

Escherichia coli



Fonte: www.harbinson.fslife.co.uk

***Escherichia coli* X Humanos**

- ✓ TGI recém-nascidos
- ✓ Membro da microbiota intestinal

Problemas { imunocomprometidos
falhas barreiras gastrointestinais

E. coli: boa ou má?

- Inócuas
 - ❖ Maioria
 - ❖ Comensais
 - ❖ Auxiliam a digestão
 - ❖ Síntese de vitaminas

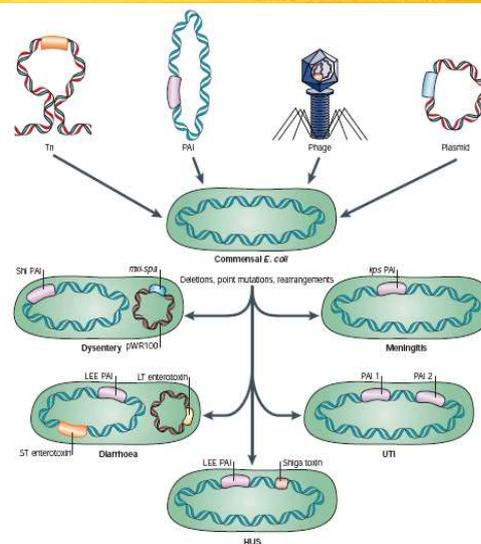
E. coli: boa ou má?

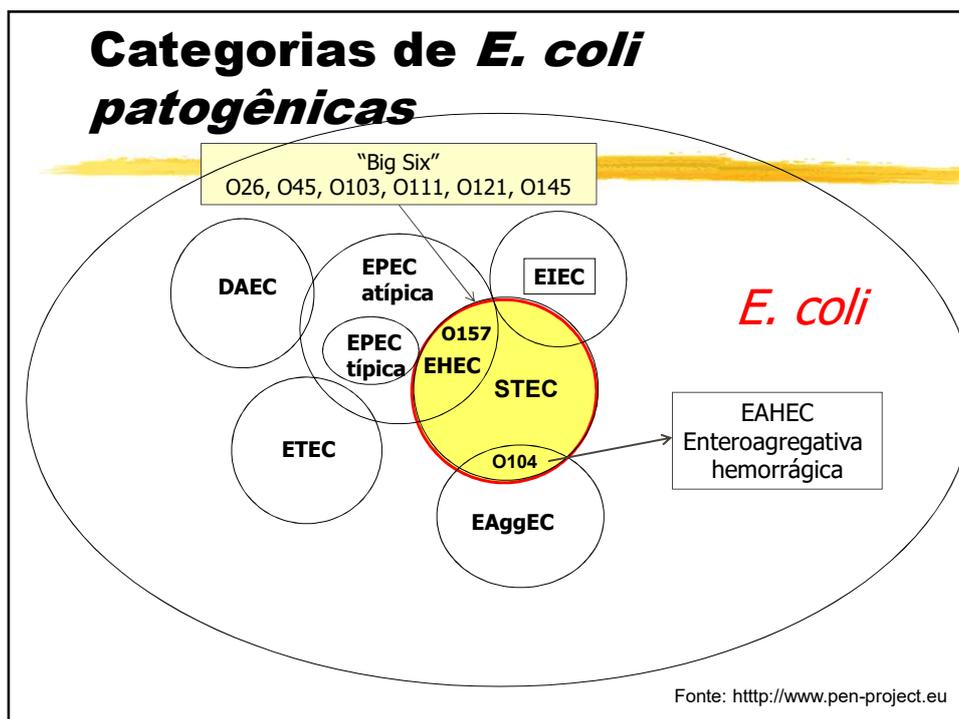
- Inócuas
 - ❖ Maioria
 - ❖ Comensais
 - ❖ Auxiliam a digestão
- Patogênicas
 - ❖ Trato urinário
 - ❖ Sangue
 - ❖ Meninges
 - ❖ Trato intestinal

***E. coli* em alimentos**

- ✓ Contaminação fecal

Obtenção de elementos genéticos móveis: fatores de virulência





Classificação *E. coli*

- Antígenos

✓ O – somático★
• 173

www.its.caltech.edu

Classificação *E. coli*

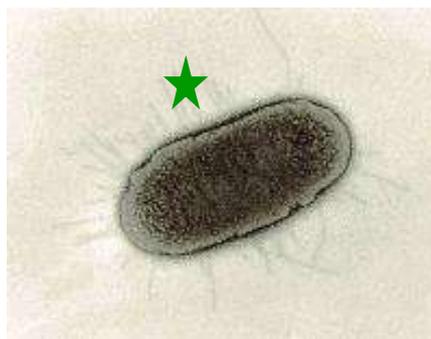
- Antígenos

✓O – somático

• 173

✓H – flagelar ★

• 56



www.its.caltech.edu

Classificação *E. coli*

- Antígenos

✓O – somático

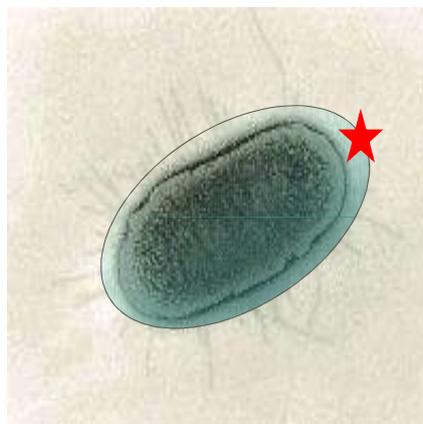
• 173

✓H – flagelar

• 56

✓K – capsular ★

• 103



www.its.caltech.edu

Patotipos de *Escherichia coli*

- ✓ *E. coli* enterotoxigênica (ETEC - *Enterotoxigenic E. coli*)
- ✓ *E. coli* enteropatogênica (EPEC - *Enteropathogenic E. coli*)
- ✓ *E. coli* enteroinvasora (EIEC - *Enteroinvasive E. coli*)
- ✓ *E. coli* de adesão difusa (DAEC - *Diffusely Adherent E. coli*)
- ✓ *E. coli* enteroagregativa (EAEC - *Enteroggregative E. coli*)
- ✓ *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC – *Shiga toxin-producing E. coli*)



ETEC

- Diarreia dos viajantes
- Sintomatologia
 - ❖ Diarreia aquosa com pouca ou nenhuma febre
- Fatores de virulência
 - ❖ Toxinas
 - LT: similar em tamanho (86 kDa), sequência, antigenicidade, e função à toxina da colera (CT)
 - ST: baixo peso molecular (4 kDa), resistente à fervura por 30 min.

ETEC

- Fatores de virulência
 - ❖ Toxinas
 - LT
 - ST
 - Várias variants
 - ST1a ou STp: *E. coli* isoladas tanto de humanos como animais
 - ST1b ou STh predomina no isolados humanos

E. coli enterotoxigênica (ETEC)

- ✓ Dose infecciosa
 - ✓ adultos: 10^8 cells
 - ✓ jovens, idoso e enfermos: suscetibilidade a níveis mais baixos
- ✓ Transmissão: água/alimentos
- ✓ Alimentos incriminados:
 - Fórmula infantil
 - Saladas com vegetais crus
 - Queijos moles
 - Alimentos tipo mexicano
 - Rosbife
 - Carne de caranguejo
 - Gelo

ETEC

- Populações elevadas de *E. coli*
 - ❖ Produção de LT em células Y-1 (adrenal) sorológica por kits (ELISA e aglutinação em latex)
 - ❖ Produção de ST detectada por ELISA ou teste em camundongo
- PCR
 - ❖ Detecção de genes codificadores para as toxinas

***E. coli* enteropatogênica (EPEC)**

- ✓ Diarréia aquosa profusa em crianças;
- ✓ Países desenvolvidos;
- ✓ Virulência
 - ✓ Lesão *attachment and effacement* (A/E)
 - ✓ Fator de aderência de EPEC
 - ✓ aderência localizada da bactéria nas células intestinais

***E. coli* enteropatogênica (EPEC)**

- ✓ Diarréia aquosa profusa em crianças;
- ✓ Países desenvolvidos;
- ✓ Virulência
- ✓ Dose infecciosa: 10^6 cél.
- ✓ Alimentos
 - ✓ água e alguns produtos cárneos

***E. coli* enteroinvasora (EIEC)**

- ✓ Diarréia não sanguinolenta e disenteria semelhante à *Shigella* spp.
- ✓ Invasão e proliferação → células epiteliais do cólon → morte celular
- ✓ Dose infecciosa: 10^6 cél.
- ✓ Fonte primária: pacientes

***E. coli* enteroinvasora (EIEC)**

- ✓ Testes de invasão em células HeLa
- ✓ PCR

***E. coli* de adesão difusa (DAEC)**

- ✓ Diarréia em crianças maiores;
- ✓ Diarréia branda não sanguinolenta;
- ✓ Padrão difuso de aderência.

***E. coli* enteroagregativa (EAEC)**

- ✓ Diarréia persistente em crianças;
- ✓ Padrão agregativo de aderência.

Some properties and symptoms associated with pathogenic *E. coli* subgroups.

Properties/Symptoms	ETEC	EPEC	EHEC	EIEC
Toxin	LT/ST ^a	-	Shiga or Vero toxin (Stx or VT)	-
Invasive	-	-	-	+
Intimin	-	+	+	-
Enterohemolysin	-	-	+	-
Stool	Watery	Watery, Bloody	Watery, very bloody	Mucoid, bloody
Fever	Low	+	-	+
Fecal leukocytes	-	-	-	+
Intestine involved	Small	Small	Colon	Colon, lower small
Serology	Various	O26, O111 & others	O157:H7, O26, O111 & others	Various
I _D ^b	High	High	Low	High

^a LT, labile toxin; ST, stable toxin.

^b I_D, infective dose.

***E. COLI* PRODUTORA DE TOXINA DE SHIGA**

Patogenicidade de STEC

✓ Toxinas de Shiga 1 e 2/Verotoxinas 1 e 2

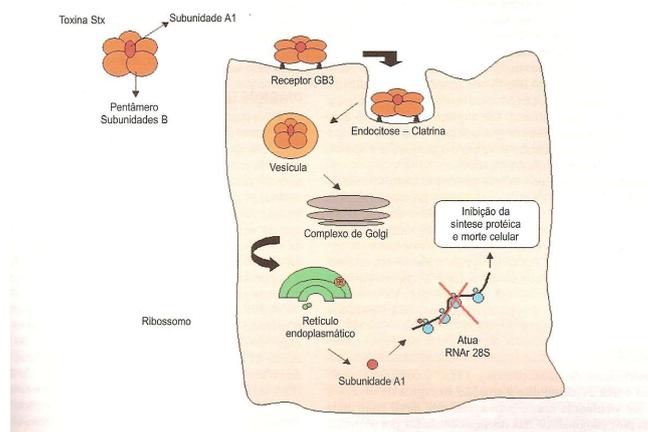
✓ Célula Vero rim de macaco verde

Stx1/Vt1 → Homologia

Stx2/Vt2 { Heterogenicidade
+ virulenta

Patogenicidade de STEC

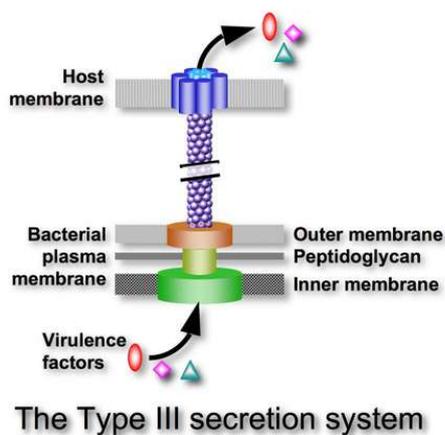
Estrutura e ação das citotoxinas Stx



Fonte: Trabulsi e Alterthum, 2008

Patogenicidade de STEC

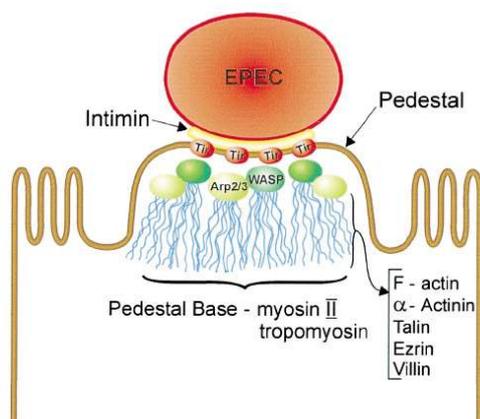
Sistema de Secreção Tipo III



Fonte: <http://carbon.bio.ku.edu/research.htm>

Patogenicidade de STEC

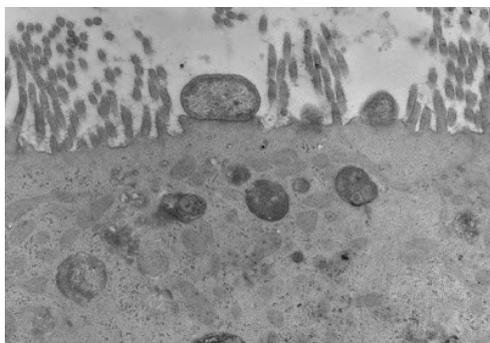
Lesão *attachment and effacement* EPEC e STEC



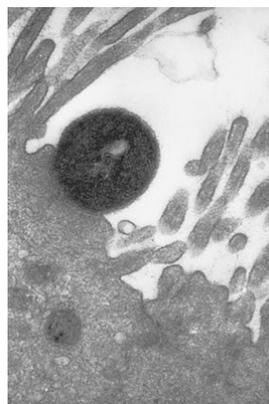
Fonte: <http://2008.igem.org/Team:NYMU-Taipei/Project/Attachment>

Lesão *attachment and effacement*

EPEC e STEC



Fonte: <http://gastropednutri.blogspot.com/2010/09/diarreia-persistente-uma-guerra-cujo.html>



Fonte: <http://www.blogger-index.com/feed315213.html>

Patogenicidade de STEC

Produção de enterohemolisina



Lise eritrócitos



Acesso ao Fe

www.youtube.com/watch?v=gnNFNI9_pT0

E. coli produtora de toxina de Shiga (STEC)

- ✓ Surtos (Oregon e Michigan, 1982)

E. coli O157:H7

- EUA
- Canadá
- Japão
- Reino Unido



STEC não-O157:H7

- O103
- O111
- O145
- O26
- Argentina
- Brasil
- Chile
- Europa
- Austrália

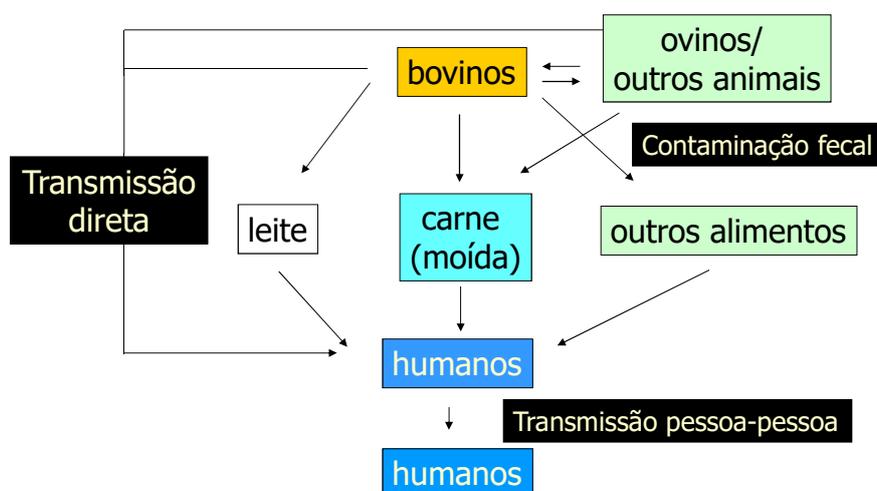
Porque é difícil encontrar STEC O157?

- Crescimento fraco a 44,5 – 45°C
- Não fermentam sorbitol em 24h
- Não apresentam atividade β -glucuronidásica
- Produção de enterohemolisina a 25°C

Características gerais de STEC

- Principal reservatório
 - ❖ Animais
 - Gado bovino; animais silvestres
 - ❖ Isolado de animais sadios ou doentes
 - ❖ Mais comum em bezerros que em animais adultos
 - ❖ Prevalência em rebanhos EUA e Europa
 - <1% a 38%
 - Sazonal
 - > prevalência nos meses quentes

Reservatórios e modo de transmissão de STEC



STEC

- População suscetível
 - ❖ Crianças < 10 anos
 - ❖ Idosos
 - ❖ Indivíduos imunodeficientes

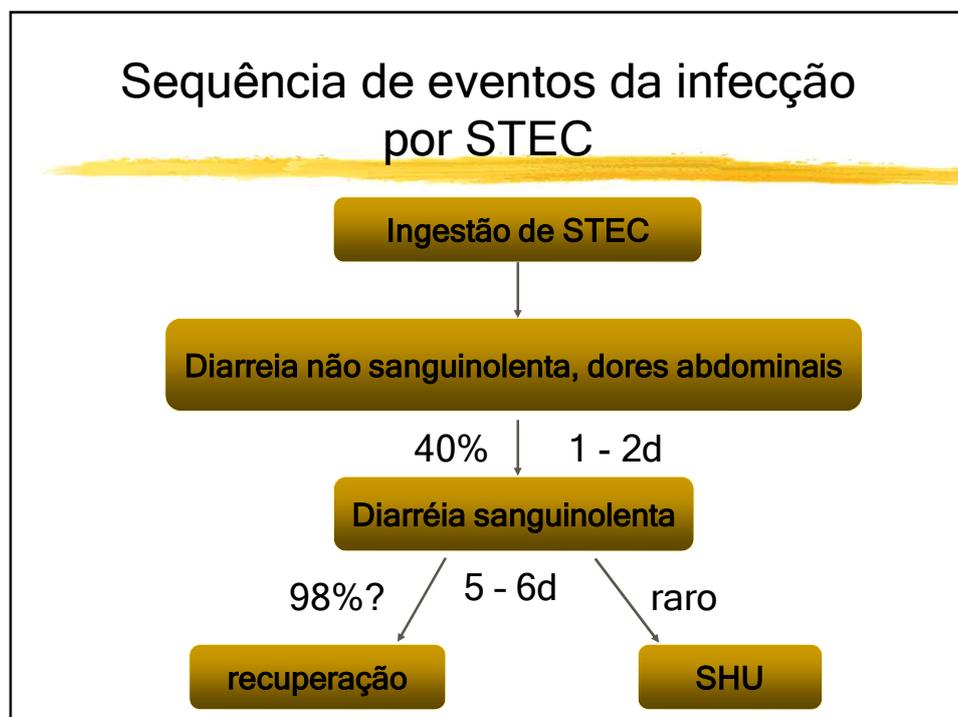
STEC

- Síndromes
 - ❖ Diarréia não sanguinolenta
 - ❖ Diarréia sanguinolenta
 - ❖ Colite hemorrágica

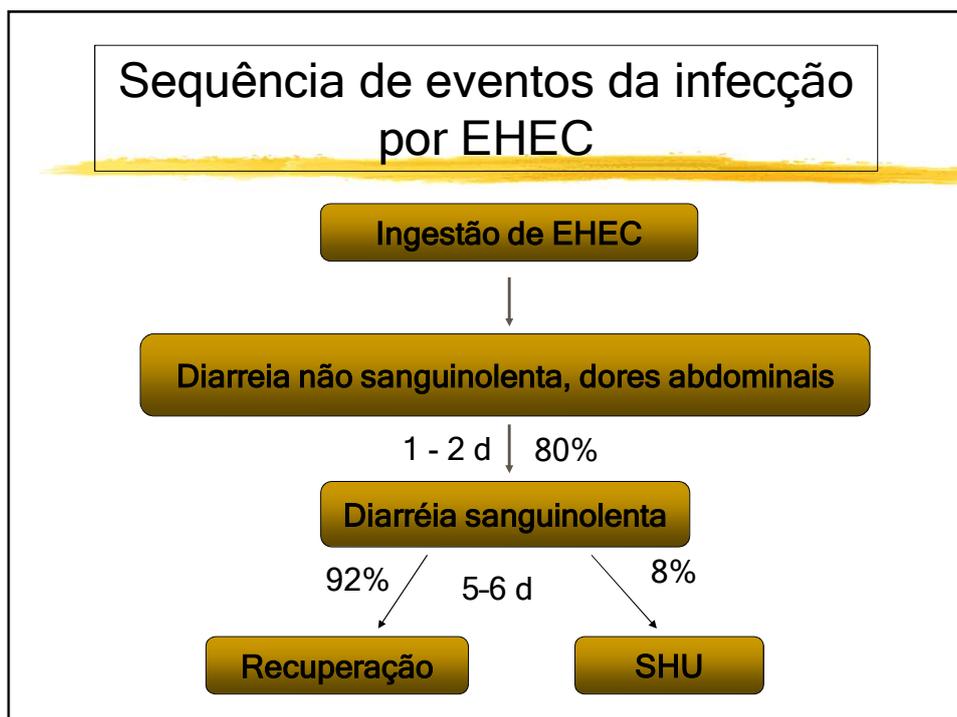
STEC

- Síndromes extra intestinais
 - ❖ Urêmica hemolítica (HUS)
 - 6% dos acometidos
 - Tríade
 - Anemia hemolítica
 - Plaquetopenia ou trombocitopenia
 - Falência renal aguda
 - ❖ Púrpura trombótica trombocitopênica (TTP)
 - Extensão da HUS
 - Além anemia hemolítica e trombocitopenia
 - Sintomas neurológicos (coágulos no cérebro)
 - Febre

Sequência de eventos da infecção por STEC



Sequência de eventos da infecção por EHEC



STEC

- Duração
 - ❖ 4 a 10 dias
- Dose infectante
 - ❖ <100 células
 - ❖ 0,3 a 15 UFC/g de alimento
- Período de incubação
 - ❖ 3 a 4 dias
 - 2 a 12 dias

http://www.youtube.com/watch?v=3ps_Kw4EX7A

STEC

- Tratamento
 - ❖ Hidratação
 - ❖ Uso de antibióticos e antidiarreicos
 - Não recomendados!
 - Podem aumentar risco de HUS

Características Gerais STEC

Veículos

2006 ←



TABLE 1. Number of cases of bacterial and parasitic infection, hospitalizations, and deaths, by pathogen — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, United States, 2012*

Pathogen	Cases			Hospitalizations		Deaths	
	No.	Incidence [†]	Objective [§]	No.	(%)	No.	(%)
Bacteria							
<i>Campylobacter</i>	6,793	14.30	8.5	1,044	(15)	6	(0.09)
<i>Listeria</i>	121	0.25	0.2	116	(96)	13	(10.74)
<i>Salmonella</i>	7,800	16.42	11.4	2,284	(29)	33	(0.42)
<i>Shigella</i>	2,138	4.50	N/A [¶]	491	(23)	2	(0.09)
STEC O157	531	1.12	0.6	187	(35)	1	(0.19)
STEC non-O157	551	1.16	N/A	88	(16)	1	(0.18)
<i>Vibrio</i>	193	0.41	0.2	55	(29)	6	(3.11)
<i>Yersinia</i>	155	0.33	0.3	59	(38)	0	(0.00)
Parasites							
<i>Cryptosporidium</i>	1,234	2.60	N/A	236	(19)	6	(0.49)
<i>Cyclospora</i>	15	0.03	N/A	3	(20)	0	(0.00)
Total	19,531			4,563		68	

Abbreviations: N/A = not available; STEC = Shiga toxin-producing *Escherichia coli*.
^{*} Data for 2012 are preliminary.
[†] Per 100,000 population.
[§] *Healthy People 2020* objective targets for incidence of *Campylobacter*, *Listeria*, *Salmonella*, STEC O157, *Vibrio*, and *Yersinia* infections per 100,000 population.
[¶] No national health objective exists for these pathogens.

Surtos recentes STEC

Data	País	Alimento	Nº afetados	Sorotipo
Nov 2012	USA	Hortalças	33	13 hosp, 2 HUS
Jan 2013	USA	Leite cru	"vários"	O103
Jan 2013	Canadá	Alface picada orgânico	1 hosp.	H7
Abr 2013	USA	Alimentos congelados mix de vegetais	1	
Dez. 2013	USA	Salada pronta	33	O157:H7
Jun. 2014	USA	Carne moída	19	8 hosp, 2 HUS

5 mil ton recolhidas



81% < 21 anos

Surtos recentes STEC

Data	País	Alimento	Nº afetados	Sorotipo
Dez. 2015	USA	Salada de frango	19	5 hosp, 2 HUS
Dez. 2015	USA	Indet.	55	2 hosp.
Dez. 2015	USA	Indet.	5	1 hosp.
	USA	Broto de alfafa	9	O157:H7

2 surtos Rest. Mexicano Chipotle

2hosp

Surtos recentes STEC

Data	País	Alimento	Nº afetado	Sorotipo
				17 hosp, 1 HUS
Set. 2016	USA	Farinha e produtos (General Mills)	63	O121/ O26
Mar. 2017	USA	 Farinha e produtos	29	12 hosp., 9HUS
Mar. 2017	Canada	Farinha e produtos	25	O121 12 hosp.

Surtos recentes STEC

Data	País	Alimento	Nº afetados	Sorotipo
Mar. 2017	Canada	 Farinha e produtos	25	O121 12 hosp.

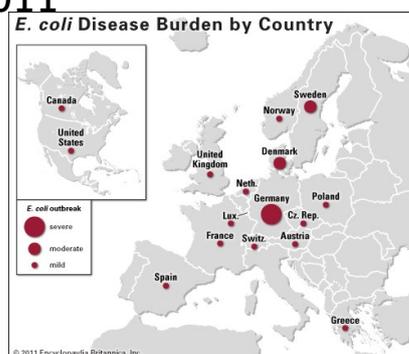
E. coli O104:H4 Europa

- Período Maio a Julho 2011

- 1º surto de EAHEC

- ❖ > surto de STEC

- 3842 afetados
 - 2987 gastroenterite
 - 855 HUS (50% diálise)
 - 53 ☠
 - 35 HUS (4.1%)
 - 18 gastroenterite (0.6%)



Fonte: www.britannica.com

E. coli O104:H4 Europa

- França

- ❖ 2º país

- Gastroenterite
 - 75 casos, 8 ☠
 - HUS
 - 50 casos, 1 ☠

The screenshot shows the BBC News Europe website. The main headline is "E. coli outbreak alarms Germany as young women sicken". The sub-headline reads: "Germany is alarmed at the scale of an E. coli food poisoning outbreak which is thought to have killed three people and may have infected hundreds more." The article text states: "At least 80 people ingested EHEC, a dangerous strain of the bacterium, over the past two weeks and there are a further 350 suspected cases. The number of EHEC infections for the whole of 2010 was only about 1,000. This outbreak is affecting young women in particular, and one theory is that it is spread by contaminated salad. While medical tests have yet to establish the exact cause of death, the three suspected victims were all women, two of them in their 80s and the third aged 24." An image shows a scientist in a lab coat working in a laboratory. A caption below the image says: "Samples are being studied at the UKE laboratory in Hamburg". To the right of the article are sections for "Top Stories" (Syrian army shells northern towns, Costa ship adrift off Seychelles, New clue to Neanderthal wipe-out, German MPs approve Greek bailout, Anchor cuts East Africa web cable) and "Features & Analysis" (1982 v 2012: How well defended are the Falkland Islands?, Getting on board: Are Americans overcoming their dislike of buses?, Risky mission: How Israel might strike at Iran's nuclear programme).

The screenshot shows the Guardian website. The main headline is "E coli outbreak: German organic farm officially identified". The sub-headline reads: "Eat cucumbers, tomatoes and lettuce again, say German health authorities, but avoid bean sprouts". The author is "Ian Sample, science correspondent" and the date is "Friday 10 June 2011 18.26 BST". The article includes a photo of fresh vegetables (cucumbers, tomatoes, lettuce, and bean sprouts) in three separate containers. To the right of the article are social media sharing options (Tweet: 67, Share: 615, reddit this) and a "World news" sidebar with links to "E coli", "Food safety", "Germany", and "Europe".

E. coli O104:H4 Europa

- 1º surto de EAHEC
- Países
 - ❖ Alemanha e França
- Fonte
 - ❖ Pepinos, alface
 - ❖ Brotos de feijão



E. coli O104:H4 Europa

- População afetada
 - ❖ Adultos saudáveis
 - 87% > 20 anos
 - HUS
 - >ria mulheres ≈ 45 anos
 - ❖ Portador por até 13 semanas

E. coli O104:H4 Europa

- Cepa
 - ❖ *Stx*₂ - fator de virulência típico de STEC
 - ❖ Plasmídio - fimbria de aderência agregativa
 - ❖ Resistente cefalosporina 3^a geração
- Dose infecciosa – não estabelecida
- Tempo de incubação – 8d

E. coli O104:H4 Europa

- Sintomatologia
 - ❖ Fase 1
 - Diarréia aquosa/ sanguinolenta/ sem sintomas

E. coli O104:H4 Europa

- Sintomatologia
 - ❖ Fase 1
 - ❖ Fase 2
 - 3-5 dias sintomas de TMA (microangiopatia trombótica)
 - Hemólise
 - Trombocitopenia
 - Disfunção renal
 - HUS é 1 dos sintomas

E. coli O104:H4 Europa

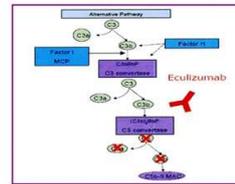
- Sintomatologia
 - ❖ Fase 1
 - ❖ Fase 2
 - ❖ Fase 3
 - 3-10 dias – sintomas neurológicos
 - Desorientação; consciência alterada
 - Visão dupla; Disfagia
 - Convulsões; dificuldades respiratórias
 - Surtos psicóticos e depressivos

E. coli O104:H4 Europa

- EAHEC
 - ❖ Reservatório: humanos
 - STEC e EHEC clássicas - zoonóticas
- Tratamento
 - ❖ Imunoadsorção
 - ❖ Eculizumab

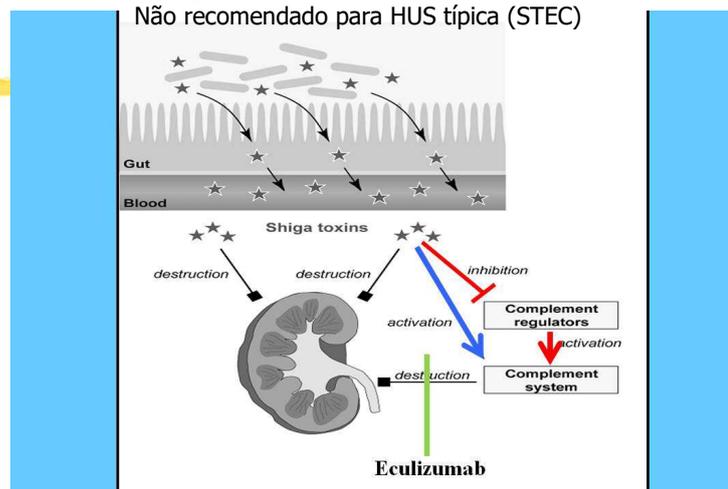


Eculizumab : humanized monoclonal antibody directed against complement C5 subfraction



Eculizumab blocks the cleavage of C5 into C5a and the membrane attack complex (C5-C9) : approved for Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria

Inibe microangiopatia trombótica mediada por complemento
 Não recomendado para HUS típica (STEC)



http://www.i-med.ac.at/pr/pressebilder/images/Eculizumab_presse.jpg

Medidas de prevenção e controle

- Prevenção da contaminação fecal de alimentos
 - ❖ Produção
 - ❖ Processamento

Medidas de prevenção e controle

- Prevenção da contaminação fecal de alimentos
- Cocção adequada dos produtos cárneos e outros alimentos

Medidas de prevenção e controle

- Prevenção da contaminação fecal de alimentos
- Cocção adequada dos produtos cárneos...
- Evitar consumo de
 - ❖ Leite cru
 - ❖ Carne crua ou mal cozida
 - ❖ Queijos feitos com leite cru

Medidas de prevenção e controle

- Prevenção da contaminação fecal de alimentos
- Cocção adequada dos produtos cárneos
- Evitar consumo de...
- Resfriar a $T < 7^{\circ}\text{C}$
 - ❖ Carcaças e produtos cárneos

Medidas de prevenção e controle

- Prevenção da contaminação fecal de alimentos
- Cocção adequada dos produtos cárneos
- Evitar consumo de
- Resfriar a $T < 7^{\circ}\text{C}$
- Evitar contaminação de vegetais MP
 - ❖ Água
 - ❖ Adubos orgânicos

Medidas de prevenção e controle

- Prevenção da contaminação fecal de alimentos
- Cocção adequada dos produtos cárneos
- Evitar consumo de
- Resfriar a $T < 7^{\circ}\text{C}$
- Evitar contaminação de vegetais MP
- Evitar contaminação cruzada e contaminação pós-processamento

Medidas de prevenção e controle

- Cocção adequada dos produtos cárneos
- Evitar consumo de
- Resfriar a $T < 7^{\circ}\text{C}$
- Evitar contaminação de vegetais MP
- Evitar contaminação cruzada e contaminação pós-processamento
- Higiene adequada nos locais de processamento de alimentos

Medidas de prevenção e controle

- Evitar consumo de
- Resfriar a $T < 7^{\circ}\text{C}$
- Evitar contaminação de vegetais MP
- Evitar contaminação cruzada e contaminação pós-processamento
- Higiene adequada nos locais de processamento de alimentos
- Educação do consumidor

Metodologias oficiais

- International Organization for Standardization (ISO) ISO/TR 13136:2012.
- Food and Drug Administration (FDA) USA
- USDA

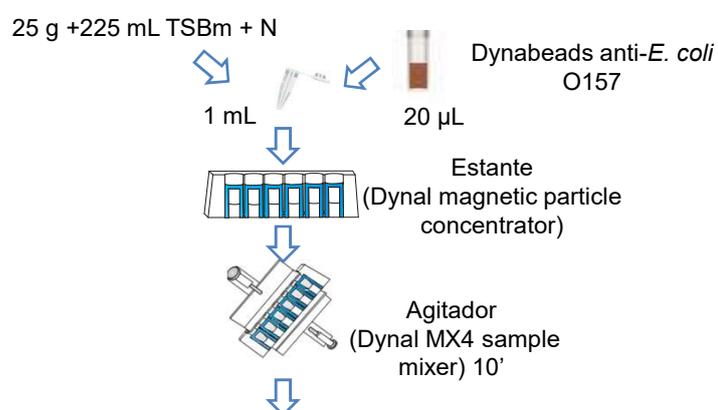
Metodologias oficiais

- ISO
 - ❖ identificação de STEC através da detecção dos genes:
 - *stx* e *eae*;
 - genes associados aos serogroups O157, O111, O26, O103, and O145.
- Se + para um ou ambos genes *stx*
 - ❖ Tentar isolar o micro-organismo

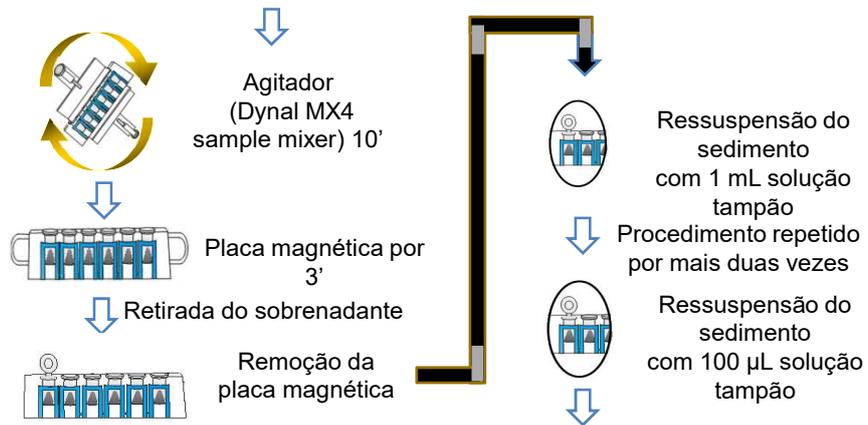
Metodologias oficiais: ISO

- ❖ Enriquecimento
 - Separação imunomagnética

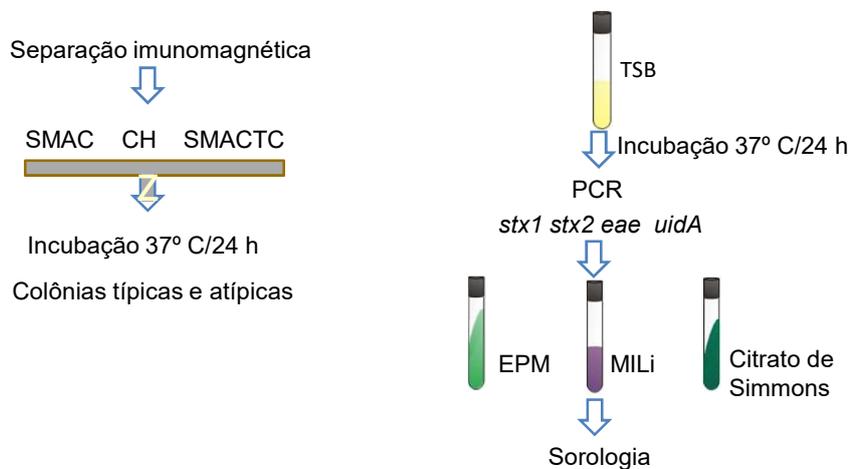
Detection of *E. coli* O157:H7 (ISO 16654,1998)



Detection of *E. coli* O157:H7 (ISO 16654,1998)



Detection of *E. coli* O157:H7 (ISO)



Metodologias oficiais

- International Organization for Standardization (ISO)
- Food and Drug Administration (FDA) USA

Metodologias oficiais

- ISO
- Food and Drug Administration (FDA -BAM) EUA
 - ❖ Metodologia atual
 - PCR em tempo real
 - Cultura

FDA

RT-PCR

SmartCycler II

LightCycler® 2.0

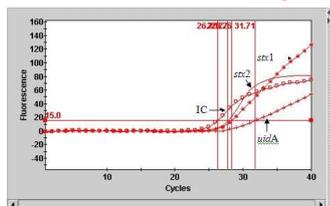
Configuração: específico para *stx1* e *stx2* e *uidA*

FDA

RT-PCR

Positivo

Confirmação cultura



FDA: Cultura

25 g

APTm + piruvato + acriflavina +
cefsulodina + vancomicina

Ágar SMAC+ telurito+cefixima
Ágares Cromogênicos
Ágar Levine

FDA: Cultura

Typical *E. coli* O157:H7 colonies on selective agars



TC-SMAC

Rainbow® Agar
O157

R&F® *E. coli* O157:H7

FDA: Cultura

- Identificação
 - ❖ Número de colônias: 10?
 - ❖ API20E, VITEK GNI
 - ❖ Reagentes Anti-O157 e anti-H7
- PCR para *stx1, stx2*

FDA: Cultura

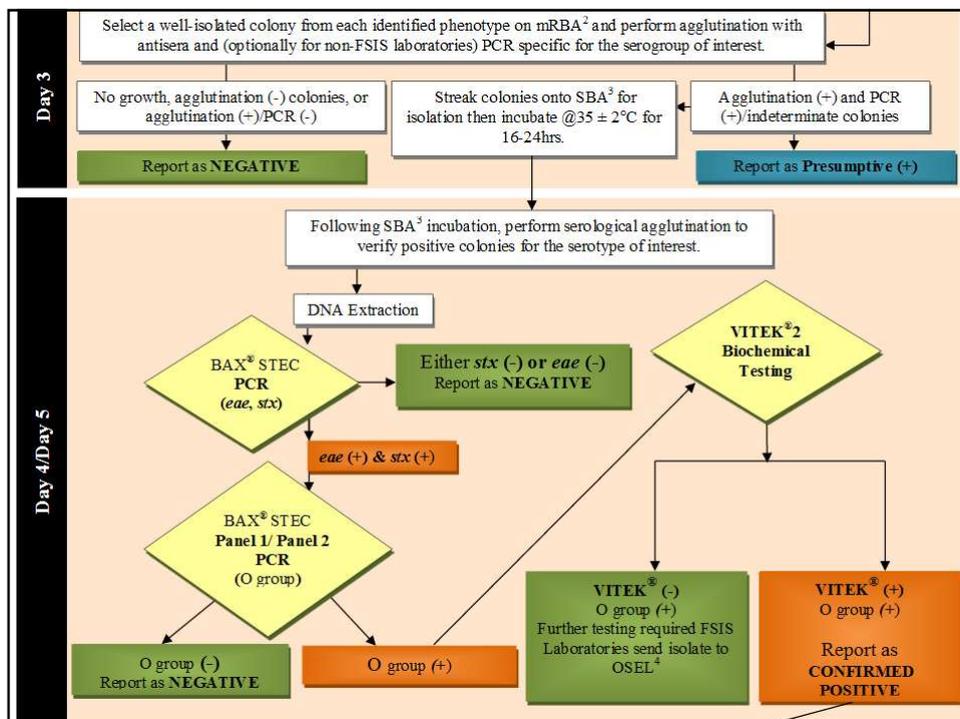
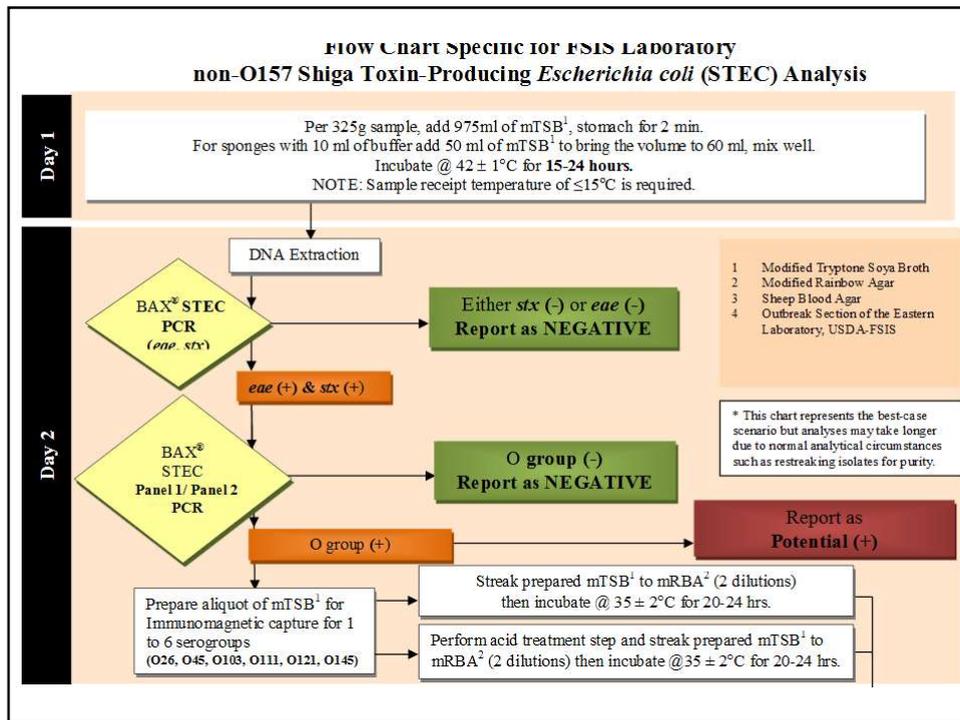
- Vegetais folhosos
- Suco, leite ou outras bebidas turvas
- Água engarrafada ou outros líquidos límpidos
 - ❖ outras técnicas de preparo da amostra
- Enriquecimento
- Isolamento
- Identificação

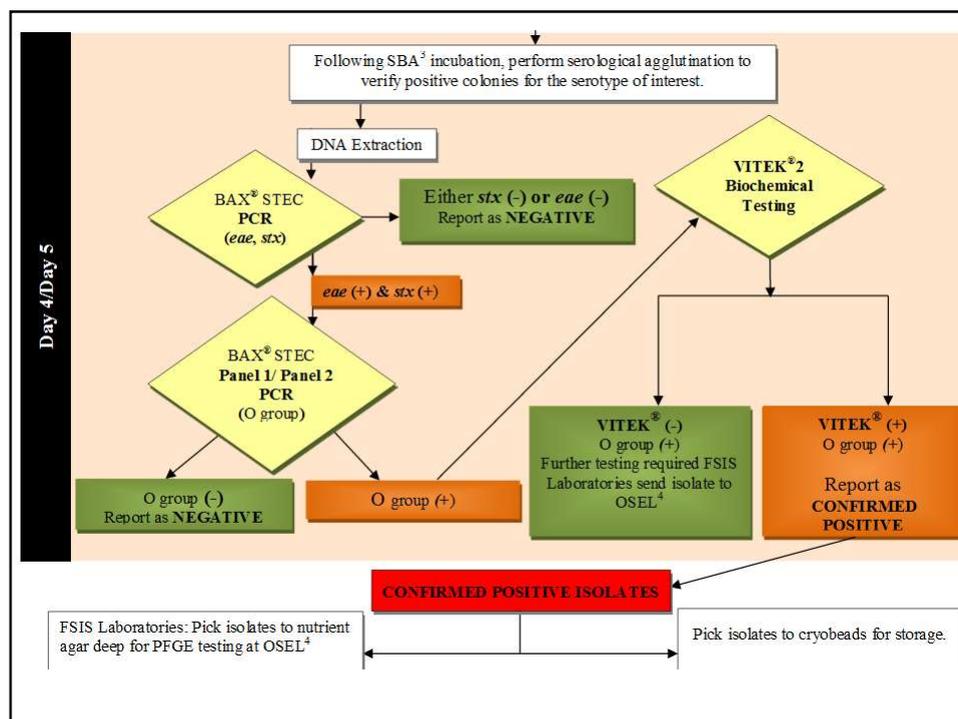
Metodologias oficiais

- International Organization for Standardization (ISO)
- Food and Drug Administration (FDA) USA
- USDA

Métodos Oficiais

- USDA
 - ❖ Enriquecimento
 - caldo mTSB +N e EEB
 - Separação imunomagnética
 - Meios para isolamento
 - Um ou dois meios (grupo 1)
 - Grupo 1: mHC (com telurito e cefsulodina), CHROMagar and mHC with CT supplement (Oxoid SR172).
 - Um meio do Grupo 2: TCCSMAC, CT-SMAC e CR-SMAC.





Metodologias oficiais

- Identificação presuntiva das colônias
 - ❖ Quantas colônias testar?
 - 5 colônias?
 - 10 colônia?



Para estudo

- P1: Caracterize STEC quanto: morfologia da célula, Gram, motilidade, aeróbio ou anaeróbio (ou facultativo), tolerância a sal, a_w , faixa de temperatura de crescimento (e ótima), pH, habitat.
- P2: Quais alimentos são os mais implicados na disseminação desse patógeno?
- P3: Após a ingestão de alimentos contaminados, como a enfermidade se desenvolve? Inclua o período de incubação e duração da doença.
- P4: Quais os sintomas desenvolvidos?

Para estudo

- P5: Quais os principais sorogrupos associados à enfermidade por STEC?
- P6: Quais fatores são associados aos alimentos envolvidos em surtos por essas bactérias?
- P8: Quais medidas devem ser adotadas na produção dos alimentos para evitar (prevenir) a contaminação por STEC?
- P9: Que tipo de tratamento se aplica aos doentes acometidos pela síndrome causada por STEC?