

**DETECÇÃO GENÉTICA E PREVALÊNCIA DE LINHAGENS
ENTEROPATOGÊNICAS DE *ESCHERICHIA COLI* EM AMOSTRAS
FECAIS DIARRÉICAS DE CRIANÇAS EM JUIZ DE FORA**

***GENETIC DETECTION AND PREVALENCE OF
ENTEROPATHOGENIC ESCHERICHIA COLI STRAINS IN
DIARRHEIC FECAL SAMPLES FROM INFANTS IN JUIZ DE FORA***

Werley de Almeida Januzzi¹, Patrícia Guedes Garcia²,

Vânia Lúcia da Silva³, Cláudio Galuppo Diniz⁴

¹ Graduando do curso de Enfermagem/UFJF - werleyufjf@yahoo.com.br

² Mestranda, Pós-Graduação em Saúde/UFJF - pgglab@hotmail.com

³ Co-orientadora, Professora Adjunta/UFJF - vanocabr@gmail.com

⁴ Orientador, Professor Adjunto/UFJF – claudio.diniz@ufjf.edu.br.

Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas Campus Universitário, Universidade Federal de Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brasil.

Resumo

Doenças do trato gastrointestinal têm uma distribuição global, afetando principalmente crianças. Nos países em desenvolvimento, figuram como importante causa de morbi/mortalidade, considerando-se a etiologia bacteriana. Enterobactérias, como as *Escherichia coli* patogênicas, são reconhecidas como importantes agentes etiológicos. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar patotipos de *E. coli* de amostras fecais de crianças apresentando diarreia. Coprocultura foi feita a partir de 52 amostras e *E. coli* foi presuntivamente identificada por técnicas bioquímicas. A identidade bacteriana foi confirmada por amplificação específica de DNA codificador para o rRNA16S, por PCR. Linhagens patogênicas foram caracterizadas por PCR-multiplex, dirigido a genes de virulência. Das 52 amostras, 109 *E. coli* foram presuntivamente identificadas, e 108 foram confirmadas por PCR específico. Patotipos foram detectados em 36,1% das amostras, assim distribuídos: *E. coli* enteroagregativa (EAEC): 17.30%, *E. coli* enteropatogênica (EPEC): 11.53%, *E. coli* enterohemorrágica (EHEC): 5.76%, *E. coli* enterotoxigênica (ETEC): 1.92%. *E. coli* enteroinvasora (EIEC) não foi detectada. De acordo com os resultados, *E. coli* patogênica pode ser considerada prevalente na população amostrada, reforçando sua importância como etiologia de doença gastrointestinal em crianças, na nossa região. A PCR-multiplex mostrou-se uma técnica rápida e sensível que permitiu a detecção de *E. coli* patogênica, uma vez que os métodos sorológicos convencionais não estão sendo considerados tão eficientes.

Palavras-chave: *Escherichia coli* patogênica, doenças do trato gastrointestinal, PCR

Abstract

The gastrointestinal diseases have a global distribution, affecting mainly young children. Especially in developing countries are associated with high rates of morbi/mortality, when bacterial etiology is considered. Enterobacteria such as pathogenic *Escherichia coli* are recognized as important etiology. This study was focused on isolation and characterization of *E. coli* pathotypes from fecal samples of infants suffering from diarrhea. Coproculture was performed from 52 feces samples and *E. coli* was presumptively identified by biochemical technique. Bacterial identity was confirmed by specific amplification of DNA encoding the bacterial 16S RNA by PCR. Pathogenic strains were characterized by multiplex-PCR targeting several virulence genes. Of the 52 samples, 109 *E. coli* were biochemically identified and 108 were confirmed by specific PCR. *E. coli* pathotypes were detected in 36.51% of the samples and were distributed as follows: Enteroaggregative *E. coli* (EAEC): 17.30%, Enteropathogenic *E. coli* (EPEC): 11.53%, Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC): 5.76%, Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC): 1.92%. Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) was not detected. According to the results, pathogenic *E. coli* may be considered prevalent among the evaluated population, which enforces their importance in the etiology of children gastrointestinal illness in our region. The multiplex-PCR showed to be a rapid and sensitive technique that allowed the detection of enteropathogenic *E. coli* as the conventional serologic methods are being considered not so efficient.

Keywords: pathogenic *Escherichia coli*, gastrointestinal diseases, PCR

1. INTRODUÇÃO

Manifestações clínicas no trato gastrointestinal de etiologia bacteriana, como doenças diarreicas e doenças inflamatórias agudas, permanecem um problema para milhões de seres humanos no mundo inteiro. Em países em desenvolvimento, essas doenças são uma das duas principais causas de morte infantil e contribuem para a severidade de deficiências relacionadas à desnutrição (PATHELA *et al.*, 2005). Apesar dos avanços da microbiologia clínica, o diagnóstico e a epidemiologia dessas doenças ainda é um grande problema e permanece como uma importante meta para o desenvolvimento de políticas de saúde pública (PATHELA *et al.*, 2005; SHELTON *et al.*, 2006).

As enterobactérias são microrganismos ubíquos, encontrados na água, no solo e na vegetação, e compõem a microbiota anfibiótica do trato gastrointestinal de seres humanos e outros animais e, por esta razão, estão associados a diversas doenças humanas neste sítio (Rosebury, 1962; Shelton *et al.*, 2006).

O gênero *Escherichia* compreende cinco espécies, das quais a *E. coli* é a mais comum e clinicamente a mais importante. Este microrganismo está associado a diversas doenças e, entre elas, manifestações clínicas no trato gastrointestinal (PRÈRE & FAYET, 2005). A habilidade destes microrganismos na produção de doenças está associada a sua diversidade antigênica. Muitos antígenos foram descritos e são usados para classificar as linhagens para fins epidemiológicos (Shelton *et al.*, 2006).

Entre os fatores de virulência das *E. coli* destacam-se, principalmente, elementos estruturais (LPS, cápsula), aqueles associados à adesão (adesinas) e

aqueles relacionados à invasão (exotoxinas). Entre as exotoxinas produzidas por estes microrganismos, incluem-se a toxina Shiga (STX-I e STX-II), toxinas termoestáveis (STA e STB) e toxinas termolábeis (LT-I e LT-II). Além destas, citam-se as hemolisinas (HlyA), importantes para captação de ferro necessário ao crescimento *in vivo* destes microrganismos (Vidal et al., 2005).

Um grande número de *E. coli* está presente no trato gastrointestinal humano. Estas bactérias são comumente causadoras de sepse, meningites neonatais, infecções de trato urinário e gastroenterites. A maioria das infecções é endógena, exceto meningite neonatal e gastroenterite (PRÈRE & FAYET, 2005). As linhagens associadas às gastroenterites estão subdivididas em cinco grupos patogênicos principais: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Song et al., 2005; Vidal et al., 2005; Shelton et al., 2006).

Apesar das diversas técnicas microbiológicas disponíveis, aproximadamente metade dos casos de diarreia permanecem sem definição da etiologia, o que dificulta a implantação de políticas e estratégias de mapeamento e controle das áreas endêmicas de ocorrência destes patógenos. Assim, o objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar linhagens patogênicas de *Escherichia coli* de amostras fecais de crianças apresentando diarreia, em Juiz de Fora, MG.

2. PACIENTES E MÉTODOS

2.1. Amostras fecais: Foram consideradas para o estudo amostras fecais provenientes de crianças apresentando manifestações clínicas no trato

gastrointestinal, de 0 a 5 anos de idade, atendidas em Juiz de Fora, MG, recebidas no período de março de 2007 a junho de 2008. As fezes, *in natura*, foram coletadas em potes descartáveis fornecidos pelos pesquisadores, no Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana do ICB/UFJF, juntamente com Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado pelos responsáveis, ao envio das amostras. O estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da UFJF, sob o parecer n° 281/2006.

2.2. Isolamento e identificação das linhagens bacterianas: Coprocultura seletiva foi realizada após diluição seriada do material fecal em solução salina (NaCl 0,85%), usando-se o meio de cultura EMB - Eosina Azul de Metileno (Biobrás Bioquímica do Brasil, MG, Brasil). Até três colônias sugestivas de morfotipos diferentes foram submetidas à identificação por métodos bioquímico-fisiológicos, que incluíram fermentação de glicose, lactose, sacarose, produção de indol, urease, teste de utilização do citrato, habilidade de descarboxilação de lisina e teste de motilidade (OPLUSTIL *et al*, 2004). A identificação bacteriana foi confirmada pela amplificação específica de fragmento de DNA codificador para o RNA 16S bacteriano. A extração de DNA foi realizada para todos os isolados como descrito previamente por Wani e colaboradores (2004). Os extratos de DNA foram usados como molde para reações em cadeia da polimerase (PCR), com os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: E.coli1- 5' GCTTGACACTGAACATTGAG 3' e E.coli2 - 5' GCACTTATCTCTTCCGCATT 3', de acordo com o protocolo de Chotár e colaboradores (2006). Duas linhagens de referência foram utilizadas como controle

de qualidade nas reações de PCR (*E. coli* ATCC 35218 e *E. coli* ATCC 11229). Os produtos das reações de PCR (amplicons) foram separados em gel de agarose (1,5%) após eletroforese em tampão Tris-Borato-EDTA 0,5%. A documentação e análise dos resultados foi feita após tratamento dos géis com brometo de etídio e visualização em transluminador de luz ultravioleta.

2.3. Caracterização genética das linhagens patogênicas de E. coli: A caracterização das linhagens patogênicas de *E. coli* foi realizada pela técnica de PCR Multiplex (ARANDA *et al.*, 2004). As reações foram realizadas em duplicata, em termociclador automatizado (Techne® TC-412 Thermal Cycler). A identidade e a concentração dos iniciadores, a região alvo e o fragmento esperado dos amplicons estão sumarizados na Tabela 1. Em todos os experimentos, linhagens de *E. coli* patogênicas (EPEC, ETEC, EIEC, EHEC e EAEC) foram usadas como controle positivo, *E. coli* ATCC 11229 foi usada como controle negativo e água destilada foi utilizada como controle interno negativo, em cada bateria de reações. Os produtos das reações de PCR foram separados em gel de agarose (1,5%) após eletroforese em tampão Tris-Borato-EDTA 0,5%. A documentação e análise dos resultados foi feita após tratamento dos géis com brometo de etídio e visualização em transluminador de luz ultra-violeta.

Tabela 1. Iniciadores utilizados neste estudo

Iniciador	Sequência (5' - 3')	Alvo	Fragmento esperado	Concentração (pmol)
eae1	CTGAACGGCGATTACGCGAA	<i>eae</i>	917	5
eae2	CCAGACGATACGATCCAG			
BFP1	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	<i>bfpA</i>	326	5
BFP2	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA			
EAEC1	CTGGCGAAAGACTGTATCAT	CVD432	630	5
EAEC2	CAATGTATAGAAATCCGCTGTT			
LTf	GGCGACAGATTATACCGTGC	LT gene	450	5
LTr	CGGTCTCTATATATCCCTGTT			
STf	ATTTTTMTTCTGTATTRTCTT	ST gene	190	6.47
STr	CACCCGGTACARGCAGGATT			
lpaH1	GTTCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC	<i>lpaH</i>	600	10
lpaH2	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC			
Stx1f	ATAAATCGCCATTGTTGACTAC	<i>stx₁</i>	180	3.88
Stx1r	AGAACGCCCACTGAGATCATC			
Stx2f	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	<i>stx₂</i>	225	2.5
Stx2r	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG			

3. RESULTADOS

Das 52 amostras fecais analisadas, 109 linhagens de *Escherichia coli* foram identificadas presuntivamente a partir de testes bioquímico-fisiológicos convencionais. A identificação genética foi confirmada para 108 linhagens, pela amplificação específica de fragmento de DNA codificador para o RNAr 16S bacteriano, indicando uma correlação de 99,08% entre as duas metodologias. Foi observada a presença de um amplicon de 660 pares de base para as amostras de *E. coli* (Figura 1).

A técnica de PCR Multiplex, utilizando diferentes iniciadores dirigidos a genes de virulência específicos, permitiu detectar linhagens de *E. coli* patogênicas em 36,1% das amostras fecais.

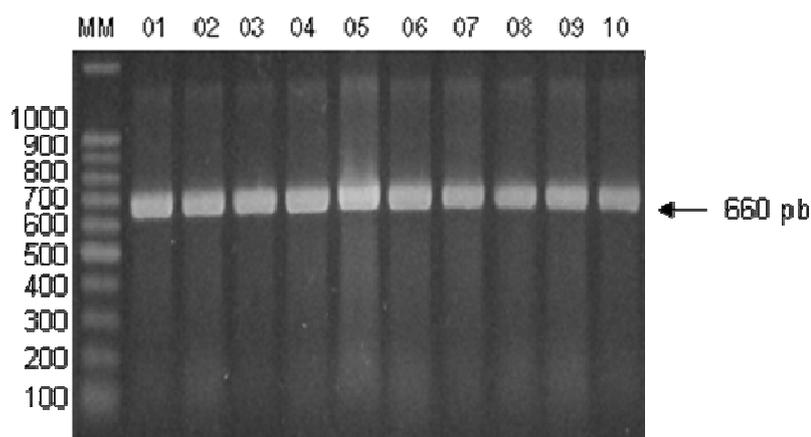


Figura 1. Eletroforegrama representativo da identificação genética de linhagens de *Escherichia coli* pela amplificação de região específica do DNA codificador para o RNAr 16S. MM – 100bp DNA Ladder; Canaletas 01 a 10 - amostras identificadas como *E. coli*. Fragmento esperado: 660 pares de base (pb).

Considerando-se os diferentes patótipos de *E. coli*, verificou-se a ocorrência de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) em 17.30% das amostras positivas para linhagens patogênicas, *E. coli* enteropatogênica (EPEC) em 11.53%, *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) em 5.76% e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) em 1.92%. Linhagens patogênicas designadas como *E. coli* enteroinvasora (EIEC) não foram detectadas neste estudo, considerando-se os espécimes avaliados (Figura 2).

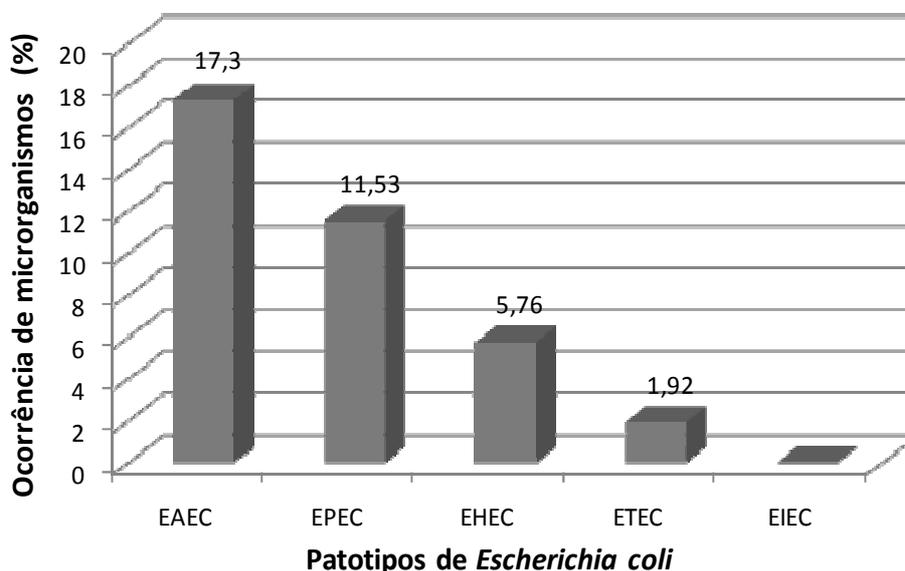


Figura 2. Distribuição de linhagens bacterianas patogênicas de *Escherichia coli* nas amostras fecais positivas, isoladas de crianças de 0 a 5 anos em Juiz de Fora, MG. EAEC – *E. coli* enteroagregativa, EPEC – *E. coli* enteropatogênica, EHEC – *E. coli* enterohemorrágica, ETEC – *E. coli* enterotoxigênica, EIEC – *E. coli* enteroinvasiva.

4. DISCUSSÃO

Considerando-se a espécie *E. coli*, que compõe a microbiota anfibiônica de seres humanos e outros animais, sua importância clínica destaca-se não apenas pelas doenças oportunistas, mas pela existência de linhagens associadas a doenças entéricas, que são divididas em cinco grupos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Prère & Fayet, 2005; SONG et al., 2005, VIDAL et al., 2005; SHELTON et al., 2006). De acordo com os nossos resultados, *E. coli* patogênica pode ser considerada

prevalente na população avaliada (36,1%), o que representa uma grande importância na etiologia das infecções gastrointestinais na infância, em nossa região.

Linhagens EAEC, as mais prevalentes na população amostrada, têm sido identificadas como causadoras de diarreia aquosa com desidratação de recém-nascidos em países em desenvolvimento. A persistência destas bactérias está associada à diarreia crônica e atraso no desenvolvimento infantil (VIDAL et al., 2005). O segundo tipo mais prevalente na população avaliada (EPEC) é considerado importante na doença diarreica em recém-nascidos, sobretudo em países em desenvolvimento. A doença não é comum em crianças mais velhas e em adultos, provavelmente devido a sua imunidade protetora, caracterizando-se pela adesão bacteriana às células epiteliais do intestino delgado com subsequente destruição das microvilosidades (VIDAL et al., 2005).

Alguns autores consideram linhagens EHEC como patógenos emergentes, com distribuição global, associados a surtos de disseminação alimentar. Estão relacionadas ao sub-grupo das E.coli produtoras de toxina Shiga (NGUYEN et al., 2005). Nosso estudo revelou a ocorrência destes microrganismos em 5,76% das amostras positivas. A doença associada a estes microrganismos varia de uma diarreia leve a uma colite hemorrágica com dor abdominal severa e diarreia sanguinolenta, com pouca ou nenhuma febre, além de doença disseminada, que inclui a síndrome hemolítica urêmica e complicações em outros tecidos (NGUYEN et al., 2005; SHELTON et al., 2006).

Linhagens ETEC são consideradas comuns em países em desenvolvimento e associadas a infecções em crianças pequenas ou em pessoas que viajam para estas áreas (VIDAL et al., 2005). Entretanto, no nosso trabalho estes foram os tipos patogênicos menos freqüentes na população amostrada, juntamente com EHEC, o que pode estar relacionado com os bons indicadores de infra-estrutura sanitária relacionados à população estudada (dados não apresentados). Estes microrganismos são resistentes ao pH ácido do estômago, o que explica sua facilidade de disseminação através do consumo de alimentos e água contaminados (NGUYEN et al., 2005; CHOTAR et al., 2006). Segundo dados da literatura, EIEC é menos comum. Neste trabalho, este patotipo não foi detectado. Estas linhagens apresentam similaridades à Shigella devido a propriedades fenotípicas e patogênicas (VIDAL et al., 2005).

Dada à importância de estudos científicos de investigação epidemiológica de prevalência e ocorrência de surtos, epidemias e mesmo de mapeamento de reservatórios microbianos que possam atuar como fonte potencial para disseminação de novos casos em populações susceptíveis, o uso de métodos moleculares está, muitas vezes, associado à métodos convencionais de isolamento e identificação bacteriano baseados em cultura para confirmação e validação dos resultados (CHIU, SU & CHU, 2004; SHELTON et al., 2006). Assim, observa-se a necessidade de estudos prospectivos que possam contribuir melhor com a epidemiologia destes microrganismos, considerando-se, além das dificuldades de diagnóstico, o tratamento empírico comumente sugerido no nosso meio. Um aspecto importante da biologia dos microrganismos, principalmente das bactérias que

habitam e coexistem no trato gastrointestinal, como os anaeróbios facultativos da família Enterobacteriaceae; e não diretamente ligados à produção de doenças de natureza infecciosa, mas ligado à sua persistência, é a crescente resistência a drogas, que é um fenômeno crescente em nosso meio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANDA, K.R.S.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, United States, v. 42, p. 5849-5853, 2004.
- CHIU, C.H.; SU, L.H.; CHU, C. *Salmonella enterica* Serotype Choleraesuis: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Disease, and Treatment. **Clinical Microbiology Reviews**, United States, v.17, p.311-322, 2004.
- CHOTÁR, M.; VIDOVÁ, B.; GODÁNY, A. Development of specific and rapid detection of bacterial pathogens in dairy products by PCR. **Folia Microbiology**, Praha, v. 51, p. 639-46, 2006.
- GILMOUR, M.W.; TRACZ, D.M.; ANDRYSIAK, A.K.; CLARK, C.G.; TYSON, S.; SEVERINI, A.; LAI-KING, N. Use of the *espZ* gene encoded in the locus of enterocyte effacement for molecular typing of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, United States, v. 44, p.449-458, 2006.
- NGUYEN, V.T.; LE, V.P.; LE, H.C.; NGUYEN, G.K.; WEINTRAUB, A. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, United States, v. 43, p.755-760, 2005.
- OPLUSTIL, C.P.; ZOCCOLI, Z.M.; TOBOUTI, N.R. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2004.
- PATHELA, P.; HASAN, K.Z.; ROY, E.; ALAM, K.; HUQ, F.; SIDDIQUE, A.K.; SACK, R.B. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* – Associated Diarrhea in Children 0–2 Years of Age in Rural Bangladesh. **The Journal of Infectious Disease**, United States, v.191, p.1245-1252, 2005.

- PRÈRE, M.F.; FAYET, O. A new genetic test for the rapid identification of shiga-toxines producing (STEC), enteropathogenic (EPEC) *E. coli* isolates from children. **Pathologie Biologie**, Paris, v.53, p.466–469, 2005.
- ROSEBURY, T. **Microorganisms Indigenous to Man**. York: The Maple Press Company, 1962. p.435.
- SHELTON, D.R.; KARNS, J.S.; HIGGINS, J.A.; VAN KESSEL, J.A.S.; PERDUE, M.L.; BELT, K.T.; RUSSELL-ANELLI, J.; DEBROY, C. Impact of microbial diversity on rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in surface waters. **FEMS Microbiology Letters**, England, v.261, p. 95–101, 2006.
- SONG, T.; TOMA, C.; NAKASONE, N.; IWANAGA, M. Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method. **FEMS Microbiology Letters**, England, v.243, p.259–263, 2005.
- VIDAL, M.; KRUGER, E.; DURÁN, C.; LAGOS, R.; LEVINE, M.; PRADO, V.; TORO, C.; VIDAL, R. Single Multiplex PCR Assay To Identify Simultaneously the Six Categories of Diarrheagenic *Escherichia coli* Associated with Enteric Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, United States, v. 43, p.5362–5365, 2005.
- WANI, S.A.; SAMANTA, L.; BHAT, M.A.; NISHIKAWA, Y. Investigation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in avian species in India. **Letters in Applied Microbiology**, England, v. 39, p. 389-394, 2004.