

**ACADEMIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
INSTITUTO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA, MICOLOGIA,  
VIROLOGIA LABORATORIAL, CLÍNICA E HOSPITALAR**

Fabiana Regina da Cunha Raymundo Barbosa

**AVANÇOS DE DIAGNÓSTICOS LABORATORIAIS DA  
*ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGÊNICA**

**São José do Rio Preto**

**2018**

Fabiana Regina da Cunha Raymundo Barbosa

**AVANÇOS DE DIAGNÓSTICOS LABORATORIAIS DA  
*ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGÊNICA**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como requisito para a obtenção do Certificado da Pós Graduação “*Latu Sensu*” em Microbiologia, Micologia e Virologia Laboratorial, Clínica e Hospitalar- Nível de Especialização - Academia de Ciência e Tecnologia - São José do Rio Preto.

**São José do Rio Preto  
2018**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por esta oportunidade maravilhosa que me proporcionou.

A todos os orixás que sempre me iluminaram e abençoaram durante a trajetória da minha vida.

Aos meus pais, em especial a minha mãe Regina Helena da Cunha Raymundo que sempre me inspirou a lutar pelos meus sonhos e ao meu querido e amado pai José aparecido Barbosa (*in memoriam*).

A todos os meus familiares pela paciência, compreensão e incentivo.

A coordenadora do curso Magarete Teresa Gottardo de Almeida pelos ensinamentos, pelo carinho e pela paciência.

Meus colegas de curso, Ana Lúcia, Valiana Dayane, Roberta Lima, pelo companheirismo e amizade durante todo curso.

## RESUMO

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é um microrganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, constituindo parte da microbiota normal do trato intestinal de humanos e animais de sangue quente. É classificada como um bastão reto, gram-negativo não formador de esporos, podendo ser móvel quando da presença de flagelo, ou imóvel. As bactérias dessa espécie são anaeróbias facultativas e utilizam D - glicose e outros carboidratos com a formação de ácido e gás. As linhagens enteropatogênicas de *E. coli* que causam danos intestinais ao hospedeiro classificam-se em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), sobre a qual este trabalho versa de modo mais específico, *E. coli* enteroagregativa (EAEG), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* difusa aderente (DEAC). A EPEC é considerada a principal causa de diarreia aquosa e potencialmente fatal em criança. Assim o presente estudo teve como objetivo avaliar a caracterização e o diagnóstico de EPEC, bem como, as diferenças e as similaridades patogênicas e epidemiológicas das duas subcategorias de EPEC, classificadas como: típica e atípica. Tratou-se de um estudo retrospectivo, utilizando as seguintes bases de dados: Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES), *National Library of Medicine and National Institutes of Health* (MEDLINE), Literatura Latino Americana em Ciências de Saúde (LILACS), *Scientific Electronic Library Online* (SCIELO), Biblioteca Virtual de Saúde e Google Acadêmico; dos quais os unitermos incluídos foram: *Escherichia coli*, EPEC, diagnóstico laboratorial, diarreia. Notou-se que os surtos de diarreias causados pelas distintas categorias de *E.coli* ocupam a agenda dos serviços de Vigilância Epidemiológica de diversos países. A partir de então, reconhecendo se tratar de uma questão pertinente à saúde pública, o entendimento dos especialistas que buscam, com os avanços tecnológicos e as fronteiras científicas cada dia mais alargadas consolidar seus estudos que contribuem para uma melhor qualidade da saúde e, por conseguinte, de vida da população, sobretudo as mais carentes.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*. EPEC. Diagnóstico laboratorial. Diarreia.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - <i>E. coli</i> em Ágar EMB ( <i>Eosin Methylene Blue</i> ) .....	11
<b>Figura 2</b> - Grupos reconhecidos da <i>E. coli</i> diarreio gênicas (DEC) .....	13

**LISTA DE QUADROS E TABELAS**

<b>QUADRO 1</b> - Grupos reconhecidos da <i>E. coli</i> diarreio gênicas (DEC).....	13
<b>QUADRO 2</b> - Comparativo entre <i>E. coli</i> enteropatogênicas.....	15

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>DAEC</b>	<i>E.coli</i> Difusa Aderente
<b>DTA</b>	Doenças Transmitidas por Alimentos
<b>EAE</b>	Gene de Ligação e Entumescimento (“ <i>attaching and effacing</i> ”)
<b>EAEC</b>	<i>E. coli</i> Enteroagregativa
<b>EAF</b>	<i>Adherence factor</i>
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EHEC</b>	<i>E. coli</i> Enterohemorrágica
<b>EMB</b>	<i>Eosin Methylene Blue</i>
<b>EPEC</b>	<i>E. coli</i> Enteropatogênica
<b>EPEC-a</b>	<i>E. coli</i> Enteropatogênica atípica
<b>EPEC-t</b>	<i>E. coli</i> Enteropatogênica típica
<b>FAS</b>	( <i>Fluorescent actin staining</i> )
<b>GI</b>	Gastrointestinal
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>SBPC</b>	Sociedade Brasileira de Patologia Clínica
<b>STEC</b>	<i>E. coli</i> Shiga Toxigênica
<b>Stx</b>	Shiga Toxina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>1.1 <i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica (EPEC) – considerações e classificação</b> .....	10
<b>1.1.1 EPEC - t e EPEC - a</b> .....	12
<b>1.2 Diferenças e aproximações dos aspectos patogênicos da <i>E. coli</i></b> .....	13
<b>2. OS AVANÇOS DOS ESTUDOS LABORATORIAIS NO DIAGNÓSTICO DA <i>E. coli</i> ENTEROPATOGÊNICA</b> .....	16
<b>2.1 Sorotipagem</b> .....	18
<b>2.2 Teste de adesão em cultura de células</b> .....	18
<b>2.3 FAS (<i>fluorescent actin staining</i>)</b> .....	18
<b>2.4 Técnicas de biologia molecular</b> .....	19
<b>2.5 Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (2015)</b> .....	19
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	20
<b>4 .OBJETIVOS</b> .....	21
<b>4.1 Objetivo Geral</b> .....	21
<b>4.2 Objetivos específicos</b> .....	21
<b>5. METODOLOGIA</b> .....	22
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	23
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	24
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	26



## 1. INTRODUÇÃO

A microbiota é essencial para o trato gastrointestinal (GI), pois a presença de diversas bactérias para além de auxiliar o desenvolvimento das suas funções, incluindo os movimentos peristálticos, vai degradar os polissacarídeos e bloquear a ação de microrganismos patogênicos (MALOZI, 2012), sendo fundamental para o sistema imunológico.

Por microbiota entende-se uma população de organismos microscópicos que habitam um órgão do corpo ou parte do corpo de uma pessoa (THOMAS; GREER, 2010). Aos nos referirmos à bactéria *Escherichia coli* (*E.coli*), remetemo-nos a um tipo da microbiota intestinal dos mamíferos, uma vez que faz parte desse universo um grande número de bactérias, que variam entre “[...]10<sup>1</sup> a 10<sup>3</sup> por grama de conteúdo do estômago e do duodeno, progredindo de 10<sup>4</sup> a 10<sup>7</sup> bactérias por grama no jejuno e íleo e culmina em 10<sup>11</sup> a 10<sup>12</sup> células por grama no cólon, ou seja, 10 a 100 vezes mais bactérias do que as próprias células humanas” (O’HARA; SHANAHAN, 2006 apud MALOZI, 2012), tal bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*, tendo como principal habitat o trato intestinal humano e animal (MOURA 2009; AYALA, 2009; SILVA *et al.*, 2010).

Dentre as bactérias denominadas *E. coli*, vamos encontrar a do tipo enteropatogênica, (EPEC), diz respeito às bactérias gram negativas, anaeróbicas facultativas. No entanto, a sua classificação obedece aos mecanismos de infecção e virulência (KAPER, 1994), estando frequentemente associada às causas da diarreia.

### 1.1 *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC) – considerações e classificação

O nome da bactéria está associado ao pediatra alemão Theodor Von Escherich, que foi o primeiro cientista a descrever este agente em 1885. Denominada inicialmente por *Bacterium coli commune* e, posteriormente, em 1958, recebeu a denominação atual, *Escherichia coli* em sua homenagem (BERCHIERI JUNIOR; MACARI, 2009). A classificação da *E. coli* pressupõe seus mecanismos de infecção e os fatores de contaminação, mais adiante apontados (Quadro 1).

A associação da *E. coli* como fator diarreiogênico se deu a partir de 1980 com envolvimento em animais, muito embora nas décadas de 1920 e 1930 já alguns estudos atribuíam a sua presença nos casos diarreias infantis. No entanto somente a partir de 1940, sua denominação passou a ser, de fato, associada como agente etiológico de diarreia em humanos (DOYLE; PADHYE, 1989).

Vale salientar que, segundo Kaper et al. (2004) essa bactéria foi considerada por muito tempo, um organismo não patogênico do trato entérico, no entanto, os estudos apontaram nas últimas décadas para a configuração de trato entérico. Desde a sua descoberta, os estudos acerca da EPEC têm avançado, o que permite a sua classificação em patótipos, segundo seus mecanismos de infecção e virulência (CROXEN & FINLAY, 2010; SAVIOLLI, 2010).

Sendo a primeira EPEC descoberta em 1940, é ainda hoje considerada a mais versátil entre as categorias diarreiogênicas e uma das principais causas de diarreia em crianças menores de 5 anos de idade (SOUZA et al., 2016). A partir dos anos 60 a EPEC teve sua importância diminuída como causa de diarreia nos países desenvolvidos, sendo apontada como um dos principais agentes de diarreia na infância em áreas em desenvolvimento, nas quais estão incluídas a América do Sul, África e Ásia. Os fatores de precariedade contribuem para os surtos de EPEC, que são esporádicos e de incidência variável em todo mundo (São Paulo, 2002).

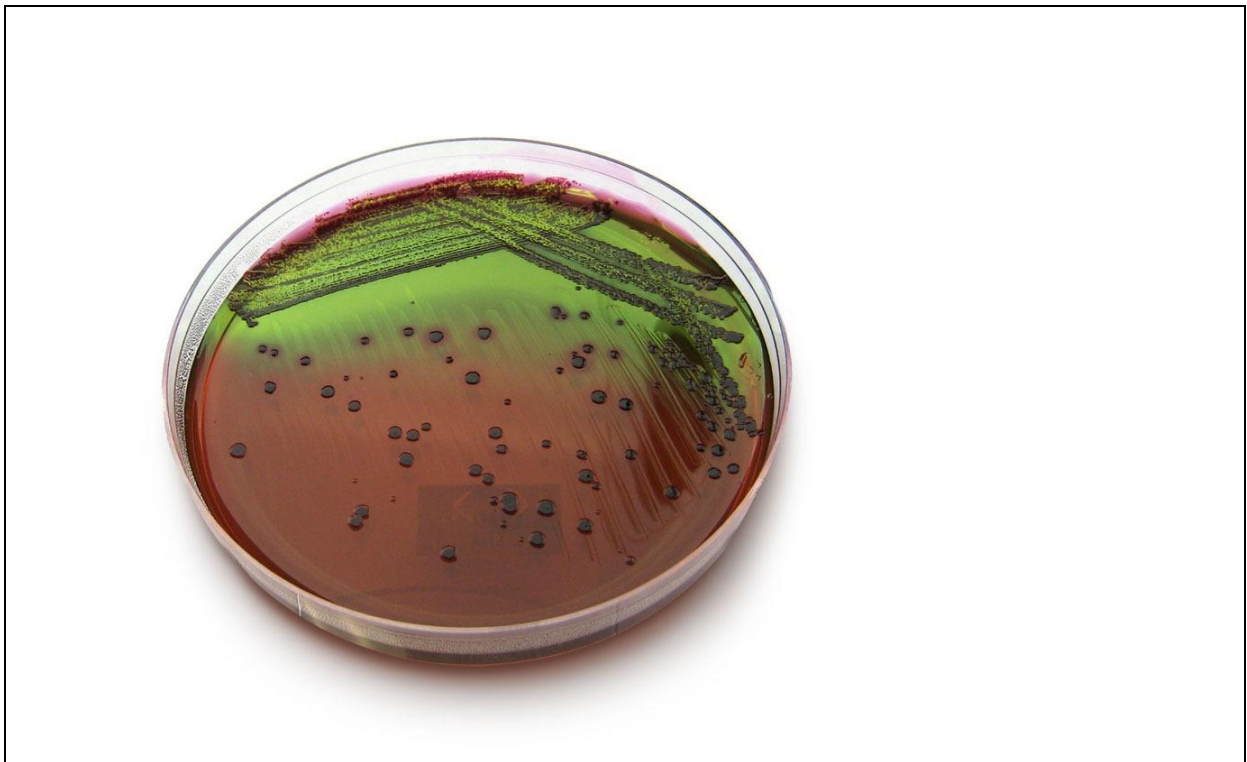
Sendo a partir de 1995, classificada em duas subcategorias: EPEC típica ( EPEC-t) e atípica – (EPEC-a). No que diz respeito às EPEC-t, estão identificadas pela presença do gene *eae* (EPEC *attaching and effacing*) e plasmídio EAF (EPEC adherence factor). Já as EPEC-a possuem o gene *eae*, e não possuem o plasmídio EAF (SOUZA, et al. 2016). Em ambas, não se apresentam o gene *stx* (Shiga toxina).

Apesar de durante muito tempo e em muitos estudos, serem associadas às causas da diarreia infantil, atualmente observa-se uma redução desta subcategoria e o aumento de isolamento de EPEC-a (SOUZA et al., 2016, BUERIS et al., 2007; SILVA, 2004).

A gastroenterite causada por EPEC são de natureza aquosa ou sanguinolenta (SILVA, 2004). Acerca da manifestação diarreica, atribui-se que esta decorre da adesão do microrganismo ao epitélio do intestino e imediata destruição das microvilosidades, que resulta na alteração física da integridade do intestino (PADHYE; DOYLE, 1992).

Isto posto, vale salientar que os avanços dos estudos acerca das EPECs vêm consolidando e dinamizando as suas técnicas que incluem os meios de cultura e isolamento das bactérias em colônias. Adiante, a título ilustrativo, pode ser visto uma colônia de *E. coli*, numa cultura em Ágar EMB (*Eosin Methylene Blue*) na Figura 1.

**Figura 1.** *E. coli* em Ágar EMB (*Eosin Methylene Blue*)



**Fonte:** CÂMARA, 2011. (<https://www.biomedicinapadrao.com.br/2011/11/guia-meios-de-cultura-para-bacterias.html>> acesso em 10 de outubro de 2018).

Como visto na ilustração acima, é possível obter um patógeno na forma de colônia pura, sendo a Figura 1 uma colônia que se apresenta em um meio diferenciado, utilizado para o isolamento e diferenciação de bacilos entéricos gram-negativos (*Enterobacteriaceae* e outros bastonetes gram-negativos) provenientes de amostras clínicas. O método que vai utilizar o Ágar BEM consiste em um método microbiológico descrita inicialmente por Holt-Harris e Teague em 1916, sendo posteriormente modificada por Levine (1918). Sua diferença provém de que no método de Holt-Harris e Teague (1916) é acrescentada a sacarose, que fermenta por meios entéricos do que a lactose. Já o O BD EMB Agar, Modified, o exemplo disposto na Figura 1, contém corantes de eosina Y e azul-de-metileno que inibe as bactérias gram-positivas. O uso dos corantes presta-se como indicadores de diferenciação em resposta à fermentação da lactose e/ou sacarose por microrganismos. Quanto à forma de reagir, os coliformes produzem colônias preto-azuladas, podendo apresentar um reflexo verde metalizado característico, devido à rápida fermentação da lactose (BD, 2013).

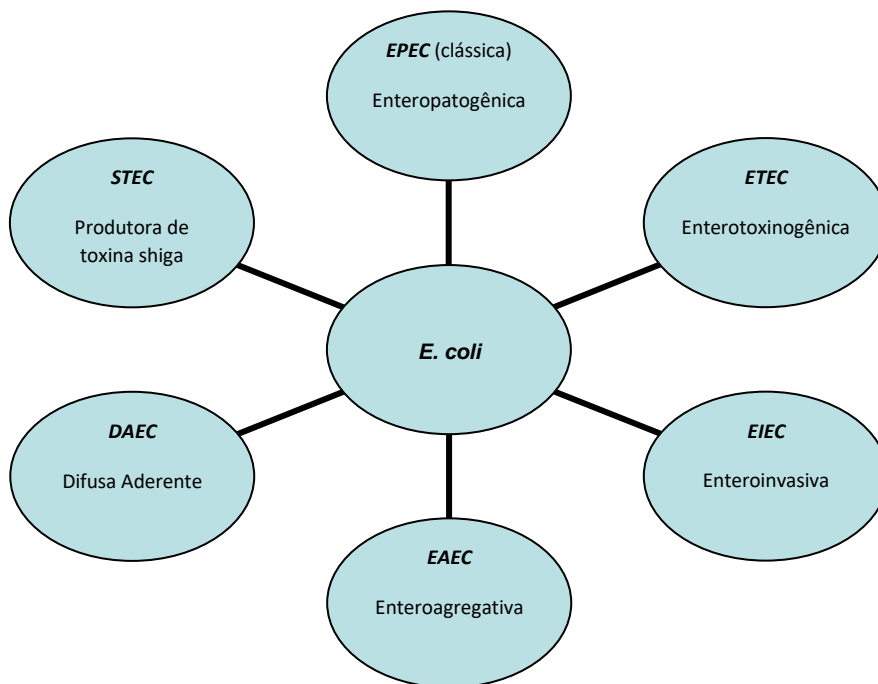
### **1.1.1 EPEC – t e EPEC - a**

As categorias apontadas por recentes estudos, dizem respeito aos comportamentos epidemiológicos e as variantes de hospedeiros, atestando a natureza da versatilidade da EPEC (SOUZA, 2016). A EPEC-t representa sua original categoria com comportamento epidemiológico restrito aos seres humanos e aspectos patogênicos bastante delineados. Já a EPEC-a está associada à diarreia humana tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, podendo ser encontrada em diversos animais, alimentos e estar distribuída em diferentes ambientes tanto aquáticos como terrestres (MORATO et al., 2019; AYALA, 2009; MOURA, 2009). No entanto, apesar de sua ampla distribuição e da sua comprovada participação como causa de diarreia humana, sua patogênese e via de transmissão não estão claramente estabelecidas (HERNANDES et al., 2009). Em seguida, abordam-se as especificidades da *E. coli*, diferenças e aproximações do comportamento patogênico.

## 1.2 Diferenças e aproximações dos aspectos patogênicos da *E. coli*

Estudos recentes apontam para a existência de seis patótipos reconhecidos de *E. coli* diarreio gênicas – DEC, classificadas de acordo com os sítios de colonização preferencial no hospedeiro, mecanismos e virulência e sintomas clínicos de infecção (DUTRA, 2018). Sendo apresentadas na Figura 2, com as suas respectivas siglas, de modo facilitador para uma leitura linear, de caráter ilustrativo.

**Figura 2.** Grupos reconhecidos da *E. coli* diarreio gênicas (DEC).



**Fonte:** Silva, 2004 (adaptado).

O organograma apresentado na Figura 2, diz respeito aos seis grupos reconhecidos, devendo ser lido com base no Quadro 1, a seguir, estão apresentados os diferentes tipos de *E. coli*, considerando as especificidades de cada uma e as respectivas patogenias, entendendo que a referência se dá na forma da ação dos agentes etiopatogênicos. As patogenias são aproximadas e guardam algumas semelhanças entre os grupos de *E. coli*, os quais apontam os seus mecanismos de infecção e os fatores de virulência das *E. coli* enteropatogênicas (SILVA, 2004; SILVA et al., 2010; PADHYE; DOYLE, 1992; DUTRA, 2018).

Quadro 1. Comparativo entre *E. coli* enteropatogênicas.

<i>E. coli</i>	Mecanismos de infecção	Fatores de virulência
<b>EPEC</b>	Lesão de Adesão e desvanecimento do enterócito (A/E) <i>Attaching/ Effacing</i> .	<i>BfpA</i> (EAF+), <i>EspB</i> , <i>EspD</i> , <i>EspA</i> , intimina e <i>Tir</i> , dentre outros.
<b>EHEC</b>	Lesão de Adesão e desvanecimento do enterócito (A/E) <i>Attaching/ Effacing</i> . Além de hemorragia e edema da lâmina própria causada pela liberação de citotoxina.	Toxina shiga símile/Verocitotoxina (Stx).
<b>ETEC</b>	Colonização da superfície da mucosa intestinal e liberação de enterotoxinas.	Toxina Termo estável (ST), Toxina Termo lábel (LT).
<b>EAEC</b>	Aderência inicial na mucosa intestinal, produção de muco e de citotoxina.	Enterotoxina estável enteroagregativa (EAST1)
<b>EIEC</b>	Invasão epitelial, rompimento do vacúolo endocítico, multiplicação intracelular, movimento direcional pelo citoplasma, invasão de células epiteliais adjacentes.	Plasmídeo que codifica genes de invasão.
<b>DAEC</b>	Aderência difusa na membrana epitelial, alongação das microvilosidades, sem alteração no citoplasma.	Hemolisina $\alpha$ , Fator 1 de citotoxicidade necrosante (CNF1).

Fonte: Nataro; Kaper (1998); Silva (2004); Silva *et al.* (2010). Conteúdo adaptado.

O Quadro 1, mostra os seis tipos de patótipos de *E. coli*, cujas cepas se ligam as infecções intestinais, os seus respectivos mecanismos de infecção, bem como os fatores de virulência. A partir de então torna-se possível a delimitação da patogênese da EPEC, ou seja, o modo como os agentes etiopatogênicos atuam no organismo do hospedeiro, bem como a forma que os sistemas naturais de defesa reagem, ocorre em quatro fases distintas (KAPER, 2004).

No Quadro 2, apresentam-se os sintomas associados a patogenia da diarreia, quantos aos quesitos de variações, produção de toxinas e invasão tecidual.

**Quadro 2.** Sintomas da diarreia (por EPEC)**Sintomas associados a patogenia da doença diarréica**

<b>Variável</b>	<b>Produção de Toxina</b>	<b>Invasão Tecidual</b>
Consistência das fezes	Aquosa	Amolecida
Volume fecal	Grande	Pequena
Vômito	Presente	Ausente
Febre	Ausente	presente
Desidratação	Importante	Leve
Sintomas após inoculação	Poucas horas a 2 dias	1 a 3 dias
Leucócitos nas fezes	Negativo	presentes
Sangue e muco nas fezes	Negativo	presentes
Local de infecção	Intestino delgado	Intestino grosso

**Fonte:** BRASIL, 2004.

## 2. OS AVANÇOS DOS ESTUDOS LABORATORIAIS NO DIAGNÓSTICO DA *E. coli* ENTEROPATOGÊNICA

A importância do diagnóstico laboratorial é imensurável pela contribuição na celeridade do tratamento mais correto evitando perdas de vida. O diagnóstico das doenças advindas da EPEC não acontece diferente. Considerando que as novas tecnologias, bem como os novos ramos da área de saúde ampliaram-se buscando de modo mais urgente os avanços que asseguram qualidade de vida, no tocante à qualidade da saúde da população. Caso a caso, a importância dos estudos laboratoriais vem construindo o avanço científico na área do diagnóstico. Em dezembro de 2008, a Unicamp divulga através da sua Revista Pesquisa Fapesp, uma notícia que vem ilustrar o entendimento desse trabalho, exemplificando de maneira concreta. Vejamos:

Uma bióloga brasileira que trabalha há dez anos nos Estados Unidos encontrou uma nova possibilidade de controle de uma variedade de bactéria que provoca intensas diarreias. Essa variedade, a *Escherichia coli* enterohemorrágica ou EHEC, causa no Brasil cerca de 5 mil casos de diarreias muitas vezes sanguinolentas, seguidas de complicações renais (cerca de 600 mil adultos e crianças são hospitalizados por diarreias agudas de origem bacteriana no país todo ano). Em outros países, porém, provoca surtos com milhares de vítimas. Nos Estados Unidos, por exemplo, a EHEC atinge cerca de 73 mil pessoas, com 1.800 a 3.600 hospitalizações e de 60 a 550 mortes por ano. [...] Apresentada em um artigo publicado em agosto na revista *Science*, a LED 209 liga-se a uma proteína das bactérias chamada histidina quinase e as impede de produzir a toxina Shiga, que agrava a infecção intestinal – as bactérias continuarão pelo intestino, mas inofensivas. “Não precisamos matar todas as bactérias, mas apenas fazer com que parem de produzir toxinas”, diz Vanessa, bióloga formada pela Universidade de Campinas (Unicamp). “Se matarmos todas as EHEC, as que sobreviverem vão liberar mais toxinas, que vão agravar o quadro clínico, e podem se tornar resistentes a medicamentos.” A LED 209 funcionou de modo satisfatório em camundongos e coelhos contra uma variedade de bactéria causadora de diarreias que se espalha pelo organismo e causa infecção generalizada, a *Salmonella typhimurium*. No entanto, essa molécula é absorvida e desaparece no intestino, por essa razão apresentando pouca eficácia contra a EHEC, que vive somente no intestino. “O que temos de fazer agora é modificar essa molécula, para que não seja absorvida no intestino”, comenta Vanessa (FIORAVANTI, 2008, p. 52).

Acerca da EPEC enteropatogênica, a mesma matéria, mais adiante aponta para o fato de que:



No Brasil, outra variedade, a *E. coli* enteropatogênica (EPEC), também é mais preocupante. Menos agressiva que a EHEC, a EPEC deve causar cerca de 30 mil casos de diarreias provocadas por bactérias por ano nas regiões mais urbanizadas do Brasil ou cerca de 180 mil nas menos urbanizadas. Em crianças bem nutridas a EPEC causa infecções intestinais que normalmente desaparecem em até uma semana apenas com reidratação oral, mas nas mal nutridas pode causar diarreias persistentes, com duração superior a 14 dias, cuja repetição pode prejudicar o crescimento e o desenvolvimento mental (FIORAVANTI, 2008, p.53).

O destaque para a matéria veiculada na Revista Pesquisa da Unicamp, vai abalzar a importância dos estudos laboratoriais para o diagnóstico preciso e o combate efetivo da morbidade, diminuindo os riscos de morte e quebrando paradigmas. Mostrando assim, a importância da pesquisa laboratorial para a construção do diagnóstico.

O campo laboratorial é hoje multidisciplinar e envolve profissionais cada vez mais especializados, a exemplo da biotecnologia e a biomedicina. A Associação Brasileira de Biomedicina – ABBM aponta que os profissionais da biomedicina unem biologia e medicina, formando profissionais atualizados e exclusivamente dedicados aos novos avanços da saúde.

Nesse contexto, a crescente pesquisa na área de diagnóstico laboratorial vai responder a grande necessidade da produção de imunoproliféricos e métodos, além de diagnósticos rápidos contra as bactérias enteropatogênicas, que pela pluralidade característica da sua versatilidade exige ações cada vez mais efetivas.

Das técnicas presentes nos dias atuais, podem ser destacadas, segundo o levantamento bibliográfico feito neste estudo, quatro tipos de análises para a detecção de EPEC: a sorotipagem, o teste de adesão em cultura de células, o FAS (*fluorescent actin staining*) e as técnicas de biologia molecular (JAFARI et al., 2012; GILLESPIE, 2006; Paiva, 2011). Entre estas técnicas, as únicas utilizadas para diferenciação entre EPEC-t e EPEC-a, são as técnicas de biologia molecular como a PCR convencional, PCR multiplex e PCR em tempo.

Tais técnicas desenvolvidas para aplicação em laboratório, vão garantir metodologias voltadas para aspectos específicos da EPEC, como a identificação de antígenos (sorotipagem) e genes codificantes de fatores de virulência (PCR e suas variações), também os aspectos voltados à investigação da interação da bactéria com as células, como a formação da lesão A/E e condensamento de actina constatados no teste de FAS, além da observação e classificação do tipo de adesão que as EPEC promovem em cultura de células (SOUZA et al., 2016).

## 2.1 Sorotipagem

O método da Sorotipagem é utilizado de modo específico pra detectar antígenos somáticos e flagelares, sendo inapropriada para identificação de EPEC e diferenciação das suas subcategorias, pois um mesmo sorogrupo ou sorotipo pode ser EPEC-t ou EPEC-a. Entretanto, essa técnica tem uma importância epidemiológica para descrição dos sorotipos por reservatórios ou regiões geográficas, além de permitir a classificação da EPEC-a em dois subgrupos: sorotipos clássicos, associados com diarreia e as que não são tipáveis pertencentes aos sorotipos não clássicos (SOUZA et al. 2016). É um método desenvolvido durante as décadas de 1930 e 1940, culminando com o método Kauffman - que com modificações - ainda é usado atualmente. Acerca do diagnóstico pode ser dito que diagnóstico é realizado por triagem com soros polivalentes contendo anticorpos contra antígenos somáticos (O) e capsulares (K) específicos para os sorotipos prevalentes. Existem comercialmente soros monovalentes para caracterização específica. Pode dar resultado falso positivo, que pode ser reduzido com sorologia para antígenos H ou provas de virulência em Laboratórios de referência (BRASIL, 2004).

## 2.2 Teste de adesão em cultura de células

O teste de adesão em cultura de células não tem poder discriminatório para diferenciação entre EPEC-t e EPEC-a, portanto, deve ser utilizado como teste de estudos complementares de patogenicidade para esta subcategoria (SOUZA et al., 2016).

## 2.3 FAS (*fluorescent actin staining*)

O teste de FAS (*fluorescent actin staining*) detecta a alta concentração de filamentos de actina polimerizada, presentes no enterócito, logo abaixo do sitio de aderência bacteriana. A intimina e a proteína bacteriana, codificada pelo gene *eae*, responsável pela aderência íntima as células hospedeiras, na lesão A/E, o receptor da intimina, denominado *Tir*

(*translocated intimin receptor*), e um produto bacteriano que está inserido na célula hospedeira durante a infecção (VIEIRA et al., 2001).

## 2.4 Técnicas de biologia molecular

O diagnóstico molecular é capaz de identificar EPEC e diferenciar EPEC-t de EPEC-a e os genes alvos utilizados neste diagnóstico são: *eae*, que está presente nas duas subcategorias de EPEC; o gene *bfp*, presente apenas na EPEC-t; e os genes *stx*, que são ausentes entre as EPEC, pois são específicos de EHEC/STEC (SOUZA et al., 2016; HERNANDES et al., 2009).

## 2.5 Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (2015)

É urgente o uso das tecnologias em favor da qualidade de vida. Nas últimas décadas, os avanços da área de microbiologia clínica têm sido bastante significativos. Tanto no reconhecimento de novos agentes etiológicos, na emergência de alguns patógenos clássicos ou ainda no desenvolvimento de ferramentas voltadas para o diagnóstico molecular, além de sistemas automatizados para testes de identificação dos mais diversos microorganismos envolvidos nas infecções.

Por outro lado, os laboratórios clínicos têm aumentado sensivelmente o volume de amostras. Assim, vale assinalar que esses avanços na tecnologia dos laboratórios estão associados a melhores sistemas de informática, haja vista permitirem que se consolide a interface entre os diferentes aparelhos. No entanto, longe da perfeição, todos os sistemas apresentem características peculiares que trazem vantagens e limitações.

A relação custo-benefício no que diz respeito aos equipamentos de um laboratório está na implantação de um sistema com equipamentos que tragam precisão, confiabilidade e menor tempo de resposta com preços mais acessíveis. Nesse entendimento, a Sociedade Brasileira de patologia Clínica – SBPC entende que: “[...] O esperado é que as técnicas utilizadas para essa finalidade sigam alguns parâmetros gerais, como: capacidade de identificação universal, baixo custo de operação e propiciar que os dados obtidos possam ser armazenados, viabilizados e que se tornem passíveis de atualizações” (SBPC, 2014, p. 255).

### 3. JUSTIFICATIVA

Os estudos em torno da EPEC caminham no sentido de consolidar respostas de enfrentamento para surtos de doenças consideradas graves que podem levar à morte. A diarreia é considerada uma importante causa da morbidade e mortalidade na infância, principalmente nas regiões mais carenciadas do país (BRASIL, 2018, *online*).

Entendendo que diarreia, grosso modo, é o aumento do número de evacuações, com a presença de fezes amolecidas de consistência pastosa ou líquida, apresentando ainda, de modo genérico, dores abdominais, náuseas e febre, sendo a sua causa atribuída aos parasitas como vírus, bactérias ou vermes. As principais vítimas dessa doença são as crianças menores de cinco anos, em sua maioria aquelas que vivem nos chamados países em desenvolvimento, porém também atinge adultos animais (mamíferos, principalmente nos casos da *E. coli*).

A falta de saneamento básico e o comprometimento da qualidade da água acessível a essa população também são fatores que contribuem com o aumento dos casos de diarreia e suas implicações no índice de mortalidade, sobretudo infantil, no Brasil. Além dos fatos apresentados, há ainda a preocupação com a vigilância das Doenças Transmitidas por Alimentos – DTA, por parte do governo brasileiro, que através das portarias de consolidação MS-GM nº 4 e nº 5 de 28 de setembro de 2017, Anexo 1 do Anexo V e Anexo XLIII, respectivamente. O Ministério da Saúde monitora o perfil epidemiológico das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no Brasil, sendo a notificação “Das doenças que compõem a lista de doenças monitoradas pela estratégia de vigilância sentinela: Doenças Diarreicas Agudas, Síndrome Hemolítico Urêmica e Rotavírus” (BRASIL, 2017, *online*), constante em seus pressupostos. O que por si mostra a preocupação com essa morbidade.

Considerando tais eventos, justifica-se essa proposta de estudo, pela necessidade de somar-se ao conjunto de literaturas acadêmicas, em busca de interpretações elucidativas do papel da EPEC como um dos fatores implicativos da diarreia, que merecem aprofundamento e carecem de constante revisão da literatura, de modo que seja sempre priorizado.

## **4. OBJETIVOS**

O objetivo deste estudo vai se pautar nos avanços de diagnósticos laboratoriais que estabelecem o diagnóstico de modo mais efetivo. Foi delineado os objetivos gerais e específicos.

### **4.1 Objetivo Geral**

Apresentar os estudos dos avanços laboratoriais no diagnóstico da *E. coli* enteropatogênica (EPEC).

### **4.2 Objetivos específicos**

- Apresentar a classificação dos diferentes grupos da *E. coli* enteropatogênica;
- Apontar os avanços dos estudos laboratoriais, no diagnóstico da *E.coli* enteropatogênica clássica (EPEC);
- Sinalizar os aspectos patogênicos, de modo comparativo, dos grupos de *E.coli* enteropatogênica quanto aos mecanismos de infecção e fatores de virulência.

## 5. METODOLOGIA

Este trabalho de revisão foi elaborado com base em livros, manuais, artigos, teses de doutorado, revistas científicas e portais eletrônicos. Tratou-se de um estudo retrospectivo.

Para a construção teórica, foram utilizadas as bases de dados da Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES), *National Library of Medicine and National Institutes of Health* (MEDLINE), Literatura Latino Americana em Ciências de Saúde (LILACS), *Scientific Eletronic Library Online* (SCIELO), Biblioteca Virtual de Saúde e Google Acadêmico. Assim, de acordo com os objetivos traçados, o levantamento bibliográfico se deu a partir das palavras-chave e expressões, considerados descritores: *E.coli* enteropatogênica; EPEC; avanços laboratoriais nos estudos da EPEC; diarreia e patogenia, dentre outras palavras que surge em um contexto de pertinência ao objeto de estudo e pode ser relacionada.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerada como uma das principais causadoras de enteroinfecções em crianças e adultos, as pesquisas nas últimas décadas apontam que esse patógeno se encontra cada vez mais presente na vida de diversas populações, independente do seu contexto social, ainda que a vulnerabilidade das populações mais carentes seja um fator agregador para a proliferação de doenças, que não seja um determinante, porque a interação e condições de adaptabilidade da *E. coli* são tão consideráveis que atualmente se classificam em duas categorias distintas: EPEC-t e EPEC-a (ALBERTINI, 2009; SCALETSKY et al., 2009).

Note-se a grande importância dos estudos laboratoriais para a detecção de *E. coli* enteropatogênica que além dos seres humanos, as EPEC podem ser identificadas em uma diversidade de animais e ambientes naturais, como a água, por exemplo. Acerca do comportamento epidemiológico pode ser diferenciado dependendo da subcategoria de EPEC, sendo mais facilmente as EPEC – a, identificadas em águas de rios, lagoas e regiões portuárias, estando presentes em animais tanto domésticos como silvestres.

A partir do levantamento bibliográfico, também fez-se perceber que igualmente as EPEC-t se apresentam nos mesmos ambientes que as do atípicas, sendo mais rara entre os animais. Segundo Souza et al (2016) estes dados apontam para uma diferença comportamental entre as duas subcategorias que, provavelmente, influenciam o modo de transmissão para o ser humano.

Ao esclarecer que as diarreias provocadas pelas EPEC não atingem apenas crianças, mas estendem-se para adultos e animais, também fica claro que ambos, homens e animais se tornam possíveis reservatórios de doenças como a gastroenterite humana, por exemplo, ainda que a forma de transmissão não esteja totalmente esclarecida pelas infindáveis fontes contaminantes.

As técnicas laboratoriais têm avançados, em parte auxiliadas pela formação de especialistas em diagnóstico por análises e em parte pela tecnologia. Inegável também é a necessidade de maiores e mais significativos investimento na área de biomedicina e de biotecnologias que conduzam a um efetivo conhecimento e torne célere o diagnóstico, para assim, anular os efeitos da *E. coli* enteropatogênica e as possíveis morbidade associadas.

## 7. CONCLUSÕES

Nenhuma pesquisa é conclusiva, antes pelo contrário, em se tratando de um estudo acadêmico há sempre o que ser dito. Portanto, por considerações finais, entende-se que a EPEC é reconhecidamente uma das principais causas da diarreia, detectada a partir de 1940 e, até o momento, continua associada a casos esporádicos, além de surtos de diarreia infantil, no entanto a *E. coli* apresenta distintos perfis de virulência que permitem classificá-las em duas subcategorias (EPEC-t e EPEC-a) que apresentam comportamentos epidemiológicos distintos entre si, bem como apesar de apresentar reações sintomáticas parecidas não são de todo semelhantes.

Também pode ser dito que as pesquisas os surtos de diarreias causados pelas distintas categorias de *E. coli* continuam a ocupar a agenda dos serviços de Vigilância Epidemiológica de diversos países como uma patologia preocupante que pode levar ao aumento da mortalidade, devido a sua forma de contágio, tratamento e principalmente as possíveis síndromes patológicas ou comorbidades que provocam ao ser humano, bem como causar gastos financeiros consideráveis na busca pelo seu controle.

Cada dia mais, graças aos avanços tecnológicos os estudos laboratoriais voltados para o diagnóstico, além dos estudos epidemiológicos para a avaliação dos riscos, têm gerado uma produção científica de sensível volume, que pelo advento das novas tecnologias da informação a comunicação tem sido, de certo modo, facilitada, de modo que essa comunicação, bem como o uso da tecnologia nos laboratórios é igualmente importante por facilitar o acesso aos dados desse patógeno sem que haja barreiras.

Pelo entendimento aqui apresentado, tendo em vista que a *E.coli* apresenta, grosso modo, uma versatilidade e grande mobilidade, as recomendações preventivas são válidas na garantia de que sejam evitados futuros problemas de saúde pública.



## 8. REFERÊNCIAS

ALBERTINI LS. Ecologia, fatores associados à virulência e diversidade de *Escherichia coli* isoladas de amostras de água de lastro, água de regiões portuárias e moluscos bivalves no Brasil [tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2009. 215 p.

AYALA, C. O. **Sorologia de antígenos flagelares de amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica EPEC e *E. coli* produtoras da toxina de Shiga (STEC) isoladas de diferentes animais e análise comparativa do gene *fliC* por PCR-RFLP** [tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2009. 62 p.

BD, Becton Dickinson GmbH. <http://www.bd.com/europe/regulatory/> Disponível em: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9068>> Acesso em 10 de out. de 2018.

BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, p.455-469. 2009.

CÂMARA, Bruno. Guia: meios de cultura para bactérias. 2011. In: **Biomedicina Padrão**. Disponível em: <https://www.biomedicinapadrao.com.br/2011/11/guia-meios-de-cultura-para-bacterias.html>> Acesso em 10 de outubro de 2018.

CRESWELL, John W. **Investigação qualitativa e projeto de pesquisa**. Porto Alegre: Penso, 2014.

CROXEN, M. A. & FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature**, 8: 20-38, 2010.

DOYLE, M. P.; PADHYE, V. V. *Escherichia coli*. In: DOYLE, M. P. (ed.). **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1989. p. 235-281.

FIORAVANTI, Carlos. Guerra no intestino. Revista Pesquisa Fapesp, São Paulo. 2018. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/2008/12/01/guerra-no-intestino/> Acesso em: 28 de setembro de 2018. P. 52-53.

GIL, Antônio Carlos. **Como elaborar projetos de pesquisa**, 4. ed. São Paulo: Atlas, 2002.

GILLESPIE, S. H. **Medical microbiology**. São Paulo: Premier; 2006. p. 252-472

HERNANDES RT, WALDIR PE, VIEIRA MAM, GOMES AT. An overview of atypical enteropathogenic Escherichia coli. **FEMS Microbiol Lett.** 2009 Aug;297(2):137-49, 2009.

HOLT-HARRIS, J.E., TEAGUE, O. A new culture medium for the isolation of Bacillus typhosus from stools. **J. Infect. Dis.** 18:596-600, 1916.

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.** 2012 Sep;4(3):102-17.

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

LEVINE, M. 1918. Differentiation of B. coli and B. aerogenes on a simplified eosin-methylene blue agar. **J. Infect. Dis.** 23:43-47, 1918.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde.** Brasília, 2004.

MALOZI, Márcia Carvalho. A importância da microbiota no sistema imunológico. *Revista Pediatria Moderna.* Out 10 V 48 N 10, 2012. Disponível em: [http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?id\\_materia=5158&fase=imprime](http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?id_materia=5158&fase=imprime)> Acesso em: 16 de out. de 2018.

MOURA, R. A. **Estudo das relações clonais entre amostras de Escherichia coli atípica de origem animal e humana** [tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2009. 152 p.

MORATO EP, LEOMIL L, BEUTIN L, KRAUSE G, MOURA RA, CASTRO PAF. Domestic cats constitute a natural reservoir of human enteropathogenic Escherichia coli types. **Zoonoses Public Health.** Jun;56(5):229-37, 2009.

NATARO, J. P., KAPER, J. B. Diarrheagenic Escherichia coli. **Clin.Microbiol. Rev** 11:142–201, 1998.

PAIVA, F. P. T. **Quorum sensing em Escherichia coli enteropatogênica atípica** [dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, Instituto Butantan; 2011. 30 p.

SAMPIERI, R. H.; COLLADO, C. F.; LUCIO, M. P. B. **Metodologia de pesquisa.** 5 ed. Porto Alegre: Penso, 2013.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica – CVE. Manual das doenças transmitidas por alimentos - *escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) **INFORME-NET DTA**, São Paulo: SP, 2002. Disponível em: [ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\\_tec/hidrica/ecoli\\_enteropato.pdf](ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/ecoli_enteropato.pdf)> Acesso em: 12 de out. de 2018.

SPBC. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (Sbpc/MI): Boas Práticas em Microbiologia Clínica. Barueri: Editora Manole Ltda. 2015.

SEVERINO, Antônio Joaquim. **Metodologia do trabalho científico**. São Paulo: Cortez, 2014.

SILVA. N., JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N. F. A., TANIWAKI, M. H., SANTOS R. F. S., GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. São Paulo: Varela; 2010.

SILVA, N. **Escherichia Coli O157:H7 em alimentos**. [Tese]. Doutorado em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004. 106 f.

SCALETSKY, I.C. A., ARANDA, K. R. S., SOUZA, T. B., SILVA, N. P., MORAIS, M. B. Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **J Clin Microbiol**. Nov; 47(11):3756-9, 2009.

VIEIRA MAM, ANDRADE JRC, TRABULSI LR, ROSA ACP, DIAS AMG, RAMOS SRT, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry EAE and lack the EPEC adherence factor and shiga toxin DNA probe sequences. **J Infect Dis**. Mar;183(5):762-72, 2001.