



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE
CURSO DE FARMÁCIA

DORALICE RIBEIRO ALVES

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE
CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGÊNICAS NO LACEN/DF**

BRASÍLIA, DF

2015

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE
CURSO DE FARMÁCIA

DORALICE RIBEIRO ALVES

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE
CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGÊNICAS NO LACEN/DF**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel em
Farmácia à Faculdade de Ceilândia da
Universidade de Brasília.

Orientadora: Dra. Thaís Alves da Costa Lamounier

BRASÍLIA, DF

2015

DORALICE RIBEIRO ALVES

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE
CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGÊNICAS NO LACEN/DF**

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Thaís Alves da Costa Lamounier

(Instituição: Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília)

Prof. Dr. Rodrigo Haddad

(Instituição: Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília)

Paulo de Oliveira Martins Junior

(Instituição: Microbiologista do HUB e do HMIB)

BRASÍLIA, DF

2015

DEDICATÓRIA

A Deus, amoroso Pai, que por sua infinita graça me conduziu de maneiras incontáveis no decorrer desta longa e suada jornada, me dando força, capacidade, disposição, e que por vezes enxugou minhas lágrimas em meio a angústia, medos e incertezas.

Aos meus pais, Antônio Carlos e Maria das Graças, por serem meus heróis, que não mediram esforços para que eu pudesse chegar até aqui, que vestiram a camisa juntamente comigo, em que nenhum momento deixaram de estar caminhando estreitamente ao meu lado, que vivenciaram comigo todas as preocupações, alegrias e dificuldades, sendo, portanto, protagonistas dessa conquista.

Ao meu amor, Ivanilson Primo, pela ajuda, compreensão, companheirismo, paciência, por me acalmar, pelas palavras sábias ditas nos momentos mais apropriados, por me proporcionar momentos de diversão em meio ao elevado nível de estresse de cada semestre.

A todos os meus amigos de curso, por termos caminhados juntos, pelo carinho, pelo apoio, pelas palavras de incentivo por compartilharem das mesmas alegrias, tristezas e por sempre estarem ali, aptos a contemplarem a conquista do outro.

E a todos que de maneira direta ou indiretamente contribuíram e participaram de alguma forma desta caminhada, meu muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, profa. Dra. Thaís Alves da Costa Lamounier, por ter contribuído não apenas na construção deste trabalho, mas por ter auxiliado de maneira geral na minha formação acadêmica, de modo há sempre acreditar em mim, por meio de apoios, motivação e incentivos.

Ao Dr. Célio, pela disponibilidade e apoio.

Ao professor Alex Leite Pereira por gentilmente ter cedido a cepa controle de *E. coli* enteroagregativa (EAEC).

Ao Dr. Fabiano, pela imprescindível contribuição para a realização deste trabalho.

A banca de avaliadores composta pelo prof. Rodrigo Haddad e ao Paulo de Oliveira que prontamente aceitaram o convite.

Ao Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN/DF), por ter aberto as suas portas e ter me conferido a grande oportunidade de conhecimento, juntamente com a sua estrutura para realizar esta pesquisa.

A Universidade de Brasília e Faculdade de Ceilândia, pelo ensino de excelência.

A prof. Dra. Maria Hosana, por sempre me atender prontamente em todas as vezes que lhe procurei.

A todo o corpo docente pela entrega e pela dedicação em transmitir o conhecimento, conhecimento esse, não apenas técnico, mas, também por terem manifestado a importância do caráter e da conduta da formação profissional do farmacêutico.

PREFÁCIO

*“Ao tomar qualquer decisão, o filtro
mais importante que seu filho
pode ter é a palavra de Deus.”*

(Susan Alexander Yates)

*“O homem se torna muitas vezes o que ele
próprio acredita que é. Se insisto em repetir para
mim mesmo que não posso fazer uma determinada coisa,
é possível que acabe me tornando realmente incapaz de fazê-la.
Ao contrário, se tenho a convicção de que posso fazê-la,
certamente adquirirei a capacidade de
realizá-la, mesmo que não a tenha no começo.”*

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

A gastroenterite aguda é uma das patologias mais comuns em seres humanos. As crianças de 0 a 5 anos de idade são consideradas o público de maior propensão ao risco de morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil. Esta patologia não possui apenas um agente causal, mas sim diversos agentes etiológicos, tais como: vírus, bactérias e parasitas. No entanto, na grande maioria das vezes, o diagnóstico laboratorial das gastroenterites bacterianas é realizado por meio da coprocultura. A falta de diagnósticos mais precisos tem se tornando inviável especialmente em ambulatório, devido ao elevado custo. No Brasil, tanto os laboratórios públicos e privados de microbiologia executam apenas a detecção de algumas bactérias como *Shigella* sp e *Salmonella* sp e raramente algumas infecções virais, não contemplando assim, a pesquisa de *Escherichia coli* diarriogênica, a qual é considerada frequentemente como o agente patogênico estreitamente ligado as formas endêmicas de diarreia infantil podendo representar aproximadamente 50% dos casos. Diante dessa condição que representa um problema de saúde pública, o presente estudo teve por objetivo iniciar a padronização da técnica de PCR Multiplex para detecção das cepas enteropatogênicas da *Escherichia coli* em um laboratório público de referência do Distrito Federal, uma vez que na Secretaria de Saúde do DF essas cepas não são identificadas. O estudo ainda se encontra em andamento para completa padronização e ensaios clínicos, que será capaz de identificar diferentes cepas patogênicas simultaneamente, tornando-se assim, uma ferramenta bastante útil para a investigação das gastroenterites no Distrito Federal.

Palavras-Chaves: gastroenterite, PCR multiplex, *E.coli* enteropatogênica, diagnóstico.

ABSTRACT

Acute gastroenteritis is one of the most common diseases in humans. Children aged 0 to 5 years are considered the public higher propensity to risk of morbidity and mortality in developing countries, including Brazil. This pathology has not only one causal agent, but rather several etiologic agents such as: virus, bacteria and parasites. However, in most cases, when is done the laboratory diagnosis of bacterial gastroenteritis, it is done by Coproculture. The lack of more precise diagnosis has become unfeasible especially in ambulatory due to the high cost. In Brazil, both public and private laboratories of microbiology perform only the detection of some bacteria such as Shigella and Salmonella, and rarely some viral infections, not including therefore the research of diarrheagenic Escherichia coli, which is often regarded as the pathogen closely linked to endemic forms of child diarrhea may represent approximately 50% of cases. Due this condition represents a public health problem, this study aimed to start standardization of Multiplex PCR for detection of enteropathogenic strains of Escherichia coli in a reference public laboratory of the Federal District, since the Federal District Department of Health these strains are not identified. The study is still in progress to complete standardization and clinical trials, to be able to identify different pathogenic strains simultaneously, thus becoming a useful tool for the investigation of gastroenteritis in the District Federal .

Keywords: gastroenteritis, Multiplex PCR, enteropathogenic *E.coli* , diagnosis

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μL: Microlitro

μM: Micromolar

AE: *attaching and effacing*

AggR: Gene localizado no plasmídeo de virulência de EAEC

ATCC: *American Type Culture Collection*

bfpA: Gene que codifica para proteína A do BFP em EPEC

BFP: Fimbrias formadoras de feixes

CH: Colite Hemorrágica

CVD432: Plasmídeo típico de *E. coli* enteroagregativa

DEC: *E.coli* diarriogênica

DNA : Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxirribonucleotídeo Fosfatado

E. coli : *Escherichia coli*

eaeA : Gene que codifica a proteína intimina

EAF: Fator de aderência de EPEC

EAEC : *E. coli* enteroagregativa

EHEC: *E. coli* enterohemorrágica

EIEC : *E. coli* enteroinvasiva

EPEC: *E. coli* enteropatogênica

ETEC: *E. coli* enterotoxigênica

HIV / AIDS: Vírus da Imunodeficiência Humana

ial: *invasion antigen loci*

LACEN / DF: Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal

It : Gene que codifica enterotoxina termo-lábil

mL: Mililitro

mM: Milimolar

OMS: Organização Mundial da Saúde

pb: Pares de base

PCR : Reação em cadeia da polimerase

rpm: Rotações por minuto

SHU: Síndrome Hemolítica- urêmica

st: Gene que codifica enterotoxina termo- estável

stx: Gene que codifica para toxina shiga

stx1: Toxina *Shiga* 1

stx2 :Toxina *Shiga* 2

Taq: *Thermus aquaticus*

TM : Temperatura de anelamento

TTP: Trombocitopenia Trombótica Púrpura

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Condições da PCR Multiplex.....29

Figura 2: Imagem invertida do gel de agarose 2% Indicando o perfil de amplicons de cepas controles de *Escherichia coli* . 1: Marcador 100 bp DNA Ladder Promega®; 2: cepa controle de ETEC com os iniciadores *lt* e *st*; 3 e 4: cepas controle de EPEC com os iniciadores *bfpA* e *eaeA*; 5 e 6: cepas controle de EHEC com os iniciadores *stx1* e *stx2*; 7: cepa controle de EIEC com o iniciador *ial* 8: cepa ATCC controle negativo; 9: multiplex PCR.....30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cepas Controles.....	26
Tabela 2. Genes e Iniciadores empregados para a realização da PCR Multiplex.....	27
Tabela 3. Reagentes utilizados para amplificação das cepas controle	28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 - Gastroenterite Aguda: epidemiologia, etiologia e seus agravantes.....	14
1.2 - <i>Escherichia coli</i>	17
1.3 - <i>E. coli</i> diarriogênica (enteropatogênicas)	18
1.3.1 - <i>E.coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	18
1.3.2 - <i>E.coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	20
1.3.3 - <i>E.coli</i> enteroagregativa (EAEC)	21
1.3.4 - <i>E.coli</i> enteroinvasiva (EIEC).....	22
1.3.5 - <i>E.coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	23
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	25
3.1- Objetivos gerais	25
3.2- Objetivos Específicos	25
4. METODOLOGIA	26
4.1- Considerações éticas	26
4.2- Procedimentos da padronização	26
4.2.1- Amostras (Cepas controles).....	26
4.2.2- Extração do DNA bacteriano.....	27
4.2.3- Amplificação gênica por meio da PCR multiplex.....	27
4.2.4- Condições da Eletroforese em gel de Agarose.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÃO	35
7. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	36
8.ANEXO	41
8.1- Anexo I	41

1. INTRODUÇÃO

A diarreia é a segunda principal causa de óbitos em crianças com idade inferior a cinco anos de idade, em todo o mundo. A situação é de extrema relevância a ponto de se observar que em média a cada cinco mortes de crianças uma está relacionada a diarreia. Estes dados chegam a aproximadamente 1,5 milhões de mortes a cada ano, um número maior de óbitos se forem comparados com a AIDS, malária e sarampo juntos (UNICEF/WHO, 2009).

Entende-se por diarreia uma condição clínica caracterizada pela alteração da função gastrointestinal acompanhada pela perda excessiva de água bem como de eletrólitos nas fezes. Sendo assim, esse aumento na quantidade tanto de água quanto de eletrólitos geram fezes malformadas que interfere no equilíbrio entre a absorção e a secreção da mucosa intestinal diminuindo a consistência das fezes, tornando-as líquidas ou semilíquidas (LIMA & DIAS, 2010; BRASIL, 2009).

A manifestação clínica da diarreia ocorre pelo aumento da frequência do número de evacuações com mais de três evacuações nas primeiras 24 horas, na presença ou ausência de febre, com ou sem vômitos. Geralmente a diarreia costuma durar por um período inferior a 7 dias, caso esse período se prolongue por mais 14 dias é caracterizada como diarreia persistente (LIMA & DIAS, 2010).

1.1 Gastroenterite Aguda: epidemiologia, etiologia e seus agravantes

A Diarreia é um sintoma comum da gastroenterite, sendo uma patologia comum na infância. Este público possui uma maior propensão de risco de morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, no qual, segundo os indicadores de mortalidade, ocorreram 3.449 mortes relacionados à diarreia e à gastroenterite de etiologia infecciosa em 2011 (DE CARVALHO et al, 2014).

A gastroenterite não possui apenas um agente causal, mas sim diversos agentes etiológicos, tais como: vírus, bactérias e parasitas. Os agentes bacterianos e parasitários, por exemplo, são mais predominantes nos países em

desenvolvimento do que os agentes virais. Além disto, bactérias costumam ser mais prevalentes durante os meses mais quentes do ano enquanto os vírus predominam principalmente nos meses mais frios (AMISANO et al, 2011; VARELLA et al, 2007; WGO, 2008).

Alguns estudos evidenciam que a mortalidade por gastroenterite nos países desenvolvidos é relativamente baixa. Entretanto, a taxa de morbidade não é tão distinta do que se tem observado nos países em desenvolvimento (VARELA et al, 2015).

Para as gastroenterites de etiologia viral é importante destacar as famílias: *Reoviridae* (rotavírus), *Caliciviridae* (norovírus e sapovírus), *Astroviridae* (astrovírus) e *Adenoviridae*. O norovírus, membro da família *Caliciviridae*, é considerado o principal agente causador de surtos de gastroenterite aguda de origem não bacteriana em todo o mundo (MORILLO & TIMENETSKY, 2011). As norovirose estão relacionadas aos surtos de origem alimentar, sendo a principal forma de transmissão fecal-oral (GEORGIADIS et al , 2010). No Brasil, o sistema de vigilância de diarreia aguda do Ministério da Saúde não inclui o diagnóstico de norovírus, pelo qual essa realidade não possibilita que haja uma avaliação a respeito do impacto gerado na saúde pública relacionada a esta enterovirose.

Com relação as gastroenterites de etiologia bacteriana, foco deste estudo, possuem uma prevalência de cerca de 2 bilhões de casos/ano representando a segunda maior causa de morte em crianças com menos de 3 anos de idade. São exemplos desses agentes: as *Escherichia coli* diariogênicas, *Vibrium cholera*, que ocorrem predominantemente em surtos epidêmicos, *Campylobacter jejuni* o qual costuma apresentar uma frequência de cerca 2 e 7 vezes mais elevado que do que *Salmonella* sp. e a *Shigella* sp., respectivamente (DE MOURA et al , 2012).

O quadro clínico gerado por este agente ocorre após um período de incubação de 1 a 7 dias, sendo caracterizada por diarreia líquida por vezes sanguinolenta e febre e vômitos podem não estar presentes. Já alguns sintomas podem ser indicativos para uma determinada etiologia, como por exemplo, febre elevada (>40°C) em infecção por *Shigella* sp (LIMA & DIAS , 2010).

Na maioria das vezes a forma de transmissão desses agentes se dá por meio da ingestão de alimentos e água contaminados como o consumo de carnes cruas,

mal cozidas, frutas não lavadas ou mal lavadas. Além disso, diversos fatores podem corroborar para o surgimento das infecções intestinais, dentre eles: práticas de higiene inadequada, idade, peso ao nascer, carências nutricionais, convívio em creches, falta de saneamento básico, estado imunológico, dentre outros (FIEDORUK et al, 2015). Contudo, as diarreias agudas também têm afetado as crianças e adultos que residem em regiões que possuem nível sanitário satisfatório (STRONI et al, 2014).

É importante ressaltar que embora essas infecções gastrointestinais sejam melhor evidenciadas em crianças, e que culminam em infecções graves e conseqüentemente em hospitalizações, há também um elevado número de casos de infecções que são endêmicas na comunidade, assintomáticas ou que ainda apresentam sintomas clínicos mais brandos, o que pode ser mais evidente quando a origem da gastroenterite aguda se dá por parasitas, uma vez que a evolução do quadro do paciente ocorra por vezes de maneira mais lenta (CASTRO et al, 2015).

O diagnóstico laboratorial das gastroenterites bacterianas é realizado na maioria das vezes por meio da Coprocultura. Entretanto, diante dessa condição que representa um problema de saúde pública, se faz necessário o emprego de diagnósticos mais específicos. Essa falta de diagnósticos moleculares na prática clínica tem se tornando inviável especialmente em ambulatório, devido ao custo elevado. Por isso, a pesquisa das *Escherichia coli* diarriogênica, que é considerado como o agente patogênico estreitamente ligado a formas endêmicas de diarreia infantil (BONKOUNGOU et al , 2013).

O advento de metodologias moleculares na reação em cadeia da polimerase (PCR) tem proporcionado uma excelente ferramenta na detecção desses agentes patogênicos entéricos. Outro meio substancial é a utilização da PCR multiplex, pois como o nome sugere, é capaz de identificar diferentes cepas patogênicas simultaneamente (WANG et al ,2014).

1.2. *Escherichia coli*

Esta bactéria é um bacilo gram-negativo, anaeróbio facultativo e pertence à Família *Enterobacteriaceae* que foi descrita em 1885 pelo alemão-austriaco chamado Theodor Escherich (DE MOURA et al, 2012 ; SANTOS et al, 2009).

A *E.coli* é tida como o agente patogênico mais frequentemente relacionado com as formas endêmicas de diarreia aguda em crianças e está identificada em aproximadamente 50% dos casos (BONKOUNGOU et al, 2013).

Sua classificação sorológica é dividida em sorogrupos e sorotipos, tendo como referência a composição antigênica pelo qual os antígenos O ou somáticos são para os sorogrupos e os antígenos flagelares ou H para os sorotipos. Existem ainda os antígenos K ou capsulares, que são relevantes na patogênese. Essa classificação (O: H: K) foi estabelecido por Kauffmann no ano de 1947 e contribuiu para a correta identificação de diferentes cepas de *E. coli* (BERTÃO & SARIDAKIS, 2007).

Este bacilo integra a microbiota normal do intestino do homem e outras espécies de mamíferos e aves. É considerada uma bactéria comensal, de forma que coexista em um equilíbrio, no entanto, quando ocorre uma quebra da homeostasia, a *E.coli* pode gerar prejuízo ao organismo humano, como por exemplo, em casos de hospedeiros imunocomprometidos. Ainda assim, nem todos as estirpes são inofensivas, podendo levar a formação diversos agravos e até mesmo óbito. Isso acontece justamente pela aquisição de atributos específicos de virulência que lhe permite obter uma maior capacidade de se adaptar a novos nichos e ampliar o seu potencial de patogenicidade. Esses atributos de virulência são rotineiramente codificados por elementos genéticos que possibilitam a mobilização de estirpes distintas afim de criar possíveis combinações de fatores de virulência, ou ainda, em elementos genéticos que podem ser móveis e se tornarem "fechados" no genoma (KAPER , NATARO & MOBLEY, 2004).

Sendo assim, as cepas de *E.coli* que possuem um potencial patogênico costumam ser agrupadas em estirpes causadoras de diarreias e estirpes extra-intestinais, as quais são capazes de culminar em uma variedade de infecções no

homem, como: meningite, infecções do trato urinário e septicemia (KAPER , NATARO & MOBLEY, 2004)

Já as cepas que são relacionadas às infecções intestinais, são atualmente conhecidas como *E.coli* diarriogênica ou ainda, *E.coli* enteropatogênicas, justamente por terem adquirido combinações bem-sucedidas de fatores de virulência que culminaram para transformação capazes de gerar patologias em indivíduos sadios. Dentre estas é possível citar: *E. coli enteropatogênica* (EPEC), *E. coli enteroinvasiva* (EIEC), *E. coli enterotoxigênica* (ETEC), *E. coli enterohemorrágica* (EHEC), *E. coli enteroagregativa* (EAEC) e *E. coli difusamente aderente* (DAEC) (NEJMA et al, 2014), sendo está última cepa de não interesse nesse estudo, o que justifica a sua não descrição no decorrer do trabalho.

1.3. *E.coli* diarriogênica (Enteropatogênicas)

1.3.1. *E. coli* enteropatogênica (EPEC)

A *E. coli* enteropatogênica foi o primeiro patótipo dentre as *E.coli* diarriogênica a ser descrita. De modo que desde 1979 pesquisas e estudos permitiram um melhor entendimento da patogênese da EPEC, sendo até agora a *E. coli* patogênica de maior compreensão (KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004).

A EPEC foi tida historicamente, como a mais importante cepa responsável por ocasionar diarreia infantil nos países em desenvolvimento (DE MOURA et al, 2012).

Em um Simpósio Internacional realizado em São Paulo em 1995, esta estirpe foi separada em dois grupos: EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC) pelo qual ficou definido que:

“EPEC são *Escherichia coli* diarriogênicas que produzem uma lesão histopatológica característica conhecida como *attaching and effacing* (A/E) nas células intestinais e que não produzem *Shiga*, *Shiga-like*, ou verotoxinas. EPEC típica de origem humana possui um plasmídeo de

virulência conhecido como EAF (EPEC *adherence factor*) que codifica aderência localizada em cultura de células epiteliais mediada pelo *Bundle Forming Pilus* (BFP), enquanto que EPEC atípica não possui esse plasmídeo” (SILVA & SILVA, 2005).

A EPEC atípica tem predominado nos países industrializados, enquanto que os EPEC típica têm sido isolados com uma maior frequência nos países em desenvolvimento (AMISANO et al, 2011). Casos de diarreia aguda infantil já foram isolados envolvendo as cepas EPEC atípicas no Brasil. Um estudo feito no Uruguai, também obteve essa categoria como a principal enteropatógeno isolado (AMISANO, et al, 2011).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) chegou a reconhecer doze sorogrupos O. Sendo os seguintes sorotipos de EPEC mais rotineiramente encontrados: O55:H6, O86:H34, O111:H2, O114:H2, O119:H6, O127:H6, O142:H6, O142:H34 que representam as (EPEC típicas) e O26:H11, O55:H7, O55:H34, O86:H8, O111ac:H8, O111:H9, O111:H25, O119:H2, O125ac:H6, O128:H2 representando as EPEC atípicas (SILVA & SILVA, 2005; JAFARI, ASLANI & BOUZARI, 2012).

Os quadros diarreicos gerados pela *E. coli* enteropatogênica costumam, de maneira geral, ser mais severos do que os ocasionados pelas demais cepas diarriogênicas, com prevalência de óbitos maior que 30% que podem estar intrinsicamente correlacionados com carências nutricionais (SILVA & SILVA, 2005). Isto pode justificar porque as infecções por EPEC estão estritamente associadas as crianças com menos de 2 anos de idade (AMISANO et al, 2011; BARLETTA et al, 2011). Os principais sintomas clínicos dessa patologia incluem diarreia aquosa seguida de febre, mal-estar e vômitos. Já foi observado que algumas crianças apresentaram diarreia sanguinolenta, esses casos ainda não estão bem esclarecidos, muito embora já se detectou a presença de elementos inflamatórios nas fezes de crianças, tais como leucócitos, que vem sendo utilizado como um indicador de diarreia inflamatória (MERCADO et al, 2013).

Também foi observado que as crianças que não receberam o leite materno possuem uma carga bacteriana maior em relação àquelas que mamam. No entanto,

mesmo o leite materno sendo considerado um fator de proteção, não impede o aparecimento de sintomas (BARLETTA et al, 2011).

A sintomatologia diarriagênica desta cepa é ocasionada por uma proteína denominada intimina (*eaeA*) de membrana externa que é responsável pelo íntimo contato da bactéria com o enterócito que irá lisar a célula uma vez que esta proteína se liga as células do epitélio intestinal (BARLETTA et al, 2011; JAFARI, ASLANI & BOUZARI, 2012).

1.3.2. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

A *Escherichia coli* O157:H7 é o sorotipo de *E. coli* que pertence ao grupo EHEC que tem melhor representando a categoria de agentes patogênicos emergentes (PAULA, CASARIN & TONDO, 2014).

Anteriormente o principal reservatório era o trato gastrointestinal de bovinos, uma vez que estes são capazes de secretar o patógeno em suas fezes, levando a contaminação do ambiente, alimentos e água. Infecções em humanos foram detectadas em surtos alimentares em 1982, nos Estados Unidos, quando essa cepa ocasionou quadros diarréicos sanguinolentos que envolveu cerca de 47 indivíduos após terem feito a ingestão de sanduíches contendo hambúrgueres de carne bovina.

Entretanto, a EHEC só ganhou uma notoriedade, em 1992, quando acometeu mais de 700 indivíduos em um surto de colite hemorrágica que provocou o óbito de quatro crianças em uma lanchonete de uma grande rede conhecida de *fast-food* nos Estados Unidos (PAULA, CASARIN & TONDO, 2014; MITTELSTAEDT & CARVALHO, 2006).

No Brasil a descrição inicial da *E. coli* O157:H7 foi feita pelo Instituto Adolfo Lutz, por meio de uma amostra de água em uma chácara em São Paulo, sendo que até então não havia relação de patologias em humanos. Contudo, em 1990, neste mesmo Instituto foi realizado o isolamento dessa cepa em pacientes com HIV/AIDS e mais alguns anos depois a bactéria foi isolada nas fezes diarréicas sanguinolentas

de crianças e de um adulto com um quadro severo de diarreia (MITTELSTAEDT & CARVALHO, 2006)

O fator primordial de virulência nesta cepa, que tem sido o desencadeador pelas graves consequências é a produção da toxina *Shiga* (stx) a qual se divide em duas classes principais de toxinas: a *stx1* e a *stx2* (TYLER *et al*, 2013; OH *et al*, 2014). Esta toxina não é responsável apenas por gerar danos ao epitélio, mas segundo dados epidemiológicos sugerem que a *stx2* é considerada a toxina mais importante no desenvolvimento de síndrome hemolítico-urêmica (SHU), sendo responsável por cerca de 80% dos casos. Nesta síndrome, o indivíduo apresenta fezes diarreicas sanguinolentas, anemia hemolítica e falha renal aguda, que pode ser o gatilho para o desenvolvimento de insuficiência renal grave (PAULA, CASARIN & TONDO, 2014; OH *et al*, 2014; SOLEIMANI *et al*, 2012).

Além disso, a EHEC pode levar a colite hemorrágica (CH), que tem sido considerada como uma das consequências menos grave, pela qual o paciente sente dores abdominais severas, acompanhada de diarreia aguda que perdura num período de incubação de aproximadamente 3 a 4 dias. Além disso, pode causar trombocitopenia trombótica púrpura (TTP) que afeta o sistema nervoso central e este quadro pode ser distinto da SHU, mesmo que ambas as síndromes apresentem características clínica e patológica muito semelhantes (PAULA, CASARIN & TONDO, 2014).

1.3.3. *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

Dentre as cepas diariogênicas, a *Escherichia coli* enteroagregativa foi a mais recente a ser identificada. Após a ETEC, esta é também considerada a segunda causa mas comum de diarreia do viajante, tanto nos países desenvolvidos como em desenvolvimento (JAFARI, ASLANI & BOUZARI, 2012). Os quadros de diarreia ocasionados pela EAEC costuma ser aquosa, podendo ser sanguinolenta e apresentar muco (DE PAULA, CASARIN & TONDO, 2014; KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004).

A ausência de modelos experimentais juntamente com a heterogeneidade apresentada pelos fatores de virulência tem sido responsável pela escassez de diversas informações mais detalhadas, tais como: dados epidemiológicos, formas de transmissão, bem como os mecanismos de patogenicidade. O que se acredita é que a colonização da mucosa intestinal, principalmente do cólon e a formação de biofilme mucoide acompanhada pela secreção de várias toxinas, sejam elas enterotoxinas e citotoxinas, bem como a inflamação das mucosas sejam os meios pelos quais esta cepa desencadeia a patogênese (JAFARI, ASLANI & BOUZARI, 2012).

No Brasil, este sorogrupo, tem sido identificado, como o principal agente etiológico de diarreia em crianças com idade inferior a 5 anos de idade. Os distúrbios gastrintestinais ocasionados pela EAEC envolve um processo complexo de interação entre o hospedeiro e o patógeno, incluindo também os seguintes fatores: a suscetibilidade genética do hospedeiro, a heterogeneidade dos fatores de virulência da EAEC bem como a carga bacterina presente na infecção (ANDRADE, HAAPALAINEN & NETO, 2011).

1.3.4. *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC)

Esta estirpe é intrinsicamente relacionada com as questões bioquímicas, genéticas, bem como patogenicamente de uma outra bactéria, denominada *Shigella spp.*

A mucosa do cólon é o local ideal para desencadear uma infecção por ambas as bactérias, como por exemplo, uma colite inflamatória devido a invasão nos macrófagos e nas células epiteliais que resultam na maioria das vezes em uma diarreia aquosa, podendo apresentar fezes sanguinolentas e com presença de muco, nos casos de maior gravidade (PAULA, CASARIN & TONDO, 2014; KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004).

A aquisição do plasmídeo invasivo é responsável pela codificação que dará habilidade para esta cepa invadir as células epiteliais intestinais do hospedeiro.

Por fim, a produção de toxinas acabam por colaborar com a atividade enterotóxica que transportam o gene *ial* (JAFARI, ASLANI & BOUZARI, 2012).

1.3.5 *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)

Trata-se do enteropatógeno conhecido frequentemente por causar diarreia nas crianças em países pobres. Esta cepa também é responsável por gerar a diarreia do viajante, que costuma acometer os visitantes de países industrializados quando viajam para as áreas menos favorecidas, onde o tratamento de água, por exemplo, não é adequado. Estima-se que anualmente cerca de 700.000 óbitos ocorram em decorrência das gastroenterites ocasionadas pela ETEC. No Brasil, os casos envolvendo diarreia infantil pela ETEC correspondem cerca de 7 á 20% (MENEZES et al, 2003).

O quadro clínico da diarreia do viajante costuma apresentar fezes líquidas, dor abdominal, febre baixa, náuseas e mal-estar. Geralmente esse quadro é auto-limitado, não ultrapassando mais que 5 dias. Contudo, é preocupante, pois, com a intensa perda de eletrólitos pode levar a uma desidratação e desnutrição em crianças e idosos (VILCHEZ et al, 2009).

A ETEC é capaz de ocasionar essa patologia, por elaborar uma toxina denominada termo-lábil (*lt*) e uma toxina denominada termo-estável (*st*) ou ambas conhecidas como toxinas (*lt/st*), que são responsáveis por desencadear a perda de fluidos no intestino (MENEZES et al, 2003). Os sorogrupos descritos mais comuns são: O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O114, O115, O128ac, O148, O153, O159 e O167.

O diagnóstico da infecção por ETEC se dá obrigatoriamente pela detecção de uma ou de ambas as toxinas (VILCHEZ et al, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de ser observado um decréscimo nas taxas de mortalidade infantil, a diarreia ainda é tida como uma das principais causas da mortalidade em criança nos países em desenvolvimento devido ao fato de estar intrinsecamente correlacionada com inúmeros fatores como os de ordem nutricional, econômica e ambiental. Essa condição clínica continua ser considerada como um grave problema de saúde pública nesses países, dentre os quais se enquadra o Brasil.

A *Escherichia coli* tem sido o agente etiológico mais rotineiramente envolvido com as formas endêmicas de diarreia infantil, podendo ser encontradas em aproximadamente 50% dos casos.

O diagnóstico dessas cepas patogênicas de *E.coli* é dificultada, por diversas razões, dentre as quais se encontra o fato dessas bactérias não serem identificadas somente pelos parâmetros bioquímicos, tendo em vista, que as cepas diarriogênicas (DEC) costumam ser indistinguível das *Escherichia coli* comensais. Para tanto, para realizar essa diferenciação são necessários métodos mais específicos e precisos, tais como as técnicas moleculares, como a técnica cadeia da polimerase (PCR) e mais precisamente a PCR multiplex que tem se mostrado como uma excelente ferramenta, uma vez que, é permitido a identificação das distintas cepas patogênicas simultaneamente.

Além disso, na Secretaria de Saúde do Distrito Federal as cepas de *E. coli* enteropatogênicas não são identificadas, então, a padronização da técnica de PCR multiplex será de fundamental importância para este diagnóstico, bem como para o tratamento adequado.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Este estudo tem por finalidade iniciar a padronização da técnica de PCR multiplex para detecção das cepas de *Escherichia coli* enteropatogênicas em parceria ao Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN/DF).

3.2. Objetivos Específicos

- Realizar a distinção das cepas de *E. coli* controle das diferentes estirpes das cepas diarriogênicas, que se dará por meio da amplificação do tamanho dos amplicons esperados.
- Apontar a importância de se padronizar, bem como validar uma técnica molecular de PCR multiplex, para permitir a detecção dos genes de virulência da *Escherichia coli* no Distrito Federal.

4. METODOLOGIA

4.1. Considerações éticas

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília com CAAE 31843414.6.0000.0030 (Anexo I).

4.2. Procedimentos da padronização

4.2.1. Amostras – Cepas Controle

Foram empregadas um total de 7 (sete) cepas controle. Dentre estas 6 (seis) controles positivos de cepas diariogênicas (DEC) de *Escherichia coli* e um controle negativo (cepa ATCC 25922), conforme listadas na Tabela 1. A cepa controle de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) foi gentilmente cedida pelo professor Alex Leite Pereira. As demais cepas controles foram obtidas através do banco de cepas controles positiva do LACEN/DF. Estas bactérias foram mantidas e isoladas em Agar Mueller Hinton.

Tabela 1: Cepas Controles

Cepas	Controle
<i>E. coli</i> enteropatogênica – EPEC (1)	+
<i>E. coli</i> enteropatogênica – EPEC (2)	+
<i>E. coli</i> Enteroinvasiva – EIEC	+
<i>E. coli</i> enterohemorrágica – EHEC	+
<i>E. coli</i> enterotoxigênica – ETEC	+
<i>E. coli</i> O:157 – EHEC	+
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-

(+) controle positivo (-) Controle Negativo

4.2.2. Extração do DNA Bacteriano

A Extração do DNA genômico se deu por meio da diluição de cerca de 2 a 3 colônias de cada uma das cepas controles que foram inseridas com auxílio da alça bacteriológica em um tubo de ensaio contendo 1,0 mL de água milliQ. A diluição foi realizada até atingir a turvação de 0,6 a 0,8 na escala McFarland. Ao término da diluição foi feita a transferência de 500 µl para um microtubo de 1,5 mL. Essas suspensões foram então aquecidas a 100°C por 15 minutos sob agitação. Após agitação e aquecimento estas foram levadas ao freezer de modo a serem mantidas a - 20°C por 5 minutos. Passados os 5 minutos, foram imediatamente centrifugadas á 12.000 rpm por 2 minutos. 200 µl do sobrenadante foram adicionados em um novo microtubo e armazenado à -20 °C.

4.2.3. Amplificação Gênica por meio da Técnica de PCR multiplex

A determinação dos genes *lt*, *st*, *bfpA*, *eaeA*, *stx1*, *stx2* e *ial* se deu através do emprego da técnica de PCR multiplex de acordo com SAUCEDO *et al* (2003). Os genes, bem como os iniciadores e os tamanhos dos fragmentos por pares de base (pb) estão representados na Tabela 2.

Tabela 2: Genes e Iniciadores empregados para a realização da PCR Multiplex

Enteropatógeno	Genes	Primer (5' – 3')	Tamanho do Fragmento
ETEC	<i>lt</i>	F: GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC R: CGG TCT CTA TAT TCC CTG TT	450
	<i>st</i>	F: ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCT T R: CAC CCG GTA CAA GCA GGA TT	190
EPEC	<i>bfpA</i>	F: AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC R: GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA	324
	<i>eaeA</i>	F: GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC R: CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG	384
EHEC	<i>stx 1</i>	F: CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G R: AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC	150
	<i>stx 2</i>	F: GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC R: TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G	255
EIEC	<i>ial</i>	F: GGT ATG ATG ATG ATG AGT CCA R: GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC	650

(F) iniciador direto (R) iniciador reverso. Adaptado de: SAUCEDO *et al* (2003).

Os iniciadores usados neste estudo foram adquiridos na IDT (*Integrated DNA Technologies*), sendo estes reconstituídos de acordo com fabricante. Todos foram diluídos para a concentração estoque de 100 μM e posteriormente foi realizado a diluição de cada primer para a concentração de 10 μM .

A Tabela 3 representa os volumes utilizados para a reação que teve como volume final 25 μl . A concentração final de cada iniciador seguiu os padrões de SAUCEDO *et al* (2003).

Tabela 3. Reagentes utilizados para amplificação das cepas controle

Reagentes	Estoque	Volume
Tampão Taq	5 x	2,5 μl
dNTP	2,5 mM	2,0 μl
MgCl_2	50 mM	1,5 μl
Iniciador (F)	10	SAUCEDO <i>et al</i> (2003)
Iniciador (R)	10	SAUCEDO <i>et al</i> (2003)
Taq DNA polimerase	5U/ μL	0,25 μl
DNA	-	3,0 μl
H_2O	-	Completar até volume final
Volume Final		25 μl

(F) iniciador direto (R) iniciador reverso

Para a reação com a cepa ATCC 25922, foi empregado uma mistura de todos os iniciadores, pelo qual foi denominado de “sopão de *primers*”.

Com a finalidade de se amplificar as cepas controles das *E.coli* enteropatogênicas, os tubos contendo cada reação foram inseridos no termociclador (*Eppendorf Mastercycler gradiente*), respeitando as seguintes condições de PCR de acordo com a Figura 1.

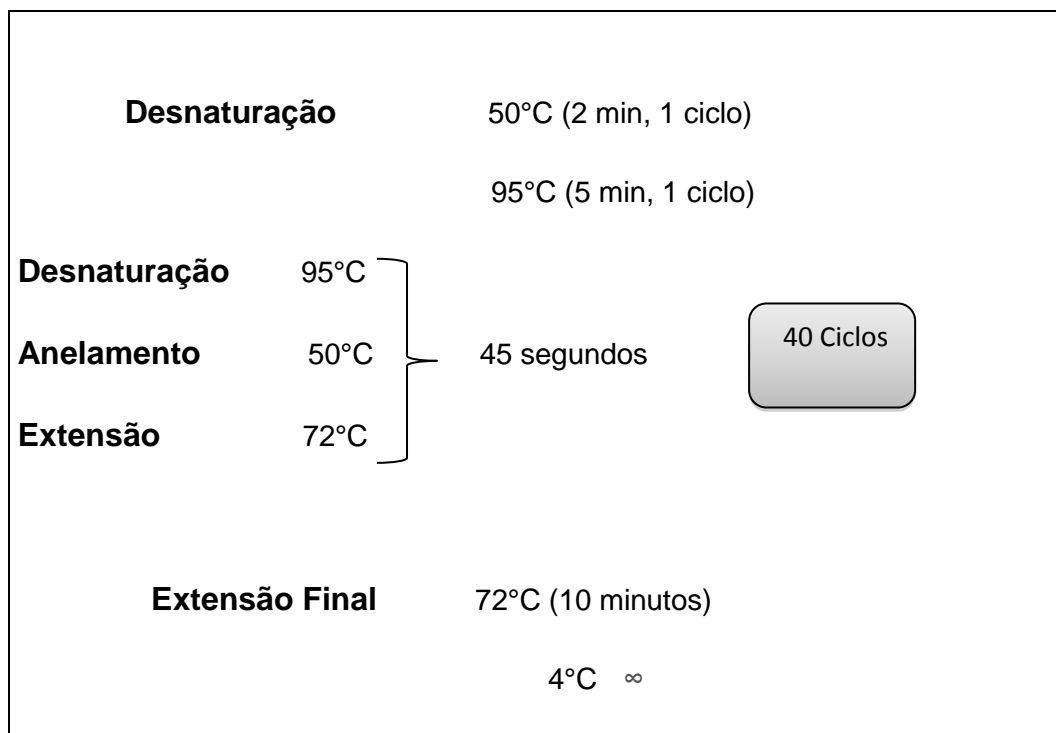


Figura 1: Condições da PCR Multiplex

4.2.4. Condições da Eletroforese em Gel de Agarose

A detecção dos produtos da PCR multiplex foram observadas em gel de agarose a 2%. O tempo gasto na corrida do gel foi em torno de 45 minutos, empregando uma voltagem de 100 V. Foi utilizado o marcador de 100 pb (DNA Ladder Promega®). Em cada um dos poços foram aplicados 15µL da amostra (PCR), juntamente com o tampão de corrida. Para a corrida de eletroforese foi utilizado o Tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) na concentração de 1X.

Após a corrida, o gel foi para o banho de brometo de etídeo por aproximadamente 40 minutos, para posterior visualização em luz ultravioleta (UV) com o auxílio do Fotodocumentador (*Gel Logic 200 Imaging System*).

5.0. RESULTADO E DISCUSSÃO

Foram utilizadas seis cepas controles positivas, conforme já citado na Tabela 1 e foram realizadas PCRs para cada cepa individualmente. Foi realizado PCR multiplex para a cepa ATCC controle negativo bem como para o mix de DNA com todas as cepas (Figura 2).

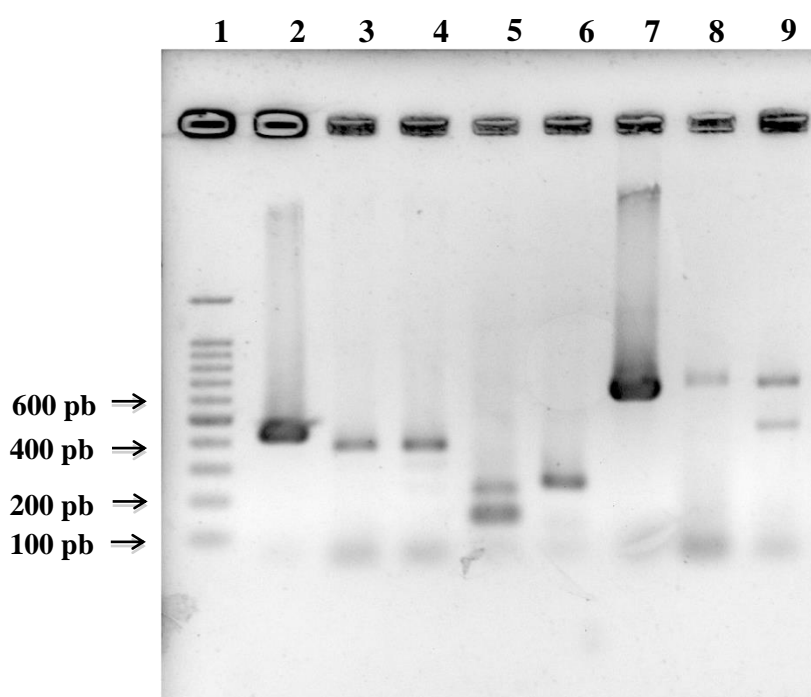


Figura 2: Imagem invertida do gel de agarose 2% Indicando o perfil de amplicons de cepas controles de *Escherichia coli*. 1: Marcador 100 bp DNA Ladder Promega®; 2: cepa controle de ETEC com os iniciadores *It* e *st*; 3 e 4: cepas controle de EPEC com os iniciadores *bfpA* e *eaeA*; 5 e 6: cepas controle de EHEC com os iniciadores *stx1* e *stx2*; 7: cepa controle de EIEC com o iniciador *ial*; 8: cepa ATCC controle negativo; 9: multiplex PCR

Ao analisar os dois iniciadores (*It* e *st*) na PCR multiplex para a cepa controle de ETEC foi possível observar a amplificação do gene *It* que corresponde a 450 pares de base (pb), todavia, não houve a amplificação do gene *st*. Duas hipóteses podem ser levantadas: 1) ou a cepa testada não possui o gene em questão; 2) ou pode não

ter havido o anelamento adequado dos pares de iniciadores pela grande diferença entre as temperaturas de anelamento dos iniciadores direto (46°C) e reverso (59°C).

A questão das temperaturas de anelamento (TMs) esbarra na condição de que cada iniciador possui uma TM específica e, neste caso, testes subsequentes como gradiente de temperatura serão realizados na tentativa de padronizar esta reação.

Com relação a cepa controle EPEC foi realizado a PCR multiplex com os pares de iniciadores *bfpA* e *eaeA*. Duas cepas diferentes foram testadas esperando amplicons de 324 e 384 pb respectivamente.

É possível observar, na segunda cepa representada no poço 4 na mesma figura 2, as bandas correspondentes a 324 e 384 pb. Contudo, a reação referente ao gene *bfpA* poderá ser otimizada, aumentando a concentração dos pares de iniciadores na reação final. A cepa controle de EPEC representada no poço 3 não possuía o gene *bfpA*.

Para as cepas de *E. coli* enterehemorrágica foram testadas as cepas de STEC e O:157. É possível observar a amplificação dos genes *stx1* e *stx2* com 150 e 255pb respectivamente, e como esperado, a cepa O:157 amplificou apenas o gene *stx2*.

Já para a cepa EIEC foram testados os iniciadores para a amplificação do gene *ial* que correspondeu a 650pb conforme o amplicon esperado.

A respeito do controle negativo no qual foi utilizada a cepa ATCC 25922 não houve a amplificação dos genes estudados na PCR multiplex, utilizando o mix de iniciadores (“*sopão de primers*”).

No poço 9 foi realizada a reação de PCR multiplex utilizando o mix de iniciadores bem como dos DNAs das cepas estudadas, todavia, houve ampliações de bandas inespecíficas, evidenciando a necessidade da padronização para o multiplex PCR utilizando 14 iniciadores na mesma reação.

A padronização segue com o ajustamento de algumas temperaturas de anelamento dos iniciadores, bem como com as concentrações finais dos mesmos na reação final (mix) e também a concentração final do mix de DNA.

Vale ressaltar que este estudo buscou desenvolver a padronização apenas as cepas enteropatogênicas enteroinvasivas, não contemplando, portanto, as enteroagregativas como a EAEC. Futuramente esta cepa será inserida na PCR multiplex haja vista que a reação de PCR realizada isoladamente com os iniciadores para o genes (*evd* e *AggR*) obteve o amplicom esperado (dados não mostrados).

Assim, é evidente a necessidade de se realizar mais testes, bem como buscar superar algumas limitações que ocorreram durante o estudo. Apesar de ser clara a necessidade da padronização das cepas diarriogênicas, a padronização pelo método molecular de PCR multiplex é bastante complexo, pois, pode ser dificultada por diversos interferentes como a possível presença de ampliações inespecíficas, evidenciando assim, a papel fundamental de se otimizar a sensibilidade bem como a especificidade para que de fato venha a ser utilizado no diagnóstico laboratorial como padrão ouro (OH et al , 2014).

A necessidade da padronização para identificar estas cepas pela técnica de PCR multiplex no Distrito Federal possui implicação significativa na saúde pública, pois, como já mencionado anteriormente, as cepas de *Escherichia coli* diarriogênicas têm sido mais rotineiramente observadas com as formas endêmicas de diarreia infantil (BONKOUNGOU et al, 2013). Ou seja, trata-se de um estudo de suma importância, visto que, o isolamento destas cepas tem sido subestimado.

Essa subestimação é dada em decorrência da dificuldade encontrada de se realizar o diagnóstico, tendo em vista a necessidade de métodos e testes mais precisos e específicos, que não tem sido empregado na prática clínica (DA COSTA et al, 2010).

O diagnóstico das gastroenterites ocasionadas por estas cepas enteropatogênicas acaba por se tornar problemática devido a inúmeros pontos críticos envolvidos, tais como: as semelhanças da sintomatologia que podem ser, portanto, confundidas com outras síndromes, entre elas a patologia causada pela *Shigella* sp; além de serem muitas vezes indistinguíveis das cepas de *E. coli* não patogênicas, isto é, as ditas comensais (SUMBANA et al , 2015).

Sendo assim, fica evidente a tamanha importância de se identificar, bem como diferenciar essas estirpes enteropatogênicas dos não causadores de

patologias no homem, uma vez que cada uma destas cepas possuem um mecanismo para desencadear quadros clínicos distintos.

Outro ganho nesta identificação/diferenciação é a possibilidade de se traçar um perfil de prevalência destas cepas em cada região administrativa do Distrito Federal, de forma que esse conhecimento de prevalência contribui para melhor elucidar a origem e as causas de um surto ou até mesmo casos mais esporádicos.

Também fica evidenciado que muitos casos de patologias que acometem o trato gastrointestinal acabam não sendo diagnosticados justamente pela carência da solicitação médica da Coprocultura, tendo em vista que esta solicitação não é de praxe na rotina clínica. Esse procedimento, não executado pelo corpo clínico, parece ser justificado muitas vezes pelo paciente apresentar manifestações clínicas brandas, que costumam ser auto-limitadas, as quais também podem ser somadas com a não procura de assistência médica, ou ainda, podem ser explicadas pela sobrecarga na saúde pública que tem dificultado o emprego dos recursos médicos e laboratoriais disponíveis. Tais fatos podem corroborar para a não realização ou ainda limitadas solicitações de Coprocultura nos hospitais e laboratórios do Distrito Federal

Contudo, apenas os métodos de diagnóstico convencionais por si só não são suficientes e capazes de identificar as principais categorias desses patógenos entéricos, pois apresentam tanto a sensibilidade quanto a especificidade limitadas. Por isso, se tem optado pelo desenvolvimento de sistemas que permitam a identificação desses estirpes através da caracterização de genes específicos de virulência, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) (TOBIAS & VUTUCURU, 2012 ; TOBIAS et al, 2015 ; WANG et al , 2014)

Então, um dos métodos que tem sido amplamente utilizada como um método de diagnóstico é a PCR multiplex, pois além identificar as distintas cepas patogênicas simultaneamente, torna-se uma ferramenta bastante útil tanto para se conhecer e identificar a sinergia entre agentes etiológicos diferentes, além de poder revelar possíveis co-infeções (WANG et al , 2014).

Contudo, apesar de todo esse avanço na detecção dos enteropatógenos, por meio do emprego da PCR , esta ainda, é tipicamente limitada aos laboratórios de da Secretaria de Saúde do Distrito Federal tanto pela questão do elevado custo como

também pela subnotificação de surtos e epidemias causados por *Escherichia coli*, diferentemente do que ocorreu na Alemanha em 2011, em que apresentou mais de 3.500 casos e com 45 casos de óbito relatados (TOBIAS et al, 2015).

Diante de tudo o que foi explanado, se torna clara e evidente a importância de se padronizar uma metodologia para fins de diagnósticos das DECs, uma vez que a *E. coli* possuem uma imensa capacidade de adquirir atributos específicos de virulência, o que lhe permite causar um amplo espectro de patologias.

Além do agravante de no Brasil haver pouquíssimos dados oficiais disponíveis a respeito da prevalência de doenças infecciosas intestinais em crianças causadas por *E. coli* (CASTRO et al, 2015), o que seria se extrema contribuição para se desenvolver estratégias de prevenção eficazes, tido a exemplo dos dados publicados no ano de 2009, pelo Ministério da Saúde do Brasil, que relata a correspondência de 3,1% das mortes em crianças na faixa etária inferior a 5 anos, sendo que a grande parcela destes óbitos ocorreram no Estado de Pernambuco, quando relacionados aos demais Estados Brasileiros (DE MOURA et al, 2012).

6. CONCLUSÃO

A diarreia ainda é tida como a patologia que acomete tanto jovens, adultos e idosos, mas principalmente as crianças. Entretanto, os estudos relatando casos de gastroenterites aguda em adultos são bastante escassos quando comparados com as gastroenterites infantis. O fato é que o diagnóstico tem sido dificultado em todo o mundo, seja nos países desenvolvidos ou em desenvolvimento, uma vez que as cepas, principalmente de *Escherichia coli*, não são rotineiramente investigados nos laboratórios clínicos.

Diante desta problemática este estudo se encontra em andamento, afim de otimizar essa técnica principalmente para fins de diagnóstico, uma vez que na Secretaria de Saúde do Distrito Federal as cepas de *E. coli* enteropatogênicas não são identificadas.

Com a padronização já concluída, serão realizados os testes clínicos, afim de traçar um perfil epidemiológico que possibilite uma avaliação a respeito do impacto que as gastroenterites agudas tem gerados na saúde pública do Distrito Federal.

7. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

AMISANO, G.; FORNASERO, S.; MIGLIARETTI, G.; CARAMELLO, S.; TARASCO, V.; SAVINO, F. Diarrheagenic *Escherichia coli* in acute gastroenteritis in infants in North-West Italy. **New Microbiol**, v. 34, n. 1, p. 45-51, 2011.

BARLETTA, F.; OCHOA, T. J.; METCADO, E. ; RUIZ, J.; ECKER, L.; LOPEZ, G.; MISPIRETA, M.; GIL, A. I. ; LANATA, C. F.; CLEARY, T.G. Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction for Enteropathogenic *Escherichia coli*: A Tool for Investigation of Asymptomatic Versus Symptomatic Infections, 2011.

BERTÃO, A.M.S.; SARIDAKIS, H.O. *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 81-92, jul./dez. 2007

BONKOUNGOU, I.J.O.; HAUKKA, K.; ÖSTERBLAD, M.; HAKANEM, A. J.; TRAORÉ, A.; BARROS, N.; SIITONEN. Bacterial and viral etiology of childhood diarrhea in Ouagadougou, Burkina Faso. **BMC Pediatrics**, 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Cadernos de atenção básica. Acolhimento á demanda espontânea . Queixas mais comuns na Atenção Básica. Vol. 2. Brasília (DF). 2012.

CASTRO, E.D.R.; GERMINI, M.C.B.Y.; MASCARENHAS, J.D.P.; GABBAY, Y.B.; LIMA, I.C.G.; LOBO, P.D.S.; FRADA, V.D.; CONCEIÇÃO, L.M.; MACHADO, R.L.D.; ROSSIT, A.R.B. Enteropathogens detected in a daycare Center, southeastern Brazil: bacteria, virus, and parasite research. . **Rev. Inst. Med. Trop.** Sao Paulo 57(1): 27-32, January-February, 2015.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Manual Das Doenças Transmitidas Por Alimentos *Escherichia Coli* Enterotoxigênica (ETEC). Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Disponível em : < ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/ecoli_enterotoxi.pdf >. Acesso em: 09 de nov, 2015.

DE ANDRADE, J.A.B.; HAAPALAINEM, E.F.; NETO, U.F. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a cause of persistent diarrhea: an experimental model using light microscopy. **Rev Paul Pediatr**, 29(1):60-6, 2011.

DE CARVALHO, T.C.N.; GABBAY, Y.B.; SIQUEIRA, J.A.M.; LINHARES, A.C.; PARENTE, A.T. Conhecimento sobre gastroenterite viral pelos profissionais de saúde de um hospital materno-infantil de referência no Estado do Pará, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, 2014; 5(3):11-18.

DA COSTA, A.R.F.; LIMA, K.V.B.; DE SOUSA, C.O.; LOUREIRO, E.C.B. Desenvolvimento de PCR multiplex para detecção e diferenciação de categorias de *Escherichia coli* diarriogênicas. **Rev Pan-Amaz Saude**, 1(2): 77-84. 2010.

DE MOURA, M. R. S. A .L.; DE MELO, M.J.G.; CALÁBRIA, W.B.; GERMANO, E.G.; MAGGI, R.R.S.; CORREIA, J.B. Frequência de *Escherichia coli* e sua sensibilidade aos antimicrobianos em menores de cinco anos hospitalizados por diarreia aguda. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, Recife, 12 (2): 173-182 abr. / jun., 2012.

FIEDORUK, K.; DANILUK, T.; ROZKIEWICZ, D.; ZAREMBA, M.L.; OLDAK, E.; SCIEPUK, M.; LESZCZNSKA, K. Conventional and molecular methods in the diagnosis of community-acquired diarrhoea in children under 5 years of age from the north-eastern region of Poland. **International. J. of Infectious Diseases** 37: 145-151, 2015.

GEORGIADIS, S.; PILGER, D. A.; PEREIRA, F.; CANTARELLI, V. V. Avaliação molecular de norovírus em pacientes com gastroenterite aguda. **Rev Soc Bras Med Trop** 43(3):277-280, mai-jun, 2010.

JAFARI, A.; ASLANI, M.M.; BOUZARI, S. *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. **IRAN. J. MICROBIOL** .Vol. 4 (3): 102-117, September, 2012 .

KAPPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia Coli*. **Nature reviews Microbiol**. Vol. 2, FEBRUARY, 2004.

LIMA, R. M.; DIAS, J.M. Gastroenterite Aguda. **Rev. Nascer e crescer** do hosp. de crianças maria pia, n.º 2, vol.19, 2010.

MATOS, N.B.; PIERI, F.A.; PENATTI, M.; ORLANDI, P.P. Adherence and virulence genes of Escherichia coli from children diarrhoea in the Brazilian Amazon. **Brazilian J. of Microbiol.** 46 (1): 131-137, 2015.

MEMARIANI, M.; PEERAYER, S.N.; SALEHI, T.Z.; MOSTAFAVI, S.K.S. Occurrence of SHV, TEM and CTX-M β -Lactamase Genes Among Enteropathogenic Escherichia coli Strains Isolated From Children With Diarrhea. **Jundishapur J. Microbiol.** 8 (4). April , 2015.

MENEZES, C.A.; GONÇALVES, D.S.; AMIANTI, J.; FERNANDES, I.;TADDEI, C.R.; KOGA, P.C.M.; TRABULSI, L.R.; MARTINEZ, M,B.; PIAZZA, R.M.F. Capture Immunossay for LT detection Produced by Enterotoxigenic Escherichia coli in Bacterial isolates.. **Brazilian J. Microbiol.** 34 (Supl.1):11-13 2003.

MERCADO, E.H.; OCHOA, T.J.; ECKER, L.; CABELLO, M.; DURAND, D.; BARLETTA, F.; MOLINA, M.; GIL, A.L.; HUICHO, L.; LANATA, C.F.; CLEARY, T.G. Fecal Leukocytes in Children Infected with Diarrheagenic Escherichia coli. **J. CLIN. MICROBIOL.** No. 4, Vol. 49, p. 1376–1381, Apr, 2011.

MITTELSTAEDT, S.; DE CARVALHO,V.M. Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) O157: H7 revisão. **Rev Inst. Ciênc. Saúde.** 24(3): 157-82. jul-set, 2006 .

MORILLO, S.G.; TIMENETSKY, M.C.S.T. Norovirus: an overview. **Rev Assoc Med Bras,** 57(4):453-458, 2011.

NEJMA, B.S.B.; ZAAFRANE, M. H.; HASSINE, F.; LOULIZI, K.S.; SAID, M.B.; AOUNI, M.; MZOOGHI, R. Etiology of Acute Diarrhea in Tunisian Children with Emphasis on Diarrheagenic Escherichia coli: Prevalence and Identification of E. coli Virulence Markers. **Iranian J Publ Health,** No. 7, Vol. 43, p. 947-960, Jul, 2014.

OH, K.H.; KIM.S.B.; PARK.; M.S.; CHO, S.H. Development of a One-Step PCR Assay with Nine Primer Pairs for the Detection of Five Diarrheagenic Escherichia coli Types. **J. Microbiol. Biotechnol.** 24(6), 862–868, 2014.

PAULA, C.M.D.; CASARIN, L.S.; TONDO, E.C. Escherichia coli O157: H7 patógeno alimentar emergente. **Rev Visa em Debate** 2 (04):23-33, 2014.

SANTOS, A .C. M.; ZIDKO, A.C.M., PIGNATARI, A.C.C.; GALES, A.C; SILVA., R.M. A virulência de Escherichia coli patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à

idade e ao sexo do hospedeiro. **O Mundo da Saúde**, 33(4): 392-400, São Paulo, 2009.

SAUCEDO, C.L.S.; CERNA. J.F.; SEPULVEDA, N.V.; THOMPSON, R.; VELAZQUEZ, F.R.; TORRES, J.; TARR.; P.I.; GARCÍA, T.E. Single Multiplex Polymerase Chain Reaction To Detect Diverse Loci Associated with Diarrheagenic Escherichia coli. **Emerging Infectious Diseases**. No. 1, Vol. 9, No. 1, January, 2003.

SILVA, J.A.; DA SILVA, W.D. Escherichia coli enteropatogênica (EPEC), ao contrário da Escherichia coli comensal , adere , sinaliza e lesa enterócitos. **Rev de Patol. Trop**. Vol. 34 (3): 175-196. set.-dez. 2005.

SOLEIMANI, M.; MOROVVATI, A.; HOSSEINI, S.Z.; ZOLFAGHARI, M.R. Design of an improved multiplex PCR method for diagnosis of enterohaemorrhagic E.coli and enteropathogenic E.coli pathotypes. **Gastroenterol Hepatol Bed Bench**, 5(2): 106-111, 2012.

STRONI, G.P.; DHIMOLEA, M.M.; PIPERO. P.S.; KRAJA, D.V.; SALLAVACI, S.; BINO, S.F. A Study on the Epidemiology and Aetiology of Acute Gastroenteritis in Adult Patients Presenting at the Infectious Diseases Hospital in Tirana, Albania. **Balkan Med J**, No. 3, Vol. 31, 2014.

SUMBANA, J.; TAVIANI, E.; MANJATE, A.; PAGLIETTI, B.; SANTONA.; A.; COLOMBO, M.M. Genetic determinants of pathogenicity of Escherichia coli isolated from children with acute diarrhea in Maputo, Mozambique. **J Infect Dev Ctries**, 9(6): 661-664, 2015.

TOBIAS, J.; KASSEM, E.; RUBINSTEIM, U.; BIALIK, A.; VUTUKURU, S.R.; NAVARO, A.; ROKNEY, A.; VALINSKY, L.; EPHROS, M.; COHEN, D.; MUHSEN, K. Involvement of main diarrheagenic Escherichia coli, with emphasis on enteroaggregative E. coli, in severe non-epidemic pediatric diarrhea in a high-income country. **BMC Infectious Diseases** , 2015.

TOBIAS, J.; VUTUKURU, S.R. Simple and rapid multiplex PCR for identification of the main human diarrheagenic Escherichia coli. **Microbiol. Research**, 167, 564–570. 2012.

TYLER, J.S.; BEERI, K.; REYNOLD, J.L.; ALTERI, C.J.; SKINNER, K.G.; FRIEDMAN, J.H.; EATON, K.A.; FRIEDMAN, D. Prophage induction is enhanced and required for renal disease and lethality in an EHEC mouse model. **PLoS pathogens**, n. 3 v. 9, 3, 2013.

UNICEF/WHO, Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done, 2009.

VARELA, G.; BATTYÁNY, L.; BIANCO, M.N.; PÉREZ, W.; PARDO, L.; ALGORTA, G.; ROBINO, L.; SUÁREZ, NAVARRO, A.; PÍREZ, M.C.; SCHELOTTO, F. Enteropathogens Associated with Acute Diarrhea in Children from Households with High Socioeconomic Level in Uruguay. **International J. of Microbiol**, 2015.

VARELA, G.; JASINSKI, C.; GADEA, P.; TANZI, M.N.; MOTA, M.I.; ARENAS, C.; PARDO, L.; GONZÁLEZ, S.; GONZÁLEZ, SIROK, A.; SCHELOTTO, F. Escherichia coli enteropatógeno clásico (EPEC) asociado a casos de diarrea en niños usuarios del Hospital Pereira Rossell. Aspectos clínicos y características de las cepas involucradas. **Rev Med Urug.** Nº 3, Vol.23 (153-163), 2007.

VILCHEZ, S.; REYES, D.; PANIAGUA, M.; BUCARDO, F.; MOLLBY, R.; WEINTRAUB, A. Prevalence of diarrhoeagenic Escherichia coli in children from León, Nicaragua. **J. of Medical Microbiol**, 58, 630–637, 2009.

WANG, J.; XU, Z.; NIU, P.; ZHANG, C.; ZHANG, J.; GUAN, L.; KAN, BIÃO.; DUAN, Z.; MA, X. A Two-Tube Multiplex Reverse Transcription PCR Assay for Simultaneous Detection of Viral and Bacterial Pathogens of Infectious Diarrhea. **Bio.Med Research International**, 2014.

WGO. WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION. Acute diarrheal. Mar, 2008.

8. ANEXO

8.1 Anexo I



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise dos principais microrganismos causadores de gastroenterites no Distrito Federal

Pesquisador: Thaís Alves da Costa Lamounier

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 31843414.6.0000.0030

Instituição Proponente: Faculdade de Ceilândia - FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Patrocinador Principal: LABORATORIO SABIN DE ANALISES CLINICAS LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 788.271

Data da Relatoria: 10/09/2014

Apresentação do Projeto:

Parecer Consubstanciado

PROGRAMA DE GRADUAÇÃO – FARMÁCIA – CAMPUS CEILÂNDIA (FCE)

Análise dos principais microrganismos causadores de gastroenterites no Distrito Federal



Continuação do Parecer: 788.271

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram atendidas: O TCLE foi adequado e o TALE apresentado.

O projeto se encontra em conformidade com a Resolução 466/12 e suas complementares.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em acordo com a Resolução 466/12 CNS, itens X.1.- 3.b. e XI.2.d, os pesquisadores responsáveis deverão apresentar relatórios parcial semestral e final do projeto de pesquisa, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa.

BRASILIA, 11 de Setembro de 2014

**Assinado por:
Marie Togashi
(Coordenador)**