



ARTIGO ORIGINAL

Fecal microbiota analysis of children with small intestinal bacterial overgrowth among residents of an urban slum in Brazil[☆]



Carolina Santos Mello, Mirian Silva do Carmo Rodrigues,
Humberto Bezerra de Araújo Filho, Lígia Cristina Fonseca Lahoz Melli,
Soraia Tahan, Antônio Carlos Campos Pignatari e Mauro Batista de Moraes*

Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), Departamento de Pediatria, Disciplina de Gastroenterologia Pediátrica, São Paulo, SP, Brasil

Recebido em 12 de dezembro de 2016; aceito em 2 de agosto de 2017

KEYWORDS

Fecal microbiota;
Environmental
exposure;
Child

Abstract

Objective: To analyze the fecal microbiota composition of children living in an urban slum in Brazil, with or without small intestinal bacterial overgrowth, and to investigate the occurrence of stunting and anemia.

Methods: A total of 100 children were studied, aged 5–11 years, from the municipality of Osasco, São Paulo. Small intestinal bacterial overgrowth was screened through hydrogen and methane breath test with lactulose. Weight and height were measured, and the height-for-age and body mass-for-age anthropometric indexes were calculated. The occurrence of anemia was investigated by capillary hemoglobin. Analysis of bacterial phylum, genus, and species was performed by real-time polymerase chain reaction in fecal samples.

Results: Small intestinal bacterial overgrowth was identified in 61.0% of the children. A lower mean of height-for-age Z-score ($[-0.48 \pm 0.90]$ vs. $[-0.11 \pm 0.97]$; $p=0.027$), as well as capillary hemoglobin ($[12.61 \pm 1.03 \text{ g/dL}]$ vs. $[13.44 \pm 1.19 \text{ g/dL}]$; $p<0.001$) was demonstrated in children with SIBO when compared with children without small intestinal bacterial overgrowth. Children with small intestinal bacterial overgrowth presented a higher frequency of *Salmonella* spp., when compared to those without small intestinal bacterial overgrowth (37.7% vs. 10.3%; $p=0.002$). Higher counts of total Eubacteria ($p=0.014$) and Firmicutes ($p=0.038$) were observed in children without small intestinal bacterial overgrowth; however, a higher count of *Salmonella* ($p=0.002$) was found in children with small intestinal bacterial overgrowth.

DOI se refere ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2017.09.003>

[☆] Como citar este artigo: Mello CS, Rodrigues MS, Filho HB, Melli LC, Tahan S, Pignatari AC, et al. Fecal microbiota analysis of children with small intestinal bacterial overgrowth among residents of an urban slum in Brazil. J Pediatr (Rio J). 2018;94:483–90.

* Autor para correspondência.

E-mail: maurobmorais@gmail.com (M.B. de Moraes).

PALAVRAS-CHAVE

Microbiota fecal;
Exposição ambiental;
Criança

Conclusion: Children who lived in a slum and were diagnosed with small intestinal bacterial overgrowth showed lower H/A Z-scores and hemoglobin levels. Furthermore, differences were observed in the fecal microbiota of children with small intestinal bacterial overgrowth, when compared to those without it; specifically, a higher frequency and count of *Salmonella*, and lower counts of *Firmicutes* and total Eubacteria.

© 2017 Sociedade Brasileira de Pediatria. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Análise da microbiota fecal de crianças com sobrecrescimento bacteriano no intestino delgado de moradoras de uma favela urbana no Brasil

Resumo

Objetivo: Analisar a composição da microbiota fecal de crianças moradoras de uma favela urbana no Brasil, com e sem sobrecrescimento bacteriano no intestino delgado, e investigar a ocorrência de déficit de crescimento e anemia.

Métodos: Foram estudadas 100 crianças, com idade entre 5 e 11 anos, na cidade de Osasco, São Paulo. Sobrecrescimento bacteriano no intestino delgado foi pesquisado por teste respiratório do hidrogênio e metano no ar expirado com lactulose. Foram mensurados peso, estatura e calculados os índices antropométricos estatura para idade e índice de massa corporal para idade. Foi investigada a ocorrência de anemia, pela avaliação da hemoglobina capilar. A análise dos filós, gêneros e espécies bacterianas em amostras de fezes foi realizada por *polymerase chain reaction* em tempo real.

Resultados: Sobrecrescimento bacteriano no intestino delgado foi diagnosticado em 61,0% das crianças avaliadas. Foi verificada menor média do escore Z do índice estatura para idade ($-0,48 \pm 0,90$ vs. $-0,11 \pm 0,97$ DP) e de hemoglobina capilar ($12,61 \pm 1,03$ vs. $13,44 \pm 1,19$ g/dL) no grupo de crianças com sobrecrescimento bacteriano no intestino delgado, quando comparadas àquelas sem sobrecrescimento bacteriano no intestino delgado ($p < 0,05$). Nas crianças com sobrecrescimento bacteriano no intestino delgado foi observada maior frequência de *Salmonella spp.*, quando comparadas àquelas sem sobrecrescimento bacteriano no intestino delgado (37,7% vs. 10,3%; $p = 0,002$). Maior contagem de Eubactérias totais ($p = 0,014$) e *Firmicutes* ($p = 0,038$) foi observada nas crianças sem sobrecrescimento bacteriano no intestino delgado, enquanto que as crianças com sobrecrescimento bacteriano no intestino delgado apresentaram maior contagem de *Salmonella* ($p = 0,002$).

Conclusão: Nas crianças com diagnóstico de sobrecrescimento bacteriano no intestino delgado verificaram-se menores valores de estatura para idade e de hemoglobina. Foram constatadas diferenças na microbiota fecal das crianças com sobrecrescimento bacteriano no intestino delgado, especificamente, maior frequência e contagem de *Salmonella spp.* e menores contagens de *Firmicutes* e Eubactérias totais.

© 2017 Sociedade Brasileira de Pediatria. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

Ao longo dos últimos anos, vários estudos foram feitos com vistas a ampliar o conhecimento sobre a composição da microbiota intestinal humana. Nas fezes encontra-se uma grande biomassa de células bacterianas que representam uma combinação de bactérias de mucosa e aquelas transitoriamente presentes no lúmen intestinal.¹ Entretanto, pouco se conhece sobre as comunidades bacterianas que se aderem ao e colonizam o intestino delgado, em consequência das dificuldades técnicas para a coleta de amostras para análise do conteúdo intestinal nessa região do trato gastrointestinal.²

O aumento da quantidade de bactérias no intestino delgado, especialmente de espécies comuns ao cólon, caracteriza o sobrecrescimento bacteriano no intestino delgado

(SBID).³ Essa condição clínica frequentemente encontra-se associada à enteropatia ambiental, recentemente reclassificada como “disfunção entérica ambiental”,⁴ em indivíduos expostos a ambientes insalubres.⁵ Dessa forma, podem ser observadas alterações morfológicas e funcionais do intestino delgado, derivadas de um processo inflamatório local^{4,5} pela atuação de bactérias patogênicas, em especial as Gram negativas,³ desencadeiam um quadro de má absorção crônica de nutrientes e consequente déficit de crescimento em crianças,⁴⁻⁶ mesmo que essas se apresentem assintomáticas.^{4,7}

Os testes respiratórios se constituem em uma opção não invasiva para a pesquisa de SBID.⁸ Em indivíduos saudáveis, a produção de hidrogênio e metano ocorre predominantemente pela fermentação bacteriana anaeróbia no intestino grosso. No caso de SBID, a produção desses gases também

pode ser verificada no intestino delgado, pela ação de bactérias contaminantes.⁸ Nesse contexto, estudo feito por nosso grupo de pesquisa,⁷ com crianças em condições de pobreza, constatou que aquelas diagnosticadas com SBID apresentam um maior potencial de fermentação não apenas em intestino delgado, mas também no cólon, sugere uma situação de disbiose ao longo de todo o trato gastrointestinal na vigência dessa condição clínica.

Considerando o fato de que a composição da microbiota intestinal pode ser influenciada pelo ambiente e pelas condições de vida aos quais o indivíduo está exposto⁹ e as consequências negativas da disfunção entérica ambiental na infância,^{4,5} o presente estudo tem como objetivo analisar a composição da microbiota fecal de crianças moradoras de uma favela urbana no Brasil, com e sem SBID, bem como investigar a ocorrência de déficit de crescimento e anemia.

Métodos

Delineamento

Estudo de corte transversal feito no município de Osasco, Região Metropolitana de São Paulo, Brasil. A população do estudo foi composta por crianças de baixo nível socioeconômico, moradoras de uma favela urbana, constitui uma amostragem por conveniência.

Como critérios de inclusão foram considerados idade entre cinco e 11 anos, ausência de diarreia (evacuações líquidas ou aquosas) e não uso de antibióticos, pelo período mínimo de um mês. A não feita de teste respiratório e/ou não entrega de amostra de fezes constituíram-se em perdas amostrais. Não foram incluídas no estudo crianças com evidências clínicas de doenças crônicas graves (ex. cardiopatias).

Com a ajuda de um líder comunitário, os habitantes da localidade foram convidados a participar do estudo. Apresentaram-se voluntariamente 122 crianças, acompanhadas de seus responsáveis; entretanto, 22 não preencheram os critérios para participação no estudo.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo. A assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido foi obtida pelos responsáveis de cada participante, no momento da admissão no estudo.

Condições de moradia, antropometria e dosagem de hemoglobina

Foram obtidas informações sobre as condições de moradia, pelos responsáveis. Para aferição de peso e altura foram usadas balança digital (Filizola SA Pesagem e Automação, São Paulo, Brasil) com capacidade de 150 kg e sensibilidade de 100 g e antropômetro vertical (Seca GmbH Co. Kg., Hamburgo, Alemanha), com medição de até 190 cm e sensibilidade de 0,1 cm. Os escores Z de estatura para idade e índice de massa corporal para idade foram obtidos.¹⁰

A concentração de hemoglobina capilar, obtida em amostra de sangue coletada por punção da polpa digital, foi determinada por fotômetro portátil (Hemocue®, Ängelholm,

Suécia), consideraram-se anemia os níveis de hemoglobina inferiores a 11,5 g/dL.¹¹

Teste respiratório com lactulose

O teste foi feito após jejum de oito horas e higiene bucal com solução antisséptica. Após coleta da amostra basal de ar expirado, foram administrados, por via oral, 10 g de lactulose^{7,12} (Daiichi Sankyo, São Paulo, Brasil) em solução aquosa a 10%. Novas amostras de ar expirado foram coletadas aos 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 180 minutos após a ingestão de lactulose. As amostras foram coletadas em uma única expiração forçada, em sacos hermeticamente fechados. As concentrações de hidrogênio (H₂) e metano (CH₄) foram mensuradas por cromatografia gasosa (MicroLyzer SC, Quintron Instrument Co. Inc., Wisconsin, EUA).

SBID foi caracterizado pelo aumento nas concentrações de H₂ ≥ 20 ppm e/ou de CH₄ ≥ 10 ppm, no ar expirado, em relação às concentrações em amostras de jejum, até 60 minutos do teste.^{7,12}

PCR em tempo real (*Real-time polymerase chain reaction*)

A coleta das fezes foi feita pelos responsáveis, orientados previamente. As amostras foram armazenadas em coletor universal e, posteriormente, conservadas em congelador doméstico por até 24 h (período entre a evacuação e entrega). No laboratório, uma alíquota de fezes, de aproximadamente um grama, foi transferida para criotubo estéril, contendo tampão ASL do kit QiaAmp mini Stool (Qiagen, Hilden, Alemanha), foram mantidas a -20 °C até o momento da extração de DNA, o DNA genômico bacteriano foi extraído das amostras conforme protocolo sugerido pelo fabricante. O DNA purificado foi diluído em solução tampão a volume final de 200 µL. A quantificação de DNA foi feita no espectrofotômetro Nanodrop 1000 (ThermoScientific, Waltham, USA). Todas as amostras de DNA foram diluídas para a concentração de 20 ng/µL e armazenadas a -20 °C. Os *primers* usados (fig. 1) foram destinados para a identificação e quantificação de eubactérias totais,¹³ filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*,¹⁴ gêneros *Lactobacillus spp.*,¹⁵ *Salmonella spp.*,¹⁶ *Bifidobacterium spp.*¹⁷ e espécies *Bacteroides fragilis*,¹⁸ *Escherichia coli*,¹⁹ *Staphylococcus aureus*,²⁰ *Clostridium difficile*,¹⁵ *Clostridium perfringens*²¹ e *Methanobrevibacter smithii*.²² O DNA de todas as amostras fecais foi submetido ao ensaio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real.

Todas as reações foram feitas em duplicata, em volume final de 10 µL com 5 µL de Rotor-gene SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Alemanha), 0,2 µL (10 pmol/µL) dos *primers forward* e reverso de cada bactéria, 0,5 µL da amostra de DNA (20 ng/µL) e 4,1 µL de água DEPC (diethylpyrocarbonato) (Qiagen, Hilden, Alemanha). A termociclagem foi feita no equipamento Rotor-gene Q (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as seguintes condições: cinco minutos a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 10 segundos e 60 °C por 15 segundos. O ciclo de dissociação dos produtos para a curva de desnaturação (*melting curve*) foi: 95 °C por um minuto e uma etapa para feitura da curva de

Primer	Sequências de nucleotídeos	Tamanho e temperatura de anelamento
Eubactérias totais[13]	FP: TCCTACGGGAGGCAGCAGT RP: GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	467 bp, Tm = 63°C
Firmicutes[14]	FP: GTCAGCTCGTGTGCGTGA RP: CCATTGTAKYACGTGTGT	178 bp, Tm = 60°C
Bacteroidetes[14]	FP: AGCAGCCGCGGTAAT RP: CTAHGCAATTCACCGCTA	183 bp, Tm = 60°C
<i>Lactobacillus</i> spp.[15]	FP: AGCAGTAGGGAATCTTCCA RP: CACCGCTACACATGGAG	341 bp, Tm = 58°C
<i>Salmonella</i> spp.[16]	FP: GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGCAA RP: TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	203 bp, Tm = 86°C
<i>Bifidobacterium</i> spp.[17]	FP: GGGTGGTAATGCCGGATG RP: TAAGCCATGGACTTTTCACACC	278 bp, Tm = 59°C
<i>Bacteroides fragilis</i> [18]	FP: ATAGCCTTTTCGAAAGRAAGAT RP: CCAGTATCAACTGCAATTTTA	501 bp, Tm = 50°C
<i>Escherichia coli</i> [19]	FP: CATGCCGCGTGTATGAAGAA RP: CGGGTAACGTCATGAGCAA	96 bp, Tm = 80°C
<i>Staphylococcus aureus</i> [20]	FP: GCGATTGATGGTGATACGGTT RP: CAAGCCTTGACGAACATAAAGC	276 bp, Tm = 79°C
<i>Clostridium difficile</i> [15]	FP: TTGAGCGATTACTTCCGGTAAAGA RP: CCATCCTGTAAGGCTCACCT	157 bp, Tm = 58°C
<i>Clostridium perfringens</i> [21]	FP: GGTTTCATTAAATTGAAACTGGTG RP: AACGCCAATCATATAAATTACAGC	154 bp, Tm = 76°C
<i>Methanobrevibacter smithii</i> [22]	FP: GAA AGC GGA GGT CCT GAA RP: ACTGAAAAACCTCCGCAAC	151 bp, Tm = 57°C

bp, pares de bases; Tm, temperatura de anelamento; FP, primer forward; RP, primer reverso.

Figura 1 Desenho dos primers usados no estudo.

desnaturação que variou de 70°C até 95°C, com aumento gradual na temperatura de 1°C/s.

Para todas as amostras fez-se um controle interno de reação com primers desenhados para detecção de eubactérias totais,²³ serviu como padrão para quantificação relativa do DNA bacteriano total. Como controle negativo, usou-se uma reação com todos os reagentes, com exceção da amostra de DNA. A curva padrão para todas as análises foi feita pela amplificação de um plasmídeo TopoTA (Invitrogen®, EUA), constou nesse o fragmento do gene referente a cada bactéria, previamente amplificado por PCR convencional, a sua especificidade foi confirmada por sequenciamento e alinhamento no sistema BLAST (Canablast®, Canada).

Análise estatística

Para análise dos resultados foi usado, para comparar dois grupos independentes, o teste de Mann-Whitney ou *t* de Student, para variáveis numéricas contínuas, e o teste do qui-quadrado, para variáveis categóricas. Os cálculos foram feitos no programa Sigma Stat (Systat Software, Inc, versão 3.1, USA), fixou-se em 5% o nível para rejeição da hipótese de nulidade.

Resultados

SBID foi diagnosticado em 61/100 (61,0%) crianças. Na [tabela 1](#) estão apresentados os dados demográficos, antropométricos, frequência de anemia e valores médios de hemoglobina. O grupo de crianças com SBID apresentou valores inferiores do escore Z de estatura-idade e de hemoglobina ($p < 0,05$), quando comparadas com aquelas sem SBID. Constatou-se, também, associação entre SBID e ausência de abastecimento de água no domicílio.

Na [tabela 2](#), a produção de hidrogênio e metano, obtida no teste respiratório com lactulose, está expressa como áreas sob curvas individuais. Foi observado que as crianças

com SBID apresentaram maior produção de hidrogênio durante a primeira hora de teste ($p = 0,002$), presumivelmente no intestino delgado. Essa diferença não foi verificada com as concentrações de metano. Entre 60 e 180 minutos, período no qual a produção de gases ocorre predominantemente no intestino grosso, as crianças com SBID apresentaram maiores concentrações de hidrogênio e metano, entretanto as diferenças não atingiram significância estatística ($p = 0,081$ e $0,098$, respectivamente).

Em todas as crianças (100,0%) foram identificados: *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. e *Methanobrevibacter smithii*. Quanto aos demais gêneros e espécies analisados, foram observadas frequências variáveis nas crianças com e sem SBID, respectivamente: *Salmonella* spp. (37,7% vs. 10,3%; $p = 0,002$), *Staphylococcus aureus* (52,5% vs. 41,0%; $p = 0,267$), *Clostridium difficile* (44,3% vs. 41,0%; $p = 0,751$) e *Clostridium perfringens* (91,8% vs. 92,3%; $p = 0,928$).

Foi verificada maior contagem de eubactérias totais ($p = 0,014$) e do filo Firmicutes ($p = 0,038$), no grupo de crianças sem SBID; entretanto, maior contagem de *Salmonella* ($p = 0,002$) foi constatada nas crianças com SBID. A quantificação de filos, gêneros e espécies bacterianas, de acordo com a presença ou ausência de SBID, encontra-se descrita na [tabela 3](#).

Discussão

No presente estudo foram observadas diferenças na composição da microbiota fecal de crianças moradoras de uma favela urbana com SBID, mais precisamente maior frequência e contagem de *Salmonella* spp. e menores contagens de Firmicutes e eubactérias totais, quando comparadas com aquelas sem SBID.

Em trabalho anterior feito por nossa equipe de pesquisa, uma constatação que motivou o estudo da microbiota fecal de crianças expostas a condições de pobreza e diagnosticadas com SBID, foi um padrão diferenciado de fermentação no

Tabela 1 Dados antropométricos e condições de moradia das crianças, moradoras de uma favela urbana, com ou sem sobre-crescimento bacteriano no intestino delgado (SBID)

	SBID		p
	Sim (n = 61)	Não (n = 39)	
Idade (anos)	7,6 (6,4 – 8,9)	8,2 (6,7 – 9,9)	0,118 ^a
Sexo masculino [n (%)]	61 (58,1%)	14 (46,7%)	0,268 ^b
Escores Z			
Estatura/idade	-0,48 ± 0,90	-0,11 ± 0,97	0,027 ^b
IMC/idade	-0,23 ± 1,14	-0,12 ± 1,06	0,320 ^b
Hemoglobina capilar (g/dL)	12,61 ± 1,03	13,44 ± 1,19	< 0,001 ^b
Anemia (Hb < 11,5 g/dL)	8 (13,1%)	2 (5,1%)	0,196 ^c
Abastecimento de água no domicílio [n (%)]	26 (42,6%)	28 (71,8%)	0,004 ^c
Rede de esgotamento sanitário [n (%)]	7 (11,5%)	2 (5,1%)	0,239 ^d
Coleta pública domiciliar de lixo [n (%)]	2 (3,3%)	0 (0,0%)	0,370 ^d
Casa de tijolo	34 (55,7%)	22 (56,4%)	0,889 ^c
Rua asfaltada	9 (14,8%)	3 (7,7%)	0,231 ^d

Hb, hemoglobina; IMC, índice de massa corporal.

^a Teste de Mann-Whitney, expresso como mediana (percentis 25 e 75).

^b Teste *t* de Student (análise unicaudal), expresso como média ± desvio-padrão.

^c Teste do qui-quadrado.

^d Teste exato de Fisher.

Tabela 2 Área sob a curva da concentração, em ppm/minutos, de hidrogênio (H₂) e metano (CH₄) obtidos no teste respiratório com lactulose de crianças, moradoras de uma favela urbana, com ou sem sobre-crescimento bacteriano no intestino delgado (SBID), durante os primeiros 60 minutos, entre 60 e 180 minutos e no período total do teste

		Com SBID (n = 61)	Sem SBID (n = 39)	p ^a
H ₂	0–60 min	750,0 (528,75–960,0)	472,5 (307,5–712,5)	0,002
	60–180 min	3292,5 (2126,25–4398,75)	2550,0 (1410,0–4080,0)	0,098
	0–180 min	3978,75 (2662,5–5257,5)	2902,50 (1807,50–4800,0)	0,048
CH ₄	0–60 min	1072,5 (217,5–1680,0)	840,0 (0,0–1417,5)	0,146
	60–180 min	1920,0 (442,5–4665,0)	1680,0 (0,0–2910,0)	0,081
	0–180 min	2857,5 (630,0–6198,75)	2535,0 (0,0–4327,5)	0,069

^a Teste de Mann-Whitney, expresso como mediana (percentis 25 e 75).

PPM, partes por milhão.

Tabela 3 Filos, gêneros e espécies bacterianas (unidades formadoras de colônias: UFC/g de fezes) que representam a microbiota fecal de crianças, moradoras de uma favela urbana, com ou sem sobre-crescimento bacteriano no intestino delgado (SBID)

		Com SBID (n = 61)	Sem SBID (n = 39)	p ^a	
<i>Eubactérias totais</i>		UFC/g (x10 ¹⁴)	1,42 (0,26–5,25)	3,62 (0,97–24,68)	0,014
Filo bacteroidetes		UFC/g (x10 ⁹)	1,55 (0,51–2,29)	1,73 (0,50–3,23)	0,344
<i>Bacteroides fragilis</i>		UFC/g (x10 ¹⁰)	1,08 (0,15–5,16)	2,15 (0,27–14,02)	0,145
Filo firmicutes		UFC/g (x10 ⁸)	0,68 (0,25–2,31)	1,60 (0,52–3,73)	0,038
Lactobacillus spp.		UFC/g (x10 ⁷)	6,39 (1,66–25,5)	6,51 (2,46–31,93)	0,777
Clostridium difficile		UFC/g (x10 ³)	0,0 (0,0–1,18)	0,0 (0,0–1,19)	0,956
Clostridium perfringens		UFC/g (x10 ⁵)	0,49 (0,10–6,30)	0,96 (0,16–5,20)	0,628
Staphylococcus aureus		UFC/g (x10 ⁵)	0,10 (0,0–4,42)	0,0 (0,0–5,47)	0,672
<i>Bifidobacterium spp.</i>		UFC/g (x10 ⁵)	5,63 (0,97–31,93)	3,18 (0,64–10,96)	0,249
<i>Salmonella spp.</i>		UFC/g (x10 ²)	0,0 (0,0–1,64)	0,0 (0,0–0,0)	0,002
<i>Escherichia coli</i>		UFC/g (x10 ⁹)	1,08 (0,19–9,74)	1,50 (0,38–33,47)	0,381
<i>Methanobrevibacter smithii</i>		UFC/g (x10 ⁷)	4,18 (1,15–8,71)	2,24 (0,57–9,31)	0,347

^a Teste de Mann-Whitney, expresso como mediana (percentis 25 e 75).

cólon, caracterizada pela maior produção de hidrogênio no teste respiratório,⁹ um resultado que pressupõe que indivíduos com SBID possivelmente apresentem uma situação de disbiose nas diferentes porções intestinais, e não apenas em intestino delgado. Entretanto, esse padrão de maior produção de hidrogênio, e até mesmo de metano, no cólon de crianças com SBID, apesar de sugestiva, não se confirmou nos resultados atuais.

O estudo da composição bacteriana intestinal é possibilitado pela análise de amostras fecais.¹ Por outro lado, procedimentos endoscópicos, associados à análise do conteúdo intestinal (aspirado jejunal), seriam necessários para a caracterização da microbiota do intestino delgado, esse é até considerado padrão-ouro no diagnóstico de SBID.^{3,8,24} Contudo, as características invasivas do método e o seu alto custo⁸ o tornam inviável na avaliação de indivíduos assintomáticos ou com sintomas inespecíficos, além de que seu uso pode não ser adequado do ponto de vista ético para objetivos de pesquisa.²⁴

Em indivíduos saudáveis, é pequena a colonização de bactérias no intestino delgado proximal (10^2 UFC/g de conteúdo intestinal), quando comparado com o cólon (10^{10} – 10^{12} UFC/g de fezes). A menor densidade bacteriana tanto em estômago como em intestino delgado deve-se à ação do suco gástrico e das enzimas digestivas, além dos movimentos peristálticos, como parte do complexo motor migratório (CMM), observados nesses segmentos.²⁴ Por outro lado, em sua caracterização, o SBID é geralmente associado a mudanças quali-quantitativas dos gêneros e das espécies bacterianas no intestino delgado.³

As bactérias implicadas na ocorrência de SBID são principalmente Gram negativas, que apresentam lipopolissacarídeo (LPS) em suas membranas celulares. Os LPS estão associados ao desencadeamento de processo inflamatório local, ocasionam lesões em mucosa e aumento da permeabilidade intestinal,^{3,6} com consequente síndrome disabsortiva,⁴⁻⁶ e elevada fermentação de nutrientes em cólon.³ Também é atribuído ao LPS bacteriano uma ação inibitória do CMM, que ocasionaria uma estase do conteúdo luminal em período interdigestivo, favoreceria o crescimento excessivo de bactérias comuns ao cólon, no intestino delgado.²⁴

A disfunção entérica intestinal se associa a infecção por microrganismos potencialmente patogênicos, o que permeia uma condição de disbiose intestinal.⁵ *Salmonella* e *Escherichia coli*²⁵ são espécies com cepas de alto potencial patogênico, têm grande parte das vezes a diarreia como sintoma gastrointestinal. Em nosso estudo, verificamos elevada frequência de *Salmonella spp.* nas crianças com SBID, além de maior contagem nas amostras fecais, quando comparadas com as crianças sem SBID, resultado que indica um número de portadores assintomáticos maior do que o esperado.

Menor quantificação de *Firmicutes* foi observada no grupo com SBID. De acordo com alguns autores, uma maior variabilidade na composição bacteriana intestinal pode refletir uma maior resistência à invasão por agentes patogênicos.²⁶ A diversidade bacteriana intestinal parece conferir uma resiliência e, consequentemente, maior estabilidade do ecossistema bacteriano.²⁷ Entretanto, a maior quantificação de um filo bacteriano não necessariamente se relaciona a um maior número ou diversidade de gêneros e espécies bacterianas colonizadores. Do mesmo modo, a maior

quantificação de eubactérias totais no grupo de crianças com SBID pode ser interpretada, pode essa refletir, apenas, uma maior concentração bacteriana. A variabilidade genética dos microrganismos que compõem a microbiota de indivíduos com e sem SBID poderia ser identificada com o uso de tecnologias de sequenciamento de nova geração, o que pode ser objetivo de futuros estudos. A técnica usada no presente trabalho se constitui em um fator limitante, uma vez que permite, apenas, o estudo de alguns grupos bacterianos pré-selecionados.

No estudo não foram constatadas outras diferenças na composição da microbiota fecal das crianças com e sem SBID. A partir de tal observação, foi analisado o poder do teste, foram considerados para cálculo os resultados das contagens de *Escherichia coli*, uma vez que a interpretação de seus resultados apresenta plausibilidade biológica, na vigência de SBID. Considerando o teste estatístico (Mann-Whitney) e o tamanho de efeito ($d = 0,45$), calculado a partir das médias e desvios-padrão da contagem de *Escherichia coli* (UFC/g de fezes) de ambos os grupos, identificou-se que o poder ($1-\beta$) para essa análise foi de 56,6%. Para obtenção de um poder de 80%, com manutenção do tamanho de efeito e $\alpha = 5\%$, seriam necessários 164 indivíduos (Software G*Power, versão. 3.1.9.2). Portanto, isso também se constitui em limitação do estudo, pode justificar o não alcance de evidência estatística em algumas análises.

A ocorrência de SBID em crianças expostas a condições insalubres de moradia e a veículos de contaminação se constitui no principal indicador de enteropatia ambiental.⁷ No presente estudo, foi verificada elevada a ocorrência de SBID (61,0%), um resultado expressivamente superior ao verificado em outros trabalhos.^{7,12} Nesse contexto, podemos destacar o menor acesso ao abastecimento domiciliar de água pelas crianças com SBID. Estudo anterior,⁷ feito nessa mesma comunidade, demonstrou que o abastecimento clandestino de água ocorria em 41,2% dos domicílios, no grupo de crianças com SBID presença de coliformes fecais foi verificada em 80,8% das amostras de água analisadas.

Na enteropatia ambiental pode ser observada no intestino delgado atrofia vilositária, hiperplasia de criptas e infiltrado linfoplasmocitário em lâmina própria.⁵ Má absorção de macronutrientes e micronutrientes é caracterizada, essas disfunções digestivo-absortivas podem se associar à ocorrência de baixa estatura, em crianças de países em desenvolvimento.²⁴

Diferentes autores, que estudaram o comportamento de biomarcadores da enteropatia ambiental, em crianças expostas a condições de pobreza, no Nordeste do Brasil⁶ e em Bangladesh,²⁸ verificaram redução da ação de barreira intestinal e função absorptiva, a partir do aumento de permeabilidade intestinal, verificada por níveis séricos de zonulina⁶ e teste de absorção de lactulose e manitol,^{6,28} respectivamente. Também, verificou-se associação com a resposta inflamatória sistêmica induzida por produtos microbianos, como o LPS,⁶ os biomarcadores foram apresentados como fatores associados ao déficit de crescimento em crianças. Entretanto, esses são dados que precisam ser analisados com cautela, devido à complexidade dos mecanismos que envolvem a resposta inflamatória intestinal e sistêmica.²⁸

A maior suscetibilidade de crianças moradoras de favela a agravos nutricionais já está bem demonstrada na

literatura.^{7,9} Entretanto, os achados atuais demonstram, também, maior frequência de baixa estatura nutricional nos portadores de SBID, quando comparados com aqueles em SBID, ambos os grupos são expostos aos mesmos fatores de risco. Estudo feito em Bangladesh com 90 crianças em condições de pobreza, aos dois anos, verificou que o principal fator associado ao SBID foi a diminuição do escore Z de estatura para idade, em comparação com os parâmetros de nascimento, independentemente das crianças apresentarem ou não doença diarreica recente ou frequente.²⁹

Outro resultado que, assim como a baixa estatura, vem reforçar a ocorrência de síndrome disabsortiva, foi menores médias de hemoglobina verificadas no grupo de crianças com SBID. Outro estudo,³⁰ com crianças moradoras de favela, encontrou associação entre ocorrência de anemia e anormalidade na função intestinal, caracterizada por menor absorção de D-xilose.

É importante enfatizar a originalidade dos nossos achados, o que pode auxiliar no entendimento da disfunção entérica ambiental e suas consequências, mais precisamente a associação com o SBID e alterações na microbiota intestinal. Deve-se destacar a constatação de menores valores de estatura para idade e hemoglobina nas crianças com SBID, quando comparadas com aquelas sem SBID, mesmo provenientes de uma mesma favela urbana. Tal resultado pode sugerir que a exposição a microrganismos com alto potencial patogênico, aqui caracterizado pela maior frequência e contagem de *Salmonella*, em crianças com SBID, poderia representar um importante fator associado ao desenvolvimento de baixa estatura e anemia.

Ainda há muito a ser elucidado a respeito das comunidades bacterianas e suas interações com o organismo humano. Entretanto, a partir da hipótese de que indivíduos suscetíveis à contaminação bacteriana por espécies potencialmente patogênicas podem sofrer sérios prejuízos à saúde e nutrição, é necessário ressaltar a importância de políticas públicas que sejam efetivas para a melhoria das condições de moradia e saneamento básico da população vulnerável que desse modo contribuam para a erradicação da enteropatia ambiental.

Financiamento

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp).

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308:1635–8.
- Boojiink CC, Zoetendal EG, Kleerebezem M, de Vos WM. Microbial communities in the human small intestine: coupling diversity to metagenomics. *Future Microbiol*. 2007;2:285–95.
- Pyleris E, Giamarellos-Bourboulis EJ, Tzivras D, Koussoulas V, Barbatzas C, Pimentel M. The prevalence of overgrowth by aerobic bacteria in the small intestine by small bowel culture: relationship with irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci*. 2012;57:1321–9.
- Crane RJ, Jones KD, Berkley JA. Environmental enteric dysfunction: an overview. *Food Nutr Bull*. 2015;36:576–87.
- Owino V, Ahmed T, Freemark M, Kelly P, Loy A, Manary M, et al. Environmental enteric dysfunction and growth failure/stunting in global child health. *Pediatrics*. 2016;138:e20160641.
- Guerrant RL, Leite AM, Pinkerton R, Medeiros PH, Cavalcante PA, DeBoer M, et al. Biomarkers of environmental enteropathy, inflammation, stunting, and impaired growth in children in Northeast Brazil. *PLOS ONE*. 2016;11:e0158772.
- Mello CS, Tahan S, Melli LC, Rodrigues MS, de Mello RM, Scaletsky IC, et al. Methane production and small intestinal bacterial overgrowth in children living in a slum. *World J Gastroenterol*. 2012;18:5932–9.
- Gasbarrini A, Corazza GR, Gasbarrini G, Montalto M, Di Stefano M, Basilisco G, et al. Methodology and indications of H2-breath testing in gastrointestinal diseases: the Rome Consensus Conference. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009;29:1–49.
- Mello CS, Rodrigues MS, Araújo-Filho HB, Melli LC, Tahan S, Pignatari AC, et al. Gut microbiota differences in children from distinct socioeconomic levels living in the same urban area in Brazil. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016;63:460–5.
- World Health Organization (WHO). WHO Anthro Plus for personal computers manual: software for assessing growth of the world's children and adolescents. Geneva: WHO; 2009.
- World Health Organization (WHO). Iron deficiency anaemia – assessment, prevention and control. A guide for programme managers. Geneva: WHO/NHD/01.3; 2001.
- Leiby A, Mehta D, Gopalareddy V, Jackson-Walker S, Horvath K. Bacterial overgrowth and methane production in children with encopresis. *J Pediatr*. 2010;156:766–70.
- Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*. 2002;148:257–66.
- Xu P, Li M, Zhang J, Zhang T. Correlation of intestinal microbiota with overweight and obesity in Kazakh school children. *BMC Microbiol*. 2012;12:283–9.
- Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L, Palva A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol*. 2004;97:1166–77.
- Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, et al. Amplification of fan invA gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. *Mol Cell Probes*. 1992;6:271–9.
- Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ, Raangs GC, Kamphuis GR, Wilkinson MH, et al. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61:3069–75.
- Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Miyamoto Y, Takada T, Matsumoto K, et al. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68:5445–51.
- Huijsdens XW, Linskens RK, Mak M, Meuwissen SG, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40:4423–7.
- Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *J Clin Microbiol*. 1992;30:1654–60.
- Kato N, Kim SM, Kato H, Tanaka K, Watanabe K, Ueno K, et al. Identification of enterotoxin-producing *Clostridium perfringens* by the polymerase chain reaction. *Kansenshogaku Zasshi*. 1993;67:724–9.

22. Johnston C, Ufnar JA, Griffith JF, Gooch JA, Stewart JR. A real-time qPCR assay for the detection of the *nifH* gene of *Methanobrevibacter smithii*, a potential indicator of sewage pollution. *J Appl Microbiol*. 2010;109:1946–56.
23. Nakagawa T, Uemori T, Asada K, Kato I, Harasawa R. *Acholeplasma laidlawii* has tRNA genes in the 16S-23S spacer of the rRNA operon. *J Bacteriol*. 1992;174:8163–5.
24. Donowitz JR, Petri WA Jr. Pediatric small intestinal bacterial overgrowth in low-income countries. *Trends Mol Med*. 2015;21:6–15.
25. Rezaei S, Amirmozaffari N, Tabarraei B, Jeddi-Tehrani M, Zarei O, Alizadeh R, et al. Extraction, purification and characterization of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2011;3:3–9.
26. Lin A, Bik EM, Costello EK, Dethlefsen L, Haque R, Relman DA, et al. Distinct distal gut microbiome diversity and composition in healthy children from Bangladesh and the United States. *PLOS ONE*. 2013;8:e53838.
27. McCann KS. The diversity-stability debate. *Nature*. 2000;405:228–33.
28. Campbell RK, Schulze KJ, Shaikh S, Mehra S, Ali H, Wu L, et al. Biomarkers of environmental enteric dysfunction among children in rural Bangladesh. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017;65:40–6.
29. Donowitz JR, Haque R, Kirkpatrick BD, Alam M, Lu M, Kabir M, et al. Small intestine bacterial overgrowth and environmental enteropathy in Bangladeshi children. *MBio*. 2016;7:e02102–2115.
30. Mello CS, Tahan S, Melli LC, Rodrigues MS, Morais MB. Absorção intestinal de D-xilose e anemia em crianças escolares moradoras em um bolsão de pobreza (favela). *Rev Chil Nutr*. 2009; 36:976.