FAGUNDES NETO, U. Enteropatia Ambiental. **Estudos Avançados**, Vol. 17, 2003.

FISCHER-WALKER, C.L. et al. Does Childhood Diarrhea Influence Cognition Beyond the Diarrhea-Stunting Pathway? **Plos one**, V.7, N. 10. 2012.

FRANZIN, F.M. et al. Locus of Enterocyte Effacement: A Pathogenicity Island Involved In The Virulence Of Enteropathogenic And Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* Subjected To A Complex Network Of Gene Regulation. **Biomed Research International**. Vol.15, 2015.

GOTTLIEB M, GUERRANTRIL, LIMA AAM, LEITE JP, SAMIE A, BESSONGPO, PAGE N, BODHIDATTA L, MASON C, SHRESTHA S, KIWELU I, MDUMAER, IGBALNT, BHUTTAZA, AHMED T, HAQUE R, KANG G, KOSEK MN, HOUPTE, Mal-Ed Network Investigators. 2018. 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** 6:E1309–E1318.

GUERRANT, R.L. et al. Practice Guidelines for The Management of Infectious Diarrhea. **Idsa Guidelines**, V. 32, P. 331-50. 2001.

GUERRANT, R.L. et al. The Impoverished Gut – A Triple Burden of Diarrhea, Stunting and Chronic Disease. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, V. 10, N. 4, P. 220-29. 2013.

HARPER K.M. et al. Environmental Enteric Dysfunction Pathways and Child Stunting: A Systematic Review. **Plos Neglected Tropical Diseases**, V. 12, N. 1, P. 1-23, 2018.

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

HARTLAND, E. L.; LEONG, J. M. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli*: Ecology, Pathogenesis, And evolution. **Frontiers In Cellular and infection microbiology**.Vol. 3, 2013.

HAZEN, et al. Refining the Pathovar Paradigm Via Phylogenomics of The Attaching And Effacing *Escherichia coli*. **Pnas**.Vol. 110, 2013.

HAZEN, T.H. et al. Draft Genome Sequences of Nine Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains from Kenya. **Genome Announcements**.Vol, 2, 2014.

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

KOSEK, M.; BERN, C.; GUERRANT, R.L. The Global Burden Of Diarrhoeal Disease, As Estimated from Studies Published Between 1992 And 2000. **Bull World Health Organ.**, V.81, N. 3, P. 197-204, 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, N. 9888, P. 209-222, 2013.

LAMBERTI, L.M.; WALKER, C.L.F.; BLACK, R.E. Systematic Review of Diarrhea Duration and Severity in Children and Adults in Low- And Middle-Income Countries. **Bmc Public Health**, V.12, N. 276, P. 1-11. 2012.

LIMA AAM, SOARES AM, FILHO JQS, HAVT A, LIMA IFN, LIMA NL, ABREU CB, JUNIOR FS, MOTA RMS, PAN WK-Y, TROEGER C, MEDEIROS PHQS,

VERAS HN, PRATA MA, MCCORMICKBJJ, MCGRATH M, ROGAWSKI ET, HOUPTEP, PLATTS- MILLS JA, GRATZ J, SAMIE A, BESSONG P, BABJI S, KANG G, QURESHI S, SHAKOOR S, BHUTTAZA, HAQUE R, AHMED T, MDUMAER, SVENSEN E, KOSEK M, YORI PP, BODHIDATTA L, JASMIN S, MASON CJ, LANG D, GOTTLIEB M, GUERRANT R. L. 2018. Enteroaggregative *Escherichia Coli* Subclinical Infection And Coinfections And Impaired Child Growth In The Mal-EdCohortStudy. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition** 66:325–333.

LIMA, A. A.; SILVA, T. M.; GIFONI, A. M.; BARRRET, L. J.; MCAULIFFE, I. T.; BAO, Y.; FOX, J. W.; FEDORKO, D. P.; GUERRANT, R. L. Mucosal Injury and Disruption of Intestinal Barrier Function in Hiv- Infected Individuals with And Without Diarrhea and Cryptosporidiosis in Northeast Brazil. **American Journal Gastroenterology.**, V. 92, N. 10, P. 1861-1866, 1997.

LIU, J.; GRATZ, J.; MARO, A.; KUMBURU, H.; KIBIKI, G.; TANIUCHI, M.; HOWLADER, A. M.; SOBUZ, S. U.; HAQUE, R.; TALUKDER, K. A.; QURESHI, S.; ZAIDI, A.; HAVERSTICK, D. M.; HOUPTE, E. R. Simultaneous Detection Of Six Diarrhea-Causing bacterial Pathogens With Na In-House Pcr-Luminex Assay. **Journal of Clinical Microbiology.**, V. 50, P. 98 –103, 2012.

LIU, J.; KIBIKI, G.; MARO, V.; MARO, A.; KUMBURU, H.; SWAI, N.; TANIUCHI, M.; GRATZ, J.; TONEY, D.; KANG, G.; HOUPTE E. Multiplex Reverse Transcription Pcr Luminex Assay for Detection and Quantitation of Viral Agents Ofgastroenteritis. **Journal of Clinical Virology.**, V. 50, P. 308-313, 2011.

MAL-ED NETWORK INVESTIGATORS. 2014. The Mal-EdStudy: A Multinational And Multidisciplinary Approach To Understand The Relation ship Between Enteric Pathogens, Malnutrition, Gut Physiology, Physical Growth, Cognitive Development, And Immune Responses In Infants And Children Up To 2 Years Of Age In Resource-Poor Environments. **Clinical Infectious Diseases** 9:193–206.

MAL-ED NETWORK INVESTIGATORS. 2017. Relation ship Between Growth And Illness, Enteropathogens And Dietary Intakes In The First 2 Years Of Life: Findings From The Mal-Ed Birth Cohort Study. **Bmj Global Health** 2:E000370.

MOORE, S.R. et al. Prolonged Episodes of Acute Diarrhea Reduce Growth and Increase Risk of Persistent Diarrhea In Children. **Gastroenterology**, V. 139, P. 1156-64. 2010.

MORAIS, M.B. & FAGUNDES-NETO, U. Enteropatia Ambiental. **Estudos Avançados**, V.17, N. 48, P. 137-149. 2003.

Nataro, J. P.; Kaper, J. B. Diarrheagenic *Escherichia Coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, V. 11, P. 142-201, 1998.

NATARO, J. P.; MAI, V.; JOHNSON, J.; BLACKWELDER, W. C.; HEIMER, R.; TIRRELL, S.; EDBERG, S. C.; BRADEN, C. R.; GLENN MORRIS J. R. J.; HIRSHON, J. M. Diarrheagenic *Escherichia Coli* Infection in Baltimore, Maryland, And New Haven, Connecticut. **Clinical Infectious Diseases.**, V. 43, N. 4, P. 402-407, 2006.

NIEHAUS, M.D. et al. Early Childhood Diarrhea Is Associated with Diminished Cognitive Function 4 To 7 Years Later in Children in A Northeast Brazilian Shantytown. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, V.66, N. 5, P. 590-3. 2002.

OCHOA, T. J. et al. Enteropathogenic *E. Coli* (Epec) Infection in Children. **Current Opinion in Infectious Diseases**. P. 478–483, 2012.

OCHOA, T. J. et al. New Insights Into The Epidemiology Of Enteropathogenic *Escherichia Coli* Infection. **Transactionsof the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**.P. 852-856, 2008.

PITONDO, A. S. et al. Clonal Relationships Determined ByMultilocus Sequence Typing Among Enteropathogenic *Escherichia Coli* Isolated in Brazil. **Canadian Journal Microbiology**.Vol. 55, 2009.

PLATTS-MILLS JA, LIU J, ROGAWSKI ET, KABIR F, LERTSEHTAKARN P, SIGUAS M, KHAN SS, PRAHARAJ I, MUREI A, NSHAMA R, MUJAGA B, HAVT A, MACIEL IA, MCMURRYTL, OPERARIO DJ, TANIUCHI M, GRATZ J, STROUP SE, ROBERTS JH, KALAM A, AZIZ F, QURESHI S, ISLAM MO, SAKPAISAL P, SILAPONG S, YORI PP, RAJENDIRAN R, BENNY B, MCGRATH M,

MCCORMICKBJJ, SEIDMANJC, LANG D, PLATTS-MILLS, J. A. et al. Association Between Enteropathogens And Malnutrition In Children Aged 6-23 Mo In Bangladesh: A Case-Control Study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, V. 105, P. 1132-1138, 2017.

PLATTS-MILLS, J. A. et al. Pathogen-Specific Burdens of Community Diarrhoea in Developing Countries: A Multisite Birth Cohort Study (Mal-Ed). **The Lancet Global Health**, V. 3, N. 9, P.564-575, 2015.

RAJESHWARI, K. et al. Draft Genome of *Escherichia Coli* O146 Isolate from Maulana Azad Medical College, New Delhi, India. **Genome Announcements**. Vol. 3, 2015.

RODRIGUEZ-ANGELEZ, G; Principales Características Y Diagnóstico De Los Grupos patógenos De *Escherichia Coli*. **Salud pública De México**, V. 44, N. 5, P. 464-475, 2002.

ROGAWSKI E.T. et al. Epidemiology of Enteroaggregative *Escherichia Coli* Infections and Associated Outcomes in The Mal-Ed Birth Cohort. **Plos Neglected Tropical Diseases**, V. 11, N. 7, P. E0005798, 2017.

ROGAWSKI, E. T. et al Use of Quantitative Molecular Diagnostic Methods to Investigate the Effect of Enteropathogen Infections on Linear Growth In Children In Low-Resource Settings: Longitudinal Analysis Of Results From The Mal-Ed Cohort Study. **The Lancet Global Health**, V. 6, N. 12, P. E1319–E1328, 2018.

SALVADOR FA, HERNANDES RT, VIEIRA MA, ROCKSTROH AC, GOMES TA. 2014. Distribution Of Non-Lee-Encoded Type 3 Secretion System Dependent Effectors In Enteropathogenic *Escherichia Coli*. **Brazilian Journal Microbiology** 45: 851–855.

SANTOS, A. K. S. et al. Virulence-Related Genes and Coenteropathogens Associated with Clinical Outcomes of Enteropathogenic *Escherichia Coli* Infections in Children From the Brazilian Semiarid Region: A Case-Control Study Of Diarrhea. **Journal Of Clinical Microbiology**, V.57, N. 7, 2019.

SANTOS, A. S.; Finlay, B. B. Bringing Down the Host: Enteropathogenic and Enterohaemorrhagic *Escherichia Coli* Effector-Mediated Subversion of Host Innate Immune Pathways. **Cellular Microbiology**, V. 17, N. 3, P. 318-332, 2015.

TANIUCHI, M.; WALTERS, C. C.; GRATZ, J.; MARO, A.; KUMBURU, H.; SHETABUTR, O.; BODHIDATTA, L.; KIBIKI, G.; TONEY, M. D.; BERKELEY, L.; NATARO, P. J.; HOUP, R. E. Development of A Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for Diarrheagenic *Escherichia Coli* and *Shigellas* Pp. And Its Evaluation on Colonies, Culture Broths, And Stool. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, V. 73, P. 121-128, 2012.

TORRES, A. G.; Pathogenic *Escherichia Coli* in Latin American; **Bentham E-Books**, V. 5, N. 54, 2010.

TRABULSI, L. R.; Keller, R.; Gomes, T. A. T. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia Coli*; **Emerging Infectious Diseases**, V. 8, N. 5, P. 508-513, 2002.

VASCONCELOS, M.J.O & BATISTA, M. Doenças Diarreicas Em Menores De Cinco Anos No Estado De Pernambuco: Prevalência E Utilização De Serviços De Saúde. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, V.11. 2008.

VIDAL, J. E.; CANIZÁLEZ-ROMÁN, A.; GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ, J.; NAVARRO-GARCÍA, F. Patogénesis Molecular, Epidemiologia Y Diagnóstico De *Escherichia Coli* Enteropatógena. **Salud Pública De México**, V. 49, N.5, P. 376-386, 2007.

Wong, A.R. Et Al. Enteropathogenic and Enterohaemorrhagic *Escherichia Coli*: Even More Subversive Elements. **Molecular Microbiology**, P. 1420-1438, 2011.

World Health Organization/The United Nations Children's Fund. Diarrhoea: Why Children Are Still Dying and What Can Be Done. Geneva, New York: P. 68, Who. 2013.

## **ANEXOS**





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

Nome Criança \_\_\_\_\_ PID #

Participante: Mãe: \_\_\_\_\_ PID #

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

#### De Que Trata Este Estudo

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

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

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

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

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

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

Este estudo será realizado em Fortaleza, Brasil.

#### O Que Acontecerá Durante o Estudo?

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

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

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

Dr. Miriam Parente Monteiro  
 Coordenadora Adjunta do Comitê  
 de Ética em Pesquisa  
 COMEP/UFCE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Comitê de Ética em Pesquisa da UFC (COMEPE), telefone: 3366.8338. Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127

Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-270.

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

Dr. Álvaro Madciro, IPREDE (telefone: 3218.4000)

**Assinatura**

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

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

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

\_\_\_\_\_  
DATA

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

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

\_\_\_\_\_  
DATA

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

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

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

\_\_\_\_\_  
DATA

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

