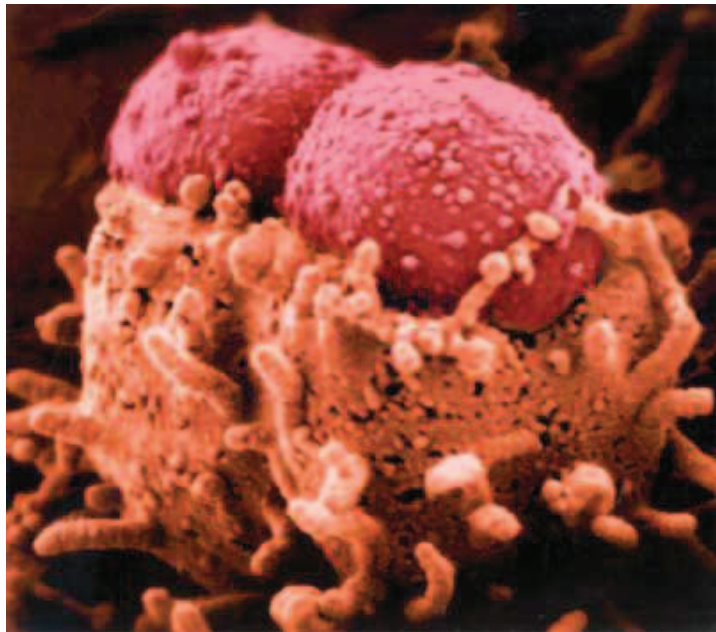


Roger Teixeira Franco

**CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE *Escherichia coli eae* POSITIVAS  
ISOLADAS DE CRIANÇAS COM DIARREIA AGUDA E SEM DIARREIA EM  
BELO HORIZONTE: TIPAGEM DE INTIMINA E PESQUISA DE *hlyA*, *iha* E *toxB***



Laboratório de Diagnóstico Genético de Doenças Infecciosas  
Departamento de Propedêutica Complementar/Faculdade de Medicina

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2012

Roger Teixeira Franco

CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE *Escherichia coli eae* POSITIVAS  
ISOLADAS DE CRIANÇAS COM DIARREIA AGUDA E SEM DIARREIA EM  
BELO HORIZONTE: TIPAGEM DE INTIMINA E PESQUISA DE *hlyA*, *iha* E *toxB*

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Patologia da Faculdade de Medicina  
da Universidade Federal de Minas  
Gerais, como requisito parcial para  
obtenção do grau de Mestre em  
Patologia, Área de Concentração em  
Propedêutica.

Orientador: Edilberto Nogueira Mendes

Laboratório de Diagnóstico Genético de Doenças Infecciosas  
Departamento de Propedêutica Complementar/Faculdade de Medicina

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2012

## **LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO**

Laboratório de Diagnóstico Genético de Doenças Infecciosas

Departamento de Propedêutica Complementar

Faculdade de Medicina

Universidade Federal de Minas Gerais

## **COLABORAÇÃO**

Professora Paula Prazeres Magalhães

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Professor Francisco José Penna

Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina

Universidade Federal de Minas Gerais

## **APOIO FINANCEIRO**

FAPEMIG

CNPQ

CAPES

PRPq/UFMG

“Nos campos da observação, o acaso favorece apenas as mentes preparadas”

Louis Pasteur

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Edilberto Nogueira Mendes, espelho profissional, pelo carinho e cuidado paternal, pelos ensinamentos, incentivo e amizade ao longo de todos os anos de convívio. Sem você importantes realizações da minha vida não teriam acontecido. Palavras não são capazes de expressar toda a minha gratidão. Muito obrigado por fazer parte da minha vida!

À Profa. Paula Prazeres Magalhães, pelos ensinamentos e ajuda durante todos os anos de convívio. Tenho por você grande admiração e respeito. Muito obrigado.

Aos meus pais Laura e Carlos, pelo amor incondicional e exemplo de vida, e aos meus irmãos Mateus e Laysa, pela amizade e incentivo. Amo vocês!

Ao Flávio, meu maior incentivador, pelo amor, companheirismo e paciência. Com você ao meu lado tudo se torna mais fácil!

Aos amigos do Laboratório de Diagnóstico Genético de Doenças Infecciosas (LDGDI) Lizandra, Caroline, Lidiane e Juliana pelo convívio harmonioso e prazeroso, pela troca de experiências, por dividir as alegrias e por toda a ajuda. A conclusão deste trabalho só foi possível porque trabalhamos juntos.

À Iris, pela amizade, e a todas as pessoas que passaram pelo LDGDI e que, de alguma forma, contribuíram para minha formação e para a execução deste projeto. Minha gratidão!

À Cecília e ao Matheus, pelos quais tenho carinho especial, pela amizade e importante contribuição na realização dos experimentos desta investigação. Muito obrigado!

À Marília e Valéria, colegas de trabalho, e aos professores do Departamento de Propedêutica Complementar pelo carinho e convívio harmonioso.

Ao Prof. Wagner Tafuri, coordenador do Programa de Pós-graduação em Patologia, e aos professores dos programas de pós-graduação da Faculdade de Medicina, pelo conhecimento transmitido.

Aos secretários do Centro de Pós-graduação por toda ajuda e esclarecimentos prestados.

## SUMÁRIO

|                       |  |      |
|-----------------------|--|------|
| LISTA DE FIGURAS      |  | xi   |
| LISTA DE QUADROS      |  | xii  |
| LISTA DE TABELAS      |  | xiii |
| LISTA DE ABREVIATURAS |  | xvii |
| RESUMO                |  | xix  |
| ABSTRACT              |  | xxi  |
| 1                     | INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA                         | 1    |
| 2                     | REVISÃO DA LITERATURA                              | 5    |
| 2.1                   | Considerações gerais                               | 6    |
| 2.2                   | <i>Escherichia coli</i>                            | 8    |
| 2.3                   | <i>Escherichia coli</i> diarreiogênica             | 9    |
| 2.4                   | <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC)    | 10   |
| 2.5                   | <i>Escherichia coli</i> enteremorrágica (EHEC)     | 13   |
| 2.6                   | Lesão A/E ( <i>attaching and effacing</i> )        | 15   |
| 2.7                   | Intimina   | 17   |
| 2.8                   | <i>hlyA</i> - Gene que codifica a enteremolisina A | 20   |
| 2.9                   | <i>iha</i> - Gene que codifica a adesina Iha       | 22   |
| 2.10                  | <i>toxB</i> - Gene que codifica ToxB               | 23   |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 3       | OBJETIVOS  | 24 |
| 3.1     | Objetivo geral   | 25 |
| 3.2     | Objetivos específicos  | 25 |
| 4       | METODOLOGIA  | 26 |
| 4.1     | Pacientes  | 28 |
| 4.2     | Identificação de <i>attaching and effacing Escherichia coli</i><br>(AEEC)  | 29 |
| 4.3     | Pesquisa dos tipos genéticos de intimina   | 33 |
| 4.4     | Diferenciação dos tipos alfa-1 e alfa-2 de intimina por PCR-<br>REA (PCR- análise com endonuclease de restrição) | 36 |
| 4.5     | Pesquisa dos genes <i>hlyA</i> , <i>iha</i> e <i>toxB</i>  | 39 |
| 4.6     | Análise estatística  | 43 |
| 5       | RESULTADOS   | 44 |
| 5.1     | Por Amostra  | 45 |
| 5.1.1   | Distribuição dos tipos genéticos de intimina   | 45 |
| 5.1.2   | Distribuição de <i>hlyA</i> , <i>iha</i> e <i>toxB</i>   | 47 |
| 5.2     | Por paciente   | 47 |
| 5.2.1   | Dados relativos a todos os patotipos   | 47 |
| 5.2.1.1 | Distribuição dos tipos de intimina   | 49 |
| 5.2.1.2 | Associação entre tipos de intimina e presença de diarreia  | 50 |



|         |  |    |
|---------|--|----|
| 5.2.1.3 | Distribuição dos tipos de intimina de acordo com o sexo do paciente                          | 50 |
| 5.2.1.4 | Distribuição sazonal dos tipos de intima   | 51 |
| 5.2.1.5 | Associação entre tipos de intimina e faixa etária do paciente                                | 52 |
| 5.2.1.6 | Distribuição dos tipos de intimina ao longo do período de estudo                             | 52 |
| 5.2.2   | Dados relativos a aEPEC  | 55 |
| 5.2.2.1 | Distribuição dos tipos de intimina   | 55 |
| 5.2.2.2 | Associação entre presença de diarreia e tipos de intimina identificados em aEPEC             | 57 |
| 5.2.2.3 | Distribuição, de acordo com o sexo do paciente, dos tipos de intimina identificados em aEPEC | 58 |
| 5.2.2.4 | Distribuição sazonal dos tipos de intima identificados em amostras de aEPEC                  | 58 |
| 5.2.2.5 | Associação entre faixa etária do paciente e tipos de intimina de amostras de aEPEC           | 60 |
| 5.2.2.6 | Distribuição dos tipos de intimina em aEPEC ao longo do período de estudo                    | 61 |
| 5.2.2   | Distribuição de <i>hlyA</i> , <i>iha</i> e <i>toxB</i>                                       | 64 |
| 5.2.2.1 | Relação entre <i>hlyA</i> , <i>iha</i> e <i>toxB</i> e tipo de AEEC                          | 64 |

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 5.2.2.2 | Associação entre presença de diarreia e <i>hlyA</i> , <i>iha</i> e <i>toxB</i>                                    | 65  |
| 5.2.2.3 | Distribuição, de acordo com o sexo do paciente, de <i>hlyA</i> , <i>iha</i> e <i>toxB</i>                         | 65  |
| 5.2.2.4 | Distribuição sazonal do isolamento de amostras de AEEC carreando <i>hlyA</i> , <i>iha</i> e <i>toxB</i> positivas | 66  |
| 5.2.2.5 | Associação entre <i>hlyA</i> , <i>iha</i> e <i>toxB</i> e faixa etária do paciente                                | 67  |
| 5.2.2.6 | Distribuição de <i>hlyA</i> , <i>iha</i> e <i>toxB</i> no período do estudo                                       | 68  |
| 6       | DISCUSSÃO   | 70  |
| 6.1     | Distribuição dos tipos genéticos de intimina  | 71  |
| 6.2     | Distribuição dos genes <i>hlyA</i> , <i>iha</i> e <i>toxB</i>   | 80  |
| 7       | CONCLUSÕES  | 86  |
| 8       | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS  | 89  |
|         | ANEXOS  | 102 |
|         | ANEXO 1   | 103 |
|         | Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do Hospital Infantil João Paulo II                           | 104 |
|         | ANEXO 2   | 105 |
|         | Termo de Consentimento para Participação na Pesquisa  | 106 |
|         | ANEXO 3   | 108 |
|         | Ficha Clínica   | 109 |

## LISTA DE FIGURAS

|          |  |    |
|----------|--|----|
| FIGURA 1 | Distribuição, por faixa etária, da população estudada. | 30 |
|----------|--|----|

## LISTA DE QUADROS

|          |   |    |
|----------|---|----|
| QUADRO 1 | Distribuição anual e parâmetros demográfico, clínico e epidemiológico relativos à população estudada.   | 29 |
| QUADRO 2 | <i>Primers</i> e condições das reações para pesquisa de marcadores genéticos de EPEC e EHEC e tamanho esperado dos <i>amplicons</i> .                         | 32 |
| QUADRO 3 | <i>Primers</i> e condições da reação utilizados para pesquisa de tipos genéticos de intimina e tamanho esperado dos <i>amplicons</i> .                        | 34 |
| QUADRO 4 | <i>Primers</i> e condições da PCR empregados para genotipagem da intimina alfa por PCR-REA e e tamanho esperado dos <i>amplicons</i> .                        | 37 |
| QUADRO 5 | Perfis de restrição dos <i>amplicons</i> do gene <i>eae</i> gerados pelo tratamento com as endonucleases de restrição <i>AluI</i> e <i>RsaI</i> .             | 40 |
| QUADRO 6 | <i>Primers</i> e condições das reações para pesquisa dos genes de virulência <i>hlyA</i> , <i>iha</i> e <i>toxB</i> e tamanho esperado dos <i>amplicons</i> . | 42 |

## LISTA DE TABELAS

|          |   |    |
|----------|---|----|
| TABELA 1 | Distribuição, por amostra, dos tipos de intimina identificados em AEEC isolada de crianças com diarreia aguda e sem diarreia, entre 2004 e 2007, em Belo Horizonte.   | 46 |
| TABELA 2 | Distribuição, por amostra, dos genes <i>hlyA</i> , <i>iha</i> e <i>toxB</i> identificados em AEEC isolada de crianças com diarreia aguda e sem diarreia, entre 2004 e 2007, em Belo Horizonte.                      | 48 |
| TABELA 3 | Distribuição dos tipos de intimina em amostras de AEEC isoladas de 108 pacientes com diarreia aguda e sem diarreia, mono infectados por patótipos de DEC atendidos, no período de 2004 a 2007, em Belo Horizonte.   | 49 |
| TABELA 4 | Associação entre presença de diarreia e tipos genéticos de intimina identificados em amostras de AEEC isoladas de 86 crianças atendidas entre 2004 e 2007, em Belo Horizonte.                                       | 51 |
| TABELA 5 | Associação entre sexo e época de atendimento do paciente e tipos genéticos de intimina detectados em amostras de AEEC isoladas de 86 crianças com diarreia aguda e sem diarreia, em Belo Horizonte, de 2004 a 2007. | 53 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| TABELA 6  | Associação entre faixa etária do paciente e tipos genéticos de intimina identificados em amostras de AEEC isoladas de 86 crianças com diarreia aguda e sem diarreia, em Belo Horizonte, entre 2004 e 2007.      | 54 |
| TABELA 7  | Distribuição, durante o período de estudo, dos tipos genéticos de intimina identificados em amostras de AEEC isoladas de 86 crianças com diarreia aguda e sem diarreia, em Belo Horizonte, de 2004 a 2007.      | 56 |
| TABELA 8  | Distribuição dos tipos de intimina em amostras de aEPEC isoladas de 84 pacientes com diarreia aguda e sem diarreia, monoinfectados pelo microrganismo, atendidos entre 2004 e 2007, em Belo Horizonte.          | 57 |
| TABELA 9  | Associação entre presença de diarreia e tipos genéticos de intimina identificados em amostras de aEPEC isoladas de 68 pacientes com diarreia aguda e sem diarreia atendidas, em Belo Horizonte, de 2004 a 2007. | 59 |
| TABELA 10 | Associação entre sexo e estação do ano e tipos genéticos de intimina detectados em amostras de aEPEC isoladas de 68 crianças com diarreia aguda e sem diarreia, entre 2004 e 2007, em Belo Horizonte.           | 60 |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| TABELA 11 | Associação entre faixa etária do paciente e tipos genéticos de intimina identificados em amostras de aEPEC isoladas de 68 crianças com diarreia aguda e sem diarreia, atendidas entre 2004 e 2007, em Belo Horizonte.      | 62 |
| TABELA 12 | Distribuição, durante o período de estudo, dos tipos de intimina identificados em amostras de aEPEC isoladas de 68 crianças com diarreia aguda e sem diarreia, em Belo Horizonte, no período entre 2004 e 2007.            | 63 |
| TABELA 13 | Distribuição de <i>hlyA</i> , <i>iha</i> e <i>toxB</i> em amostras de AEEC isoladas de 108 pacientes com diarreia aguda e sem diarreia, sem infecção mista, atendidos no período de 2004 a 2007, em Belo Horizonte.        | 65 |
| TABELA 14 | Associação entre presença de diarreia e <i>hlyA</i> , <i>iha</i> e <i>toxB</i> em amostras de AEEC isoladas de 39 crianças com diarreia aguda e 47 sem diarreia atendidas no período entre 2004 e 2007, em Belo Horizonte. | 66 |
| TABELA 15 | Associação entre sexo e estação do ano e <i>hlyA</i> , <i>iha</i> e <i>toxB</i> identificados em amostras de AEEC isoladas de crianças com diarreia aguda e sem diarreia, entre 2004 e 2007, em Belo Horizonte.            | 67 |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| TABELA 16 | Associação entre faixa etária do paciente e <i>hlyA</i> , <i>iha</i> e <i>toxB</i> identificados em amostras de AEEC isoladas de 86 crianças com diarreia aguda e sem diarreia atendidos no período de 2004 a 2007, em Belo Horizonte. | 68 |
| TABELA 17 | Distribuição, de 2004 a 2007, de <i>hlyA</i> , <i>iha</i> e <i>toxB</i> identificados em amostras de AEEC isoladas de 86 crianças com diarreia aguda e sem diarreia em Belo Horizonte.   | 69 |



## LISTA DE ABREVIATURAS

A/E: *attaching and effacing*

aEPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica atípica

BFP: *bundle forming pillus*

*bfpA*: gene que codifica BFP

DAEC: *Escherichia coli* de aderência difusa

DEC: *Escherichia coli* diarreiogênica

dNTP: dideoxynucleosídeo trifosfatado

*eae*: gene que codifica intimina

EAEC: *Escherichia coli* enteragregativa

EAF: EPEC *adherence factor*

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EHEC: *Escherichia coli* enteremorrágica

EIEC: *Escherichia coli* enterinvasiva

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica

EPM: Escola Paulista de Medicina (meio de cultura para identificação bioquímico-fisiológica de enterobactérias)

Esp: EPEC *secreted proteins*

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica

FHEMIG: Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais

*hlyA*: gene que codifica enteremolisina A

*iha*: gene que codifica a adesina Iha

Kb: quilobase

KDa: quilodáltons

LEE: *locus of enterocyte effacement*

MDa: megadáltons

MIII: Motilidade, indol, lisina (meio de cultura para detecção de motilidade, produção de indol e descarboxilação de L-lisina)

pb: pares de bases

PCR: reação de polimerização em cadeia

REA: análise com endonucleases de restrição

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

SST3: sistema de secreção tipo III

STEC: *Escherichia coli* produtora de toxina shiga

*stx*: gene que codifica a toxina shiga

Taq DNA polimerase: *Thermus aquaticus* DNA polimerase

tEPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica típica

Tir: *translocated intimin receptor*

*toxB*: gene que codifica ToxB

## RESUMO

Diarreia infecciosa aguda continua sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em crianças, especialmente nas regiões menos favorecidas do planeta. Entre os diferentes agentes etiológicos da doença, merece menção, pela prevalência elevada e gravidade da doença, o grupo de *Escherichia coli* diarréiogênica (DEC) denominado *attaching and effacing E. coli* (AEEC), caracterizado pela formação da lesão A/E (*attaching and effacing*) nos enterócitos, mediada pela intimina. Este grupo inclui os subgrupos típico e atípico de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e o tipo patogênico denominado *E. coli* enteremorrágica (EHEC) que, além de intimina, expressa toxinas shiga. Estes patótipos apresentam grande diversidade genética, inclusive no que se refere à expressão de marcadores de virulência, razões pelas quais este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a distribuição dos tipos genéticos de intimina e dos genes *hlyA*, *iha* e *toxB*, que codificam adesinas e toxina bacterianas. Foram estudadas 561 amostras de AEEC obtidas de 110 crianças com até 69 meses de idade, com diarreia aguda e sem diarreia, atendidos, entre 2004 e 2007, no Hospital Infantil João Paulo II/FEMIG, Belo Horizonte, MG. Intimina beta foi o tipo mais prevalente, detectada principalmente em EPEC típica e atípica. Intimina gama foi a mais comum em EHEC. Intimina kapa não foi detectada na população estudada. Foi observada variação temporal na distribuição dos tipos de intimina, com declínio de beta e emergência de épsilon ao longo do período de estudo. A detecção da intimina iota concentrou-se em crianças com idade entre 13 a 24 meses. Aproximadamente 10% das amostras de AEEC no nosso meio não tiveram sua intimina identificada. Nenhum tipo

genético de intimina estava associado com sexo, estação do ano, e presença de diarreia. Os marcadores de virulência *hlyA*, *iha* e *toxB* foram detectados em menos da metade das amostras de AEEC, sendo carreados por todos os tipos patogênicos incluídos neste grupo de DEC. Nossos resultados confirmam a existência de diferenças geográficas na distribuição dos marcadores de virulência de AEEC e a grande diversidade genética deste grupo de DEC, especialmente aEPEC e podem contribuir para o delineamento de estratégias de prevenção e controle da diarreia associada a AEEC.

## ABSTRACT

Infectious diarrhea is still a main cause of morbidity and mortality among children from the less developed areas of the world. Among several etiologic agents, a group of diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) named *attaching and effacing E. coli* (AEEC), associated to the genesis of the intimin-mediated A/E lesion in enterocytes, should be mentioned. AEEC includes typical (tEPEC) and atypical (aEPEC) subgroups of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and the pathotype enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) that also expresses shiga toxin. All of them, mainly aEPEC, are genetically diverse, especially in regard to the expression of genetic markers of virulence. For these reasons, we carried out this investigation aiming to evaluate the distribution of intimin types and *hlyA*, *iha*, and *toxB*, that encode bacterial adhesins and toxins, in 561 AEEC strains. The strains were obtained from 110 children aged up to 69 months with acute diarrhea and without diarrhea, who searched for assistance at Hospital Infantil João Paulo II/FHEMIG, Belo Horizonte, MG, from 2004 to 2007. Beta was the most prevalent intimin genotype in both tEPEC and aEPEC. Gamma was the most common type among EHEC. Intimin kappa was not found in the population studied. Temporal shifts in the distribution of intimin genotypes were observed: type beta prevalence decreased steadily and epsilon intimin emerged from 2006 on. A higher prevalence of intimin iota was detected among children aged 13 to 24 months. Around 10% of AEEC strains could not have their intimin identified. Seasonality and association with gender and diarrhea were not observed. *hlyA*, *iha* and *toxB* were found in less than 50% of the AEEC strains, but were found to be harbored by all AEEC pathotypes. Our findings corroborate the existence of differences in geographic

distribution of the virulence factors encoded by *eae*, *hlyA*, *iha*, and *toxB* among AEEC. They also support the hypothesis that this pathotype comprises a genetically diverse DEC group, specially the subtype aEPEC.