

**Secretaria de Estado da Saúde
Coordenadoria de Controle de Doenças
Instituto Adolfo Lutz**

**Curso de Especialização
Vigilância Laboratorial em Saúde Pública**

Maysa Peres

**MÉTODOS INDEPENDENTES DE CULTIVO NA
IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
ENTEROPATÓGENOS BACTERIANOS**

São Paulo, Brasil

2019

Maysa Peres

**MÉTODOS INDEPENDENTES DE CULTIVO NA IDENTIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DE ENTEROPATÓGENOS BACTERIANOS**

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Adolfo Lutz- Unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP-Doutor Antônio Guilherme de Souza como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública

Orientador: Luís Fernando dos Santos

São Paulo, Brasil

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Peres, Maysa

Métodos independentes de cultivo na identificação e caracterização de enteropatógenos bacterianos/ Maysa Peres–São Paulo, 2019.

30 f. il

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização-Vigilância Laboratorial em Saúde Pública)-Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, CEFOR/SUS-SP, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2019.

RESUMO

Métodos tradicionais para o diagnóstico de enteroinfecções causadas por patógenos bacterianos dependem do isolamento e identificação dos micro-organismos através do cultivo e da realização de inúmeras provas fenotípicas como testes bioquímicos e sorológicos. Estas abordagens metodológicas além de demoradas apresentam limitações relacionadas à sensibilidade e especificidade, principalmente no caso de bactérias fastidiosas ou de crescimento mais lento. Nas últimas décadas o emprego de métodos independentes de cultivo, como por exemplo as técnicas baseadas na amplificação e análise de ácidos nucleicos, reduziu drasticamente o tempo de resposta para muitas análises microbiológicas, e permitiu o desenvolvimento de protocolos para investigação simultânea de múltiplos patógenos, em larga escala. Esta revisão pretende analisar alguns dos principais métodos independentes de cultivo atualmente disponíveis para identificação e monitoramento de patógenos bacterianos associados às doenças de transmissão hídrica e alimentar, bem como sua importância na atuação dos laboratórios clínicos e de saúde pública.

Palavras-chave: (doença diarreia aguda, sonda, PCR, sequenciamento, enteropatógenos).

ABSTRACT

Traditional methods for the diagnosis of enteric infections caused by bacterial pathogens rely on the isolation and identification of microorganisms by culturing and performing numerous phenotypic tests such as biochemical and serological assays. These methodologies are time-consuming and present limitations regarding to sensitivity and specificity, especially in the case of fastidious or slower growing bacteria.

In recent decades, the use independent culture methods, such as techniques based on nucleic acid amplification and analysis, has dramatically reduced the response time for many microbiological analyzes and has allowed the development of protocols for simultaneous investigation of multiple pathogens in large scale. This review aimed to analyze some of the main culture independent methods currently available for the identification and surveillance of bacterial pathogens associated with water and food borne diseases as well as their importance in the clinical and public health laboratories.

Keywords: (acute diarrhea disease, probe, PCR, sequencing, enteropathogens).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS	8
4. REFERENCIAL TEÓRICO	9
4.1. DOENÇA DIARREICA AGUDA	9
4.2. AGENTES ETIOLÓGICOS	11
4.2.1. <i>Escherichia coli</i>	11
4.2.1.1. EPEC	12
4.2.1.2. EAEC	12
4.2.1.3. ETEC	13
4.2.1.4. STEC	14
4.2.1.5. EIEC	14
4.2.2. <i>Shigella</i>	15
4.2.3. <i>Yersinia enterocolítica</i>	15
4.2.4. <i>Campylobacter</i>	16
4.2.5. <i>Salmonella</i>	17
4.2.6. <i>Aeromonas</i>	17
4.2.7. <i>Vibrio</i>	17
4.3. MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROPATÓGENOS	18
4.3.1. Técnica de hibridização	20
4.3.2. PCR	20
4.3.3. PCR em tempo real	22
4.3.4. Sequenciamento	22
5. CONCLUSÃO	25
6. REFERÊNCIAS	26

1. INTRODUÇÃO

A doença diarreica aguda (DDA) é a segunda maior causa de morte em crianças menores de cinco anos, embora seja evitável e tratável, só no ano de 2015 cerca de 500 mil crianças vieram a óbito em função deste agravo no mundo (TROEGER; et al, 2017). No geral, as doenças diarreicas agudas (DDAs) são autolimitadas, podendo, entretanto, evoluir para síndromes extra intestinais com prognósticos desfavoráveis que podem incluir o óbito.

O principal veículo de transmissão nas DDAs são os alimentos e a água. Diferentes micro-organismos como bactérias, vírus, parasitas e protozoários podem causar quadros de DDA. A correta identificação do agente etiológico envolvido em surtos e casos esporádicos é de fundamental importância para o manejo clínico dos pacientes afetados e compreensão da epidemiologia dos patógenos, permitindo também a formulação de estratégias de prevenção (DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2007).

O diagnóstico da DDA é realizado através de identificação do patógeno, o que no caso das bactérias envolve metodologias dependentes de cultivo, que são consideradas padrão ouro. Tais técnicas são de grande importância para a completa caracterização do agente, porém apresentam desvantagens, sendo a principal delas o longo tempo para a liberação do resultado. A partir da década de 80 surgiram novas metodologias independentes de cultivo que utilizam ferramentas da biologia molecular como fundamento. A ampla utilização destas técnicas modificou positivamente o cenário de diagnóstico das DDAs, acarretando em diversos benefícios para o tratamento do paciente e para Saúde Pública.

2. OBJETIVO

Realizar uma breve revisão da literatura sobre os principais patógenos bacterianos associados às DDAs, bem como as técnicas independentes de cultivo atualmente empregadas para identificação e caracterização de enteropatógenos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica compulsando artigos científicos do PubMed e dados disponíveis no Ministério da Saúde, por mídia eletrônica, desde a década de 80 até o ano de 2019.

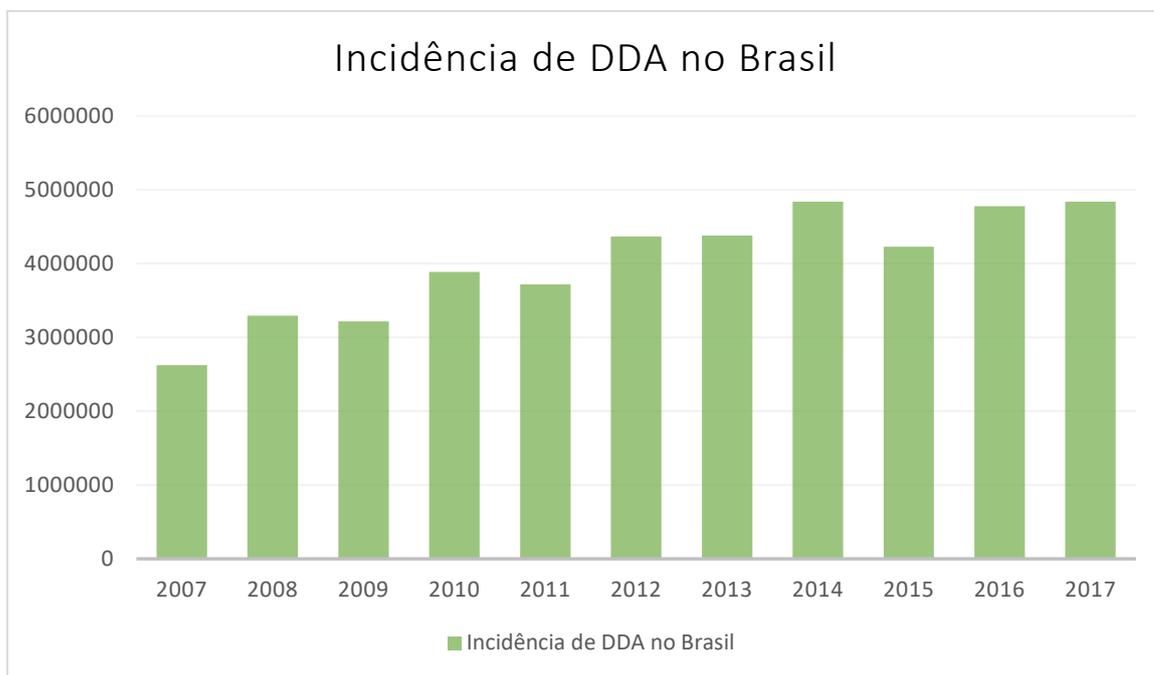
4. Referencial teórico

4.1 DOENÇA DIARREICA AGUDA

A doença diarreica aguda (DDA) é uma síndrome clínica que se caracteriza pelo aumento no número de evacuações diárias em relação ao hábito intestinal normal do indivíduo, com fezes aquosas ou de pouca consistência, que podem ainda conter sangue ou muco. Além deste que é o principal sintoma, as diarreias ou gastroenterites também podem acarretar náuseas, episódios de vômito, febre, e dor gastro-abdominal, a principal complicação gerada é a desidratação que pode levar a morte. Em um quadro típico considera-se que o período de duração dos sintomas da DDA, pode variar de 2 a 12 dias. Entretanto, em alguns casos as manifestações clínicas podem prolongar-se por mais de 14 dias, caracterizando a partir do 14^o dia um quadro de diarreia crônica (DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2007).

Estima-se que no ano de 2015 as DDAs acometeram no mundo mais de 2,3 bilhões de indivíduos (GBD 2015 *Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators*) e causaram a morte de cerca de 500 mil crianças menores de cinco anos, e 1,3 milhão de pessoas de todas as idades, já no Brasil, segundo o mesmo estudo, cerca de 1,8 mil crianças menores de cinco anos e 6,3 mil pessoas de todas as idades morreram por tal doença (TROEGER; et al, 2017).

Segundo o Ministério da Saúde, no mesmo ano de 2015 4,2 milhões de pessoas foram afetadas em todo Brasil, incidência essa que varia de acordo com os anos, de acordo com o gráfico abaixo é possível verificar que a média dos últimos anos é de 4 milhões, porém esse número é variável (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Gráfico 1 – Incidência de DDA no Brasil.

Fonte: Ministério da Saúde, 2018.

As DDAs têm como principal fator de risco a ingestão de água e alimentos contaminados com fezes humanas ou animais, tal fator está relacionado com a falta de higiene e saneamento básico. Os números citados podem ser considerados alarmantes, uma vez que as DDAs podem ser prevenidas através da adoção de medidas de saneamento ambiental e higiene pessoal, e podem ser tratadas de forma adequada se o diagnóstico for rápido e eficiente, tais medidas são essenciais para reduzir a mortalidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

A não garantia da segurança microbiológica de alimentos e água destinada ao consumo humano é um dos fatores fortemente associados ao impacto negativo das DDAs, sendo este quesito de controle mais difícil, a depender de legislação e mecanismos de fiscalização e controle, que variam amplamente de um país para o outro (DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2007).

A intensidade dos sintomas, o prognóstico e as possíveis complicações e/ou sequelas que podem ser desencadeadas devido a um quadro de gastroenterite dependem fundamentalmente do agente etiológico e do estado de imunidade do paciente. Quadros clínicos associados às DDAs podem variar desde formas brandas de diarreia até manifestações exacerbadas como a colite hemorrágica ou a

disenteria bacilar. Síndromes extras intestinais potencialmente graves como a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), e a Síndrome de Guillain-Barré, destacam-se dentre as possíveis complicações associadas a um quadro de DDA e podem levar ao óbito ou a sequelas permanentes (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

4.2 AGENTES ETIOLÓGICOS

Diferentes agentes etiológicos, como bactérias, vírus e parasitas estão associados aos quadros de diarreia. Segundo o estudo *Global Burden of Disease Study*, feito por Christopher Troeger e colaboradores, os vírus, especialmente os rotavírus, são os principais causadores de casos de DDA em todo mundo. Entretanto, embora as diarreias por vírus sejam mais frequentes, as DDAs de etiologia bacteriana tendem a apresentar quadros clínicos mais graves e com maior taxa de letalidade. Sete são os agentes bacterianos de importância epidemiológica nas DDAs: *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Aeromonas spp.*, *Yersinia enterocolítica* e *Vibrio cholerae*.

4.2.1 *Escherichia coli*

E. coli é o anaeróbio facultativo mais abundante da microbiota gastrointestinal de diversas espécies de mamíferos de sangue quente. A maioria dos clones de *E. coli* apresenta uma relação de comensalismo com seu hospedeiro, entretanto, uma pequena proporção destes pode tornar-se patogênica através da aquisição de genes de virulência, por meio de mecanismos genéticos como conjugação, transformação e transdução fágica (MURRAY, et al., 2009). A estes clones patogênicos dá-se a denominação de *E. coli* diarreiogênica (DEC). Atualmente as cepas de DEC são classificadas em patotipos distintos, uma vez que o conhecimento acumulado ao longo dos anos sobre as DEC foi capaz de demonstrar que as estratégias de virulência empregas por estes patógenos para agredir o hospedeiro são diversas e apresentam em algumas situações especificidades genéticas e epidemiológicas. São reconhecidos seis patotipos de DEC: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* Difusamente Aderente (DAEC) (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). A importância clínica e epidemiológica do patotipo DAEC ainda não está totalmente estabelecida, de modo que para fins de

diagnóstico e vigilância este grupo não é considerado na maioria dos inquéritos realizados.

4.2.1.1 EPEC

O termo EPEC define cepas de *Escherichia coli* que possuem a capacidade de induzir na mucosa intestinal uma lesão histopatológica denominada lesão *attaching and effacing* (A/E). Além disso, atualmente a definição de EPEC preconiza que a cepa considerada deve ser também desprovida da capacidade de produzir as toxinas Shiga (Stx), característica esta que define o grupo das STEC, no qual alguns sorotipos podem também expressar o fenótipo A/E (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

A lesão A/E ocasiona a eliminação das microvilosidades intestinais devido a aderência íntima da bactéria à membrana do enterócito (célula intestinal), levando a distúrbios na absorção de nutrientes e a um processo inflamatório local que culminam com o quadro de diarreia. (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). Muitos estudos foram necessários para que se pudesse compreender o complexo mecanismo molecular envolvido neste fenótipo. Do ponto de vista genético mais de 30 genes localizados principalmente em ilhas de patogenicidade estão associados à lesão A/E, entretanto o gene *eae* pode ser considerado um dos mais importantes, e é atualmente o marcador genético de escolha para o diagnóstico laboratorial das EPEC.

EPEC é o principal agente bacteriano causador de diarreia em crianças menores de dois anos de vida em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). As infecções por este patotipo podem ser potencialmente fatais em lactentes. (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

4.2.1.2 EAEC

O termo EAEC relaciona-se a cepas de *E. coli* que possuem a capacidade de expressar o padrão de adesão agregativa (AA) quando em contato com células epiteliais cultivadas *in vitro*, como as linhagens HeLa e Hep-2 (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). No fenótipo AA, além de aderirem às células intestinais as bactérias unem-se umas às outras, lembrando tijolos empilhados, o que levou ao uso do termo “*stacked bricks*” em referência às EAEC. A patogênese das infecções

por EAEC tem como elemento central a capacidade de adesão bacteriana. Entretanto, a produção de enterotoxinas também possui uma participação no quadro clínico da doença.

O fenótipo AA favorece a persistência bacteriana no organismo hospedeiro, o que faz com que indivíduos portadores de EAEC possam apresentar diarreia crônica. Em pacientes portadores do vírus HIV em particular as infecções por EAEC podem adquirir um caráter de cronicidade importante do ponto de vista clínico. Embora inicialmente as EAEC ocorressem em maior frequência em países em desenvolvimento, atualmente o grupo já é apontado como um importante agente de diarreias em países desenvolvidos. Desta forma, as EAEC são consideradas enteropatógenos emergentes em todo mundo. Há estudos conduzidos recentemente que vêm implicando as EAEC em casos de infecções no trato urinário, especialmente em mulheres. (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

4.2.1.3. ETEC

O termo ETEC refere-se a cepas diarreiogênicas de *E. coli* que possuem a capacidade de produzir as enterotoxinas termolábil (LT) e termoestável (ST). As ETEC são consideradas um dos principais agentes causadores de diarreia em países em desenvolvimento, especialmente em países do sudeste asiático e em alguns países da África. Atribui-se às ETEC também a posição de principal agente causador da chamada diarreia do viajante, que acomete adultos residentes de países desenvolvidos que viajam para países em desenvolvimento onde a ocorrência da bactéria é endêmica (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

A patogênese das infecções por ETEC envolve a colonização do intestino delgado através de estruturas bacterianas denominadas fatores de colonização. Após este evento, a bactéria passa a liberar as toxinas LT e ST, que irão atuar e causar um profundo desequilíbrio no transporte de íons na célula intestinal, levando a perda de água para o lúmen do intestino. Este fato irá ocasionar a diarreia que é predominantemente aquosa, com apresentação clínica muito semelhante à diarreia relacionada à cólera.

A diarreia por ETEC requer um manejo rápido do quadro clínico, pois a perda de líquidos pode ser severa levando rapidamente à desidratação profunda. Um recente

estudo reportou que as ETEC são a principal causa de diarreia de gravidade moderada a severa com risco de morte em crianças menores de cinco anos de vida (PIRES; et al, 2015).

4.2.1.4. STEC

O termo STEC define cepas diarreioogênica de *E. coli* que possuem a capacidade de produzir as toxinas de Shiga (semelhante a toxina produzida pela *Shigella dysenteriae*); o termo *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) é empregado atualmente para designar um subgrupo das STEC composto pelos sorotipos mais virulentos, associados a quadros clínicos graves com complicações extra intestinais. A capacidade de produção das toxinas Stx pode ser considerada o principal mecanismo (embora não o único) na patogênese das infecções por STEC. As cepas de STEC estão ligadas a um amplo espectro de doenças em humanos, causando desde uma diarreia autolimitada leve, até diarreias sanguinolentas severas como a colite hemorrágica (CH), que pode evoluir para manifestações extra intestinais graves como a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU). Esta síndrome se caracteriza por falência renal aguda, distúrbios de coagulação e anemia hemolítica micro angiopática. A SHU pode ser letal em 5 a 10% dos casos ou deixar sequelas permanentes.

As STEC representam o patotipo de maior importância epidemiológica atualmente dentre os patotipos de DEC. Isto se deve ao fato de que além destes patógenos possuírem a capacidade de causar doenças muito graves e debilitantes, eles estão associados à cadeia alimentar produtiva, uma vez que animais bovinos, dos quais os humanos consomem amplamente a carne e o leite, constituem reservatórios naturais para estas bactérias. Questões de ordem econômica envolvendo perdas no setor agropecuário estão associadas ao patotipo STEC, o que faz com que estes patógenos representem um grande problema para a Saúde Pública em muitos países (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

4.2.1.5. EIEC

O termo EIEC define cepas de *Escherichia coli* que possuem a capacidade de invadir as células da mucosa intestinal. Esta propriedade invasora pode ser observada em modelo animal de ceratoconjuntivite empregado em cobaias, tendo

sido este teste por muitos anos o único disponível para a identificação da bactéria. EIEC é um importante agente de diarreia tanto em crianças como em adultos. (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). Sua ocorrência é universal e frequentemente o patógeno é implicado em grandes surtos.

A diarreia produzida por EIEC ocorre devido multiplicação bacteriana no ambiente intracelular, o que elícita uma forte resposta inflamatória por parte do organismo do hospedeiro. Este mecanismo de defesa é também responsável por danos histopatológicos na mucosa intestinal e está associado à produção de sintomas de forte intensidade, e em muitos casos febre e prostração. (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

4.2.2 *Shigella*

O gênero *Shigella* compreende quatro espécies distintas: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonnei*, (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

As espécies de *Shigella* causam uma doença denominada shigelose, de modo semelhante à patogênese das infecções por EIEC. (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). A *Shigella* e a EIEC são patógenos altamente relacionados, e por este motivo em muitas situações não podem ser diferenciadas, nem mesmo por técnicas moleculares, uma vez que o conteúdo genético destas bactérias apresenta uma homologia superior a 90%. A diferenciação se dá apenas por extensas baterias de testes bioquímicos através dos quais é possível a detecção do fenótipo patoadaptativo para o qual a *Shigella* é positiva e a EIEC não (CDC, 2018).

Assim como a EIEC, a *Shigella* é de ocorrência universal, acometem tanto crianças como adultos e podem estar associadas a grandes surtos de diarreia. Um aspecto importante relacionado a este patógeno é que a *Shigella* vem se tornando cada vez mais resistente aos antimicrobianos, o que pode futuramente trazer problemas para o tratamento das infecções por este patógeno (CDC, 2018).

4.2.3 *Yersinia enterocolítica*

Embora o gênero *Yersinia* compreende 18 espécies, as principais, patogênicas ao homem, são: *Y. pestis* e *Y. enterocolítica*. A *Y. pestis* é o agente da peste bubônica, já a *Y. enterocolítica* causa uma forma autolimitada de

gastroenterite (yersiniose). A virulência das espécies está relacionada com o plasmídeo pYV, responsável pela codificação de diversas proteínas capazes de conferir à bactéria a capacidade invasora e de resistência ao sistema imune do hospedeiro mas a *Y.enterocolitica* é a única capaz de produzir a enterotoxina denominada Yst (Yersinia stable toxin), codificada pelo gene Yst (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

A diarreia causada por ambas as espécies pode conter leucócitos e sangue, e é associada a dor abdominal e febre, sendo considerada uma doença autolimitada, que dura em média 14 dias (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

4.2.4 *Campylobacter*

O gênero *Campylobacter* compreende 25 espécies, entretanto duas destas acometem mais frequentemente o homem: *C. jejuni* e *C. coli*, afetando principalmente crianças e jovens adultos. Em países desenvolvidos atualmente a ocorrência de surtos de campilobacteriose vem sendo frequentemente relatada, indicando que este patógeno pode ser considerado emergente. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A patogenia da diarreia causada por *Campylobacter* foi mais bem estudada em *C. jejuni*, e costuma ser autolimitada, com duração média de sete dias. O mecanismo exato de atuação da bactéria não está satisfatoriamente esclarecido, embora os achados experimentais indiquem que um forte processo inflamatório ocorre na mucosa intestinal em função da presença bacteriana, sugerindo uma capacidade invasora. Pacientes imunocomprometidos podem desenvolver a Síndrome de Guillain-Barré (GBS), um distúrbio autoimune grave que afeta o sistema nervoso e gera fraqueza muscular, podendo levar a sequelas permanentes e significativa perda da qualidade de vida em indivíduos afetados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Campylobacter jejuni subespécie *jejuni* é considerada a espécie mais virulenta por apresentar, além de uma provável capacidade invasora, maior resistência a fagocitose. A diarreia por esta espécie tende a ser mais grave (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

4.2.5 *Salmonella*

As espécies de *Salmonella* patogênicas para o homem são taxonomicamente divididas em duas: *S. entérica* e *S. bongori*, porém a nomenclatura mais utilizada é baseada em sorovares, e os principais são: *S. Typhi*, *S. Paratyphi*, *S. Typhimurium*, *S. Dublin*, e *S. Enteritidis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A patogenicidade do gênero está relacionada a diversos mecanismos de virulência que permitem a invasão celular, produção de citotoxinas e enterotoxinas, e que podem acarretar em infecções sistêmicas como a febre tifoide, febre entérica e gastroenterites (salmonelose) moderada, sem presença de sangue ou sangue oculto nas fezes, podendo ser acompanhada de febre e cólica abdominal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

4.2.6 *Aeromonas*

O gênero *Aeromonas* é dividido em diversas espécies, porém as principais, patogênicas para o homem são: *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* bv. *sobria* (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

A patogenicidade do gênero está relacionada a diversos fatores de virulência como os flagelos, pili, cápsula, proteínas de membrana externa, além da produção de substâncias extracelulares (enterotoxinas, hemolisinas/aerolisinas, citotoxinas, DNases, elastases, lecitinases, amilases, proteases e lipases) que acarretam em infecções de pele, sepse, infecções extra intestinais, e gastroenterite (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). A gastroenterite é autolimitada com diarreia sem sangue nas fezes, ou presença de sangue e muco em casos mais graves, que pode ser acompanhada de febre, dor abdominal, náusea e vômito, que pode durar de 2 a 10 dias (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

4.2.7 *Vibrio*

O gênero *Vibrio* tem como sua principal espécie representante o *V. cholerae*, bastonete levemente curvo, que possui flagelo polar e causa a cólera (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

A patogenicidade do *V. cholerae* esta relacionada com a produção da toxina colérica (CT) e com o fator de colonização TCP (*toxin co-regulated pilus*). Essa

toxina gera diarreia profusa, sem muco ou sangue, podendo apresentar aspecto riziforme (“água de arroz”) que pode ser acompanhada de vômitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A diarreia e vômito são as manifestações mais frequentes, e podem ser acompanhadas de febre, em 90% dos casos os sintomas são leves, porém em 10% a diarreia é aquosa, abundante e incoercível, tal perda de água e eletrólitos corporais, causada pela ligação da CT à superfície de enterócitos, pode levar a desidratação severa, acidose, colapso circulatório e a morte (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

4.3 Métodos de identificação de enteropatógenos

Os enteropatógenos bacterianos citados envolvidos em surtos e casos esporádicos de diarreias/gastroenterites podem ser pesquisados através de métodos fenotípicos tradicionais, que são métodos de referência e obrigatoriamente requerem a cultura de material clínico para isolamento da bactéria, ou através de metodologias independentes de cultivo, que empregam ferramentas moleculares (PEREIRA; PETRECHEN, 2011).

4.3.1. Métodos dependentes de cultura

A cultura consiste no crescimento de determinado micro-organismo em um meio que apresenta condições suficientes para o seu desenvolvimento, necessitando de um meio adequado para as necessidades de cada enteropatógeno. Tal técnica permite o isolamento do possível agente etiológico frente a uma cultura mista, após dois repiques para confirmar a pureza. A cultura permite a identificação de certas cepas de bactérias, entretanto a maioria requer outras provas para a sua diferenciação, como: série bioquímica com açúcares, citrato de Simmons, malonato de sódio, vermelho de metila (VM), Voges-proskauer (VP), redução de nitrato, produção de H₂S, hidrólise da gelatina, produção de indol, motilidade, descarboxilação da lisina, entre outros, a partir da cultura também é possível realizar sua caracterização detalhada através da determinação de propriedades antigênicas, e do perfil de susceptibilidade a agentes antimicrobianos, que são de fundamental importância para a vigilância epidemiológica (MANDAL, et al., 2011).

Tais técnicas ao todo demoram em média 10 dias para liberação dos resultados, utilizam diversos meios de cultura e de reagentes para análise bioquímica, em casos de laboratórios sem automação. (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004). Já em laboratórios que necessitam de resultados mais rápidos porque abrangem uma grande quantidade de exames, e por possuírem maior investimento, tais metodologias são realizadas com kits para identificação de micro-organismos, que facilitam o processo (CARBONNELLE, 2011).

Entretanto, todos os métodos citados dependem de cultivo, e apresentam uma certa sensibilidade e especificidade, são de fácil interpretação, baratos e eficientes, porém são processos lentos que em certas situações não conseguem recuperar as células quando estão estressadas, pois requerem a integridade da bactéria. Em casos de micro-organismos fastidiosos que exigem grande quantidade de nutrientes, como as bactérias *Campylobacter* e *Shigella*, o que contribui para que a real prevalência de determinados enteropatógenos seja subestimada, e em casos de bactérias com o crescimento mais lento, podem gerar um falso negativo, (COCOLIN, et al., 2011). Além de que a extensa série de técnicas torna o processo de identificação trabalhoso e sujeito a erros humanos e a contaminação cruzada (MANDAL, et al., 2011).

4.3.2. Métodos independentes de cultura

Métodos alternativos são aqueles considerados independentes do cultivo, e utilizam ferramentas de biologia molecular para a identificação bacteriana, através da especificidade de genes de virulência contidos nos ácidos nucleicos. Estas metodologias surgiram no final dos anos 80, graças aos avanços na pesquisa que permitiram elucidar de forma mais específica os mecanismos de patogenicidade envolvidos na interação dos enteropatógenos bacterianos com o hospedeiro, e quais genes eram responsáveis pela produção destes mecanismos. Estes genes foram mapeados, caracterizados e passaram a ser usados como marcadores laboratoriais altamente específicos. Desde então os métodos moleculares vêm revolucionando o diagnóstico microbiológico e contribuindo para que o Laboratório de Microbiologia possa desempenhar de forma cada vez mais satisfatória o seu papel no enfrentamento de doenças de impacto para a Saúde Pública como as doenças de transmissão alimentar e hídrica (WATSON, et al., 2015).

As principais metodologias independentes de cultivo disponíveis atualmente para o diagnóstico e vigilância laboratorial dos patógenos citados incluem (Quadro 1): técnicas de hibridização de ácidos nucleicos, a Reação em cadeia de polimerase (PCR) e o Sequenciamento de DNA, que engloba tanto o sequenciamento de Sanger como os métodos de sequenciamento de nova geração, capazes de sequenciar em larga escala genomas inteiros de patógenos, incluindo os enteropatógenos bacterianos.

4.3.2.1. Técnica de hibridização

A técnica de hibridização ou sonda genética deu origem a diversas técnicas, como o método de *Southern Blot*, criado por Edwin Southern, e visa a localização de regiões específicas do DNA, utilizando sondas marcadas, que são sequências conhecidas que hibridizam apenas com a sequência de DNA complementar desejada. Em tal técnica fragmentos de DNA, digeridos por enzimas restritivas, são separados por eletroforese e imobilizados em membrana, sendo esta posteriormente tratada com a sonda marcada por átomos radioativos, ou por corantes fluorescentes ou cromogênicos. A sonda que é específica para o alvo desejado, então pareia apenas na região de homologia na amostra em análise, se a região estiver presente. (WATSON, et al., 2015).

Em estudo realizado por Danbara; et al, em 1987, ficou evidenciado a importância da técnica de *Southern Blot* para determinar que diferentes linhagens de *E.coli* causadora de diarreia, presentes em 10 países distintos, foram derivadas de três clones. Tal ponto é essencial para estudos epidemiológicos e para o controle adequado da DDA.

Anupama; et al, em 2019, demonstrou que sondas marcadas são altamente sensíveis para identificar e diferenciar cepas patogênicas e não patogênicas de *Vibrio parahaemolyticus*, sendo, portanto, um ganho em relação aos métodos tradicionais que são trabalhosos, demorados e menos sensíveis.

4.3.1 PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*), desenvolvida por Karry Mullis, é uma técnica que necessita de uma quantidade ínfima de amostra de DNA, e consiste na amplificação *in vitro* de regiões gênicas

específicas, através da síntese enzimática, permitindo um resultado qualitativo que é visualizado após eletroforese e coloração de gel de agarose (ZARA, 2014).

A partir dessa técnica surgiu a PCR multiplex, que possibilita a amplificação de diferentes alvos em uma única reação através da utilização de diversos primers, que atuam como pequenas sondas para alvos específicos (ZARA, 2014).

Atualmente existem diversos protocolos de PCR multiplex que visam diminuir o tempo e o custo do processo de identificação de enteropatógenos como os painéis para diagnóstico de infecção gastrointestinal Luminex xTag (GPP), liberado em 2013 pelo FDA (*Food and Drug Administration*), permitindo identificar simultaneamente três vírus, três parasitas, e nove bactérias, em um sistema aberto, que tem como desvantagem a possível contaminação; *FilmArray gastrointestinal*, liberado em 2014 pelo FDA, permitindo identificar cinco vírus, quatro parasitas e 13 bactérias, em um sistema fechado que evita contaminação cruzada; e Verigene EP, liberado também em 2014 pelo FDA, e permitindo identificar cinco bactérias e dois vírus, também em sistema fechado (BINNICKER, 2015).

Segundo Khare; et al (2014), após uma comparação entre PCR multiplex e métodos dependente de cultura, para detecção de patógenos gastrointestinais, notou-se que a PCR possui vantagens pois apresenta especificidade maior que 96% e a sensibilidade superior a 90%, em relação à cultura, além de conseguir detectar mais precisamente coinfeção, e de possibilitar um resultado rápido.

Fiedoruk; et al (2015), ao comparar métodos convencionais e moleculares, para o diagnóstico de diarreia em crianças menores de cinco anos no nordeste da Polônia, concluiu que a PCR em relação a métodos dependentes de cultura, aumentou a frequência geral de detecção dos enteropatógenos bacterianos em cerca de 4%.

A PCR foi um marco na biologia molecular pois proporciona um fluxo de trabalho mais simples, detecta coinfeção, utiliza uma menor quantidade de amostra, aumenta a positividade, e por aumentar a especificidade e sensibilidade, e por proporcionar resultados mais rápidos, permite o tratamento adequado, preciso e veloz. Devido as vantagens citadas, um estudo realizado por James; et al (2014),

recomenda a utilização da PCR para estudos epidemiológicos nas infecções por *Campylobacter spp.*

4.3.3. PCR em tempo real

A PCR em tempo real (q-PCR) é uma evolução da PCR convencional, que permite resultados qualitativos e quantitativos, a partir do uso de primers e de sonda complementar a região alvo do DNA, marcada com uma molécula fluorescente. Associando a técnica da PCR convencional com um sistema de detecção e quantificação da fluorescência durante a amplificação, é possível acompanhar o processo em tempo real (ZARA, 2014).

Segundo Elfving et al (2014), a PCR em tempo real apresenta inúmeras vantagens como maior especificidade e sensibilidade, e por gerar um resultado quantitativo é necessário avaliar o *cycle of threshold* (CT) de cada patógeno para diferenciar pacientes assintomáticos e sintomáticos, e para determinar se tal patógeno é responsável por causar a doença diarreica aguda.

Eigner (2017), demonstrou que a principal vantagem da técnica é a sua alta especificidade e sensibilidade, chegando até 100% para detecção direta de *Escherichia coli*, sendo, portanto, superior a PCR convencional.

A técnica de q-PCR vem contribuindo de forma importante para o diagnóstico das DDAs por ser mais sensível e específica, por gerar resultados mais rápidos e por ter uma menor chance de contaminação, pois o produto amplificado não precisa ser manuseado.

4.3.4. Sequenciamento

O sequenciamento é uma técnica que tem como finalidade determinar a sequência exata de nucleotídeos de uma região do DNA. A princípio era realizado através do método de degradação química, e posteriormente Sanger, et al., desenvolveram o método de terminação de cadeia, seguido do pirosequenciamento, sequenciamento por síntese e sequenciamento enzimático (CULLUM, 2011).

Atualmente surgiram novas metodologias, conhecidas coletivamente como sequenciamento de nova geração (NGS- *Next Generation Sequencing*). Tais técnicas são desenvolvidas automaticamente, e possuem características

semelhantes, como: realizam múltiplos sequenciamentos ao mesmo tempo, tornam a interpretação mais simples, rápida e menos custosa (CULLUM, 2011). O principal diferencial das técnicas de sequenciamento de nova geração em relação ao sequenciamento de Sanger reside na alta capacidade de processamento de dados, o que permite um genoma inteiro possa ser identificado em cerca de 48/72 horas.

Nobrega (2012), ao realizar um estudo comparativo de identificação bacteriana por métodos fenotípicos como provas bioquímicas e por sequenciamento, constatou que o sequenciamento permitiu a identificação correta de 97% das bactérias, enquanto bioquimicamente apenas 70,5% foram identificadas, indicando assim o aumento da sensibilidade e especificidade.

O sequenciamento é uma metodologia que possibilita um resultado extremamente preciso para diagnosticar as DDAs, e comparar microrganismos envolvidos em surtos. Com o surgimento das técnicas de nova geração melhorias essenciais para o uso da técnica de sequenciamento em rotina estão aos poucos sendo implementadas e o resultado tem sido um expressivo aumento na detecção e caracterização detalhada de patógenos e rastreamento de surtos (WATSON, et al., 2015).

Técnica	Características					
	Rapidez	Resultado quantitativo	Resultado qualitativo	Sensibilidade/Especificidade	Risco de contaminação	Custo
Dependente de cultura	Lento	Não	Sim	Moderada	Alto	Baixo
Southern Blot	Moderado	Não	Sim	Alta	Moderado	Moderado
PCR	Moderado	Não	Sim	Alta	Moderado	Moderado
PCR em tempo real	Rápido	Sim	Sim	Alta	Baixo	Moderado a Alto
Sequenciamento	Rápido	Não	Sim	Alta	Baixo	Alto

Quadro 1 – Principais características das técnicas utilizadas para diagnóstico das DDAs.

As metodologias dependentes de cultura são essenciais para caracterização de enteropatógenos e ainda são consideradas o padrão ouro para identificação de diversas bactérias, em alguns casos só é possível diferenciar gêneros ou espécies

através de testes bioquímicos, como a *Shigella* e a EIEC. Porém devido a resultados demorados, menos sensíveis e específicos, sujeitos a contaminação e a erro humano, surgiu a necessidade de desenvolver novas técnicas para identificação bacteriana.

Tais técnicas foram denominadas de métodos alternativos independentes de cultura, que teve início com o surgimento das sondas de DNA, PCR e suas variantes, e sequenciamento, todas as técnicas permitiram resultados mais sensíveis, específicos, rápidos e confiáveis, que acarretam em um tratamento eficaz e veloz do paciente, e na contenção da disseminação da bactéria, além de permitir a identificação de bactérias que não são cultiváveis, ou que a identificação só é possível por biologia molecular.

Já existe um relato de que avaliando como um todo, quantidade de dias que o paciente fica internado, medicamentos utilizados, e técnicas realizadas, os métodos alternativos como PCR e PCR em tempo real, mesmo sendo mais custosos que os tradicionais, saem mais baratos (BINNICKER, 2015). Porém ainda não foi realizado nenhum estudo avaliando e comparando o custo efetivo entre técnicas dependentes e independentes de cultura, mesmo sabendo que tal informação é essencial para a Saúde Pública, pois além de proporcionar resultados mais rápidos e precisos, se bem utilizadas as novas metodologias podem diminuir os custos com a saúde.

5. CONCLUSÃO

As metodologias citadas são fundamentais para o diagnóstico de diversas doenças, porém ainda necessitam de melhorias, pois algumas não são automatizadas, possibilitando erro humano e contaminação, todas precisam de um conhecimento prévio da região a ser analisada, e a presença de inibidores ainda é um grande problema na execução. Porém é notória a evolução da biologia molecular desde a década de 80 em relação à identificação de enteropatógenos, proporcionando resultados mais rápidos, específicos e sensíveis que as técnicas dependentes de cultivo, o que é fundamental para o diagnóstico ágil das doenças diarreicas agudas e para realização de um tratamento adequado, que pode diminuir significativamente o número de mortes por DDA, pois como citado, as DDAs causaram, só em 2015, a morte de 1,3 milhão de pessoas no mundo, evoluindo de diarreia autolimitada leve para diarreia crônica ou outras síndromes extra intestinais que podem levar a morte.

6. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**. Módulo V, 2004.

ANDREOLI, S. et al. **Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology and therapy**. *Pediatr Nephrol*. 2002; 17(4): 293-8.

ANUPAMA, K. et al. **Comparative performance of TCBS and TSA for the enumeration of trh+ *Vibrio parahaemolyticus* by direct colony hybridization**. *Journal of Microbiological Methods*, 2019.

BINNICKER, M. **Multiplex molecular panels for diagnosis of gastrointestinal infection: performance, result interpretation, and cost-effectiveness**. *American Society for Microbiology Journals*, 2015.

BURCKHARDT, I.; ZIMMERMANN, S. **Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry To Detect Carbapenem Resistance within 1 to 2.5 Hours**. *American Society for Microbiology Journals*, 2011.

CARBONNELLE, E. et al. **MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory**. *Clin Biochem*. 2011;44(1):104–109.

CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). **Shigella – Shigelose**. Atualizado em: janeiro de 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/shigella/index.html>>. Acesso em: 06 janeiro de 2019.

CULLUM, R.; ALDER, O.; HOODLESS, P. **The next generation: using new sequencing technologies to analyse gene regulation**. *Respirology*, v. 16, p. 210-222, 2011

CZECZULIN, J. R. et al. **Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli***. *Infect. Immun.*, v. 67, p. 2692-2699, 1999.

DANBARA, H. et al. **Analysis of the plasmids of *Escherichia coli* O148:H28 from travellers with diarrhea**. *Microb Pathog*. 1987;3(4):269-78.

DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Manual de diagnóstico e tratamento de doenças diarreicas agudas.** Santa Catarina, 2007.

EIGNER, U. et al. **Evaluation of a new real time PCR assay for the direct detection of diarrheagenic Escherichia coli in stool specimens.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. Volume 88, Pages 12-16, 2017.

ELFVING, K. et al. **Real-time PCR threshold cycle cutoffs help to identify agents causing acute childhood diarrhea in Zanzibar.** American Society for Microbiology Journals, 2014.

FIEDORUK, K. et al. **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 Journal of Infectious Diseases, 2015.

GIRÓN, J. **An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic Escherichia coli.** Science 254: 710-713, 1991.

HARRINGTON, S.; DUDLEY, E.; NATARO, J. **Pathogenesis of enteroaggregative Escherichia coli infection.** FEMS Microbiol. Lett., v. 254, p.12-18, 2006.

JAME, A. et al. **Detection of *Campylobacter* in Stool and Determination of Significance by Culture, Enzyme Immunoassay, and PCR in Developing Countries.** American Society for Microbiology. Virginia, 2014.

KHARE, R. et al. **Comparative evaluation of two commercial multiplex panels for detection of gastrointestinal pathogens by use of clinical stool specimens.** American Society for Microbiology Journals, 2014.

MAAS, RENATA. **An improved Colony Hybridization Method with Significantly Increased Sensitivity for Detection of Single Genes.** Plasmid 10, 1983.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Campylobacter*.** 1.ed. Brasília, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial da *Salmonella* spp.** 1.ed. Brasília, 2011

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual integrado de vigilância epidemiológica da cólera**. 2.ed. Brasília, 2010

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças diarreicas agudas Brasil**. Brasília, 2018.

MOBOLAJI, A. et al. **Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, p.5575-5599, Canada, 2016.

MORA, A. et al. **Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin) producing Escherichia coli O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain**. Res Microbiol. 2005; 156:793-806.

MULLIS, KARY BANKS. **Polymerase chain reaction**. Disponível em <<http://www.karymullis.com/pcr.shtml>>. Acesso em: 06 novembro de 2018.

MURRAY, P. et al. **Microbiologia médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2009. 4393 p.

NATARO, J.; STEINER, T.; GUERRANT, R. **Enteroaggregative Escherichia coli**. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 4, p. 251-261, 1998.

NATARO, J. et al. **Patterns of adherence of diarrheagenic Escherichia coli to HEp-2 cells**. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 16, p. 829-831, 1987.

NATARO, J. et al. **AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative Escherichia coli**. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 4691-4699, 1994.

NATARO, J. P.; KAPER, B. **Diarrheagenic Escherichia coli**. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 1, p. 142-201, Jan. 1998.

NOBREGA, L. **Estudo da diversidade bacteriana de canais radiculares infectados em casos de abscesso apical agudo por cultura, clonagem e sequenciamento do gene 16S rRNA**. Universidade Estadual de Campinas, 2012.

PEREIRA, R; PETRECHEN, G. **Principais métodos diagnósticos bacterianos – Revisão de literatura.** Revista científica eletrônica de medicina veterinária. Número 16, Janeiro, 2011.

PIRES, SARA, et al. **Aetiology-Specific Estimates of the Global and Regional Incidence and Mortality of Diarrhoeal Diseases Commonly Transmitted Through Food.** PLoS One 2015.

RUIZ-PALACIOS, G. et al. **Cholera-like enterotoxins produced by Campylobacter jejuni: Characterization and clinical significance.** Lancet, London, v. 2, p. 250-252, 1983.

TORTORA, G. et al. **Microbiologia.** 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 935 p.

TRABULSI, L.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** 6.ed. São Paulo: Atheneu, 2015. 888 p.

TROEGER, C. et al. **Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015.** P. 1-40. Jan, 2017.

VOS, T. et al. **Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015.** P. 1545-1602. Out, 2016.

WATSON, J. et al. **Biologia molecular do gene.** Artmed. 7 ed. 2015. Porto Alegre

ZAHA, A.; FERREIRA, H.; PASSAGLIA, L. (Org.). **Biologia molecular básica.** 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014