



ARTIGO ORIGINAL

Enteropatógenos associados com diarreia aguda em crianças*Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in children*

Margarete T. G. de Almeida¹, Regina M. da Silva², Laureluce M. Donaire³,
Luiz E. Moreira⁴, Marina B. Martinez⁵

Resumo

Objetivo: A fim de contribuir para um melhor conhecimento da distribuição de agentes etiológicos de diarreia em nosso país, determinou-se a prevalência de enteropatógenos em diarreia aguda de crianças de baixo nível sócio-econômico, moradoras de São José do Rio Preto e região,

Métodos: Foi realizado um estudo prospectivo em 196 crianças com menos de 5 anos de idade com diarreia aguda e em 33 sem diarreia, durante o ano de 1995, atendidas no Ambulatório Pediátrico do Hospital de Base de São José do Rio Preto - Hospital de atendimento secundário, ligado à Faculdade de Medicina, que dá assistência gratuita a pacientes da região, cuja maioria é de nível sócio econômico baixo (renda máxima familiar de 2 salários mínimos).

Resultados: Enteropatógenos foram identificados em 48% dos casos e em 27% dos controles. Foram isoladas do grupo diarreico, 41 amostras (21%) de *Shigella sp*, com maior prevalência em crianças maiores de 1 ano ($p < 0,01$). A frequência de amostras de EPEC foi de 10,7% nos casos. Não foram observadas diferenças significativas quanto à sua distribuição entre as diferentes faixas etárias. A frequência de *Salmonella* foi de 5,6% no grupo diarreico, sendo significativamente maior em crianças menores de 2 anos ($p < 0,05$). Os outros enteropatógenos estudados representaram 12% dos patógenos isolados dos casos diarreicos. No grupo controle, amostras de EPEC atípicas representaram 18,2% dos isolados. A análise de distribuição dos enteropatógenos durante as estações do ano mostra que é altamente significativa a distribuição da frequência dos mesmos nas diferentes estações do ano.

Conclusão: Uma maior prevalência de *Shigella* e *Salmonella* na primavera e verão foi observada, podendo-se concluir que, provavelmente, há uma relação desses patógenos com a temperatura e umidade do meio ambiente. Entre as crianças estudadas, amostras de *Shigella* e amostras diarreogênicas de *E. coli* (EPEC, ETEC, EA_gEC, EIEC) foram as bactérias que mais contribuíram como causa de diarreia, durante todo o ano.

J. pediatr. (Rio J.). 1998; 74(4):291-298: doença diarreica, diarreia aguda, enteropatógenos.

Abstract

Objective: Aiming a better understanding of the distribution of enteropathogens in Brazil, we have investigated the prevalence of enteropathogens in acute infantile diarrhea in children of low economic level from São José do Rio Preto, SP.

Methods: A prospective study with 196 children under age five, all with diarrhea, and 33 control subjects was conducted at Hospital de Base de São José do Rio Preto during 1995. This Hospital is associated to a Medicine School and offers free assistance to patients of low economic level who live in the area.

Results: Enteropathogens were identified in 48% of the cases and 27% of the controls. *Shigella* species were isolated in 21% of the cases, EPEC in 10.7%, *Salmonella* species in 5.6%. The other enteropathogens studied represented 12% of the isolate pathogens from case children. In the controls 18.2% of atypical EPEC were isolated. Isolation of *Shigella* species increased with increasing age of cases and peaked in spring, whereas EPEC was common in early infancy and peaked in spring and winter.

Conclusions: Among São José do Rio Preto children, *Shigella* species and diarrheogenic *E. coli* strains (EPEC, ETEC, EA_gEC, EIEC) were isolated throughout the year as a cause of diarrhea bringing children to a medical attention. Most of the pathogens were isolated in spring (mainly *Shigella* and *Salmonella*), so the temperature and humidity of the environment must be very important.

J. pediatr. (Rio J.). 1998; 74(4):291-298: diarrheal disease; acute diarrhea, enteropathogens.

1. Professora Assistente de Microbiologia da Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto.
2. Aluna de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.
3. Médica pediatra do Hospital de Base da Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto.
4. Biomédico do Setor de Microbiologia do Laboratório Central do Hospital de Base da Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto.
5. Professora Doutora do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), diarreia aguda é definida quando o número de evacuações líquidas for igual ou maior que três, ou uma única semi-líquida contendo muco e sangue, no período de 12 horas e quando a duração da mesma for menor que 15 dias. Os estudos infectológicos e epidemiológicos em áreas com

maior frequência de doença diarreica revelam que os agentes infecciosos bacterianos mais comuns são *Escherichia coli* (linhagens diarreio gênicas), *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *Campylobacter jejuni*, *Y. enterocolitica*.

Vários estudos sobre a etiologia das doenças diarreicas têm mostrado que a prevalência dos patógenos associados à diarreia varia amplamente com diversos fatores, tais como a classe sócio-econômica dos indivíduos em estudo, a localização geográfica, o tipo e o local de residência (zona urbana e rural), a idade da população estudada e as estações do ano¹⁻⁸. No Brasil, os principais estudos epidemiológicos de gastroenterites, utilizando técnicas apropriadas de isolamento e de identificação dos agentes, têm sido feitos principalmente com crianças de baixo nível sócio-econômico, moradoras na cidade de São Paulo - SP^{4,6,7,9-11}.

Na tentativa de contribuir para um melhor conhecimento da distribuição dos agentes etiológicos de diarreia no Brasil, o presente trabalho teve como principal objetivo pesquisar a etiologia das diarreias de crianças de baixo nível sócio-econômico, moradoras de São José do Rio Preto - SP e Região. Neste estudo foram pesquisados os seguintes enteropatógenos: *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *Y. enterocolitica*, *C. jejuni*, *C. coli* e *Aeromonas sp.* Além dos métodos clássicos de isolamento e identificação dos patógenos, foram utilizados métodos biológicos e moleculares para a pesquisa dos fatores de virulência nas amostras de *E. coli* isoladas dos grupos diarreico e controle.

Casuística e Métodos

Foram selecionadas para o estudo 196 crianças com diarreia aguda e 33 crianças sem sintomatologia gastrointestinal com idade variando de 1 mês a 5 anos. Essas crianças foram atendidas, entre fevereiro de 1992 e janeiro de 1993, no Ambulatório de Pediatria do Hospital de Base da Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto, hospital de atendimento gratuito a pacientes da região, cuja maioria tem nível sócio econômico baixo (renda familiar de até dois salários mínimos). Um caso de diarreia foi definido como uma criança com 3 ou mais episódios diarreicos em 24 horas, e, como controle, uma criança menor de 5 anos que não apresentava quadro diarreico a pelo menos um mês. A distribuição por faixa etária das crianças dos grupos diarreico e controle (Tabela 1) foi feita principalmente para se estudar a frequência de certos patógenos e poder compará-los com os dados encontrados na literatura^{4,6,7,9-11}.

Foram consideradas como casos (grupo diarreico) as crianças que apresentavam mais de três evacuações líquidas ou semi-líquidas, ou uma única evacuação semi-líquida, contendo muco e sangue no período de 12 horas, e, como controle (grupo controle), as crianças sem sintomas

Tabela 1 - Distribuição por faixa etária das crianças dos grupos diarreico e controle

Faixa Etária	Grupo diarreico	Grupo controle
30 d a 5 m	61 (31,12%)	9 (27,3%)
6 m a 11m	45 (22,95%)	8 (24,2%)
12 m a 23m	47 (24%)	9 (27,3%)
24 m a 5a	43 (21,93%)	7 (21,2%)
Total	196 (100,0%)	33 (100,0%)

d - dias; m - meses

a pelo menos um mês. O material fecal foi obtido entre o primeiro e décimo dia de diarreia, através de swabs retais, que após a colheita foi mantido em meio de transporte Cary-Blair até ser semeado, em meios apropriados, no setor de bacteriologia do Laboratório Clínico do Hospital de Base.

Todos os enteropatógenos com exceção de *Aeromonas sp.* foram pesquisados em todas as crianças. *Aeromonas sp.* foi pesquisada em 64 e em 33 amostras de fezes dos grupos diarreico e controle respectivamente.

Para o isolamento e identificação dos enteropatógenos foram utilizados os métodos clássicos¹⁴. Os meios de isolamento e as condições de cultivo em que as amostras foram semeadas estão relacionados na Tabela 2. Para a identificação dos sorogrupos das enterobactérias patogênicas foi utilizada a técnica de aglutinação em lâmina a partir de uma suspensão bacteriana, segundo técnica preconizada por Ewing¹⁵. Amostras identificadas bioquimicamente como *E. coli* eram submetidas às provas de aglutinação em lâmina, com anti-soros polivalente e monovalentes para os sorogrupos clássicos de *E. coli* (EPEC) O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O86, O126, O127, O128, O142, O158. As amostras que não aglutinavam com esses soros eram testadas com anti-soros contra EHEC O157 e com anti-soros polivalentes e monovalentes contra sorogrupos de EIEC O28ac, O29, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152, O164 e O167. Os soros hiperimunes, utilizados neste trabalho, foram fornecidos pela PROBAC do Brasil. Em 140 amostras de *E. coli*, isoladas dos casos e dos controles, foram pesquisados os seguintes fatores de virulência: adesão (EAF, eae, BFP), invasão (INV) e toxinas (LT, ST, SLT I e SLT II). A pesquisa desses fatores de virulência foi realizada pela Dra. Tania T. Gomes da EPM-Universidade Federal de São Paulo, através da técnica de hibridação de colônias, segundo Gomes⁴ e Maas¹⁶. Para a amostra INV positiva foi realizado o teste de Serény¹⁷, e, para as amostras toxinas positivas, foram realizados testes em cultura de células VERO e Y1 em monocamadas. As amostras pertencentes aos sorogrupos de EPEC foram classificadas em dois grupos, a saber, EPEC e EPEC atípicas (amostras pertencentes aos sorogrupos de EPEC, mas que não possuem os fatores de virulência das amostras clássicas).

Tabela 2 - Meios de cultura e condições de incubação para o isolamento dos diferentes patógenos bacterianos

Enteropatógenos	Meios de isolamento	Incubação		Tempo (horas)
		Temp. (°C)	Atm	
EPEC, ETEC, EIEC, EHEC, EaggEC	Ágar MacConkey	37	Normal	18-24
<i>Shigella sp</i>	Ágar MacConkey; SS	37	Normal	18-24
<i>Salmonella sp</i>	Ágar MacConkey; SS, Verde Brilhante após enriquecimento em caldo tetrionato	37	Normal	18-24
<i>Campylobacter sp</i>	Ágar Columbia com carvão ativado (1)	micro- aerofilia	42	48
<i>Y. enterocolitica</i>	Ágar MacConkey; Ágar SS	28	Normal	48
<i>Aeromonas sp</i>	Ágar sangue (5%) e ampicilina(10 ug/ml)	37	Normal	24

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica clássica; EAggEc - *Escherichia coli* enteroagregativa; ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica; EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasora; EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica.

As amostras identificadas bioquimicamente como *Salmonella sp*, *Shigella sp* e *Y. enterocolitica* foram sorotipadas com anti-soros segundo a técnica padrão (15). As colônias desenvolvidas em meio específico para *Campylobacter* foram submetidas à coloração de Gram e à pesquisa da catalase e da oxidase. A caracterização definitiva da espécie foi baseada na prova da hidrólise do hipurato e sensibilidade ao ácido nalidíxico¹⁴. Para a identificação de *Aeromonas*, submetemos as colônias crescidas em Ágar Sangue com ampicilina à coloração de Gram, às provas de produção de oxidase e de fermentação de açúcares¹⁴.

Para análise dos resultados, foi utilizado o teste Qui-quadrado, e, em todos os testes, fixamos em 0,05 ou 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade. Utilizamos a análise de dependência no estudo de associação entre os diferentes patógenos e as estações do ano¹⁸. Para a análise estatística da frequência da faixa etária, foram considerados todos os casos em que os enteropatógenos foram isolados, incluindo os casos de infecção mista.

Resultados

Das 196 crianças com diarreia, 94 (48%) apresentaram pelo menos 1 patógeno pesquisado, sendo que de 8 delas foram isolados 2 patógenos, com um total de 102 patógenos. Não foi encontrada infecção mista no grupo controle.

Na Tabela 3, estão descritos os patógenos isolados dos casos e dos controles. Dentre os enteropatógenos isolados dos casos diarreicos, *Shigella* foi o mais freqüente (21%),

seguida por EPEC (14,8%) e *Salmonella* (5,6%). Os outros agentes somados representaram 13,3%.

Os patógenos isolados foram encontrados com maior frequência no grupo diarreico, com exceção de *Aeromonas sp*. A diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Quanto aos patógenos EIEC, VTEC e *C. jejuni*, o dado não se aplica, pois o número de isolados não é expressivo.

Na Tabela 4, pode-se observar a distribuição da frequência dos enteropatógenos nas diferentes faixas etárias. Nas crianças de 1 a 5 meses de idade, o patógeno mais freqüente foi EPEC no grupo diarreico, correspondendo 43% dos casos. Nessa faixa etária, foram isolados 28% dos enteropatógenos encontrados em crianças com diarreia. Na faixa etária de 6 a 11 meses, o microrganismo mais freqüente foi ainda EPEC (38%), sendo 21% a frequência total de enteropatógenos no grupo diarreico.

No grupo diarreico com faixa etária acima de 12 meses, *Shigella* foi o agente enteropatogênico mais freqüente (58%). Se a faixa etária considerada for maior que 24 meses, amostras de *Shigella* representariam 71% das bactérias isoladas. Nessa faixa etária, 58% das crianças tinham pelo menos 1 patógeno.

Somente as amostras de *Salmonella sp* e de *Shigella sp* mostraram diferenças significantes quanto à distribuição nas diferentes faixas etárias ($p < 0,05$), sendo que *Salmonella sp* mostrou uma maior prevalência entre as crianças de 1 a 5 meses de vida e *Shigella sp* foi isolada com maior frequência em crianças com mais de 24 meses.

Tabela 3 - Prevalência de enteropatógenos nas fezes de 196 crianças com diarreia aguda e nas fezes de 33 crianças do grupo controle em São José do Rio Preto - SP

Enteropatógenos	Casos		Controle		
	Nº	%	Nº	(%)	
<i>Shigella sp</i>	41	21,0	0		
<i>S. flexneri</i>	35	17,9	0		
<i>S. sonnei</i>	6	3,1	0		
<i>Salmonella sp</i>	11	5,6	0		
<i>E. coli</i> diarreio gênica	42	21,5	7	21,2	(p < 0,01)
EPEC	21	10,7	0		
EPEC atípica	8	4,1	6	18,2	(p > 0,05)
EAggEc	6	3,1	0		
ETEC	5	2,6	0		
ST ⁺ /LT ⁺	3	1,5	0		
ST ⁺ /LT ⁻	2	1,1	0		
EIEC	1	0,5	0		
VTEC(SLT-I)*	1	0,5	1	3,0	
<i>Y. enterocolitica</i>	3	1,5	0		
<i>Aeromonas sp</i>	4	2,0	2	6,0	(p ³ 0,95)
<i>C. jejuni</i>	1	0,5	0		

EPEC - *Escherichia coli* enteropatógena clássica; EPEC atípica - Pertence a sorogrupo de EPEC mas não possuem os fatores de virulência(EAF e eae);EAggEc - *Escherichia coli* enteroagregativa; ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica; LT - toxina termolábil; ST - toxina termoestável; EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasora; VTEC - *Escherichia coli* produtora de verotoxinas.

* As amostras apresentaram o gene mas não expressaram a toxina (ensaio biológico negativo)

A pesquisa dos fatores de virulência por sondas genéticas, nas 140 amostras de *E. coli* isoladas do grupo diarreico e do controle, foi positiva para 38 amostras bacterianas, que possuíam um ou mais fatores de virulência (Tabela 5). A pesquisa dos fatores *eae*, EAF e BFP mostrou que 69% das amostras isoladas do grupo diarreico classificadas como

EPEC por sorologia, possuíam pelo menos dois desses fatores, característicos de EPEC, enquanto que nas amostras isoladas do grupo controle, não foi encontrado nenhum desses fatores. Este estudo permitiu detectar 13 (12,7%) patógenos que não o seriam pelos métodos tradicionais, a saber: 6 amostras de EAggEc, 5 amostras de ETEC e duas

Tabela 4 - Frequência de bactérias enteropatógenas nas fezes de crianças com diarreia aguda (d) e controle (c), nas diferentes faixas etárias

Enteropatógenos	Nº de Casos Positivos									
	Nº de Casos		30d-5m		6m-11m		12m-23m		> 24m	
	d	c	d	c	d	c	d	c	d	c
<i>Salmonella sp</i> ¹	11	0	5	0	3	0	3	0	0	0
<i>Shigella sp</i> ¹	41	0	6	0	6	0	12	0	17	0
<i>Y. enterocolitica</i> ²	3	0	1	0	0	0	2	0	0	0
EPEC e EPEC atípica ²	29	6	12	1	8	2	5	2	4	0
EAggEc ²	6	0	0	0	3	0	1	0	2	0
ETEC ²	5	0	2	0	1	0	2	0	0	0
EIEC	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
VTEC	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
<i>Aeromonas sp</i> ²	4	2	1	1	0	1	2	0	1	0
<i>Campylobacter sp</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Total	102	9	28	2	22	3	28	3	24	0

EPEC - *Escherichia coli* enteropatógena clássica; EPEC atípica - Pertence a sorogrupo de EPEC mas não possuem os fatores de virulência(EAF e eae); EAggEc - *Escherichia coli* enteroagregativa; ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica; LT - toxina termolábil; ST - toxina termoestável; EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasora; VTEC - *Escherichia coli* produtora de verotoxinas.

1- p ≤ 0,05; 2 - p > 0,05.

Tabela 5 - Pesquisa dos fatores de virulência em 140 amostras de *E. coli* isoladas de amostras de fezes de crianças com diarreia e controle, pesquisados por sondas genéticas

Nº de amostras de <i>E. coli</i>	Soro-grupos	<i>eaeA</i>	EAF	<i>bfpA</i>	LT	ST	SLT I e SLT II	INV	Ag
8	O119	7*	7	7	-	-	-	-	-
4	O111	4	4	4	-	-	-	-	-
3	O55	3	3	3	-	-	-	-	-
5	O128	4	4	3	-	-	-	-	-
1	O26	1	-	-	-	-	-	-	-
5	O127	3	3	3	-	-	-	-	-
1	O158	-	-	-	-	-	-	-	-
3	O125	-	-	-	-	-	-	-	-
1	O114	-	-	-	-	-	-	-	-
4	O86	-	-	-	-	-	-	-	-
1	O124	-	-	-	-	-	-	1	-
104	NT	-	-	-	2	5	2	-	6

eaeA - sonda para detectar genes cromossomais que codificam a proteína Intimina.
 EAF - sonda para detectar genes do plasmídeo EAF de EPEC.
bfpA - sonda para detectar genes que codificam pili de EPEC.
 LT - sonda para detectar genes que codificam toxina termo-lábil de ETEC.
 ST - sonda para detectar genes que codificam toxina termo-estável de ETEC.
 SLT I/II - sonda para detectar genes que codificam VERO toxinas (Shiga-like toxin).
 Inv - sonda para detectar genes do plasmídeo de invasão de *Shigella sp.*
 Ag - sonda para detectar genes do plasmídeo de EAggEC.
 NT - não tipáveis com os soros estudados.
 * - número de amostras positivas.

VTEC, uma no grupo diarreico e outra no grupo controle.

A distribuição dos casos e controles durante o estudo foi de 14 % no verão, 9% no outono, 29% no inverno e 48% na primavera. Podemos observar na Figura 1 a influência das diferentes estações do ano na prevalência dos enteropatógenos isolados neste estudo. A prevalência da distribuição dos enteropatógenos nas diferentes estações do ano foi altamente significativa (p<0,001).

Discussão

Os resultados obtidos mostraram que o agente mais freqüente entre as crianças com diarreia foi *Shigella sp*

(21%) seguido por EPEC (10,7%) e por *Salmonella* (5,6%). Os dados demonstram que *Shigella sp* é um importante agente de diarreia na região estudada. Essa bactéria é um enteropatógeno clássico, cuja importância na diarreia endêmica em crianças tem sido demonstrada por diversos autores, tanto no Brasil como em outros países^{3,5-7,19,20}. Das 41 amostras de *Shigella* isoladas, 35 (85%) foram identificadas como *S. flexneri* e 6 (15%) como *S. sonnei*. Esses dados vão ao encontro dos resultados encontrados na literatura, pois nos países subdesenvolvidos há uma prevalência de *S. flexneri*, enquanto que nos países desenvolvidos, *S. sonnei* é a espécie mais isolada^{7,19,21-25}.

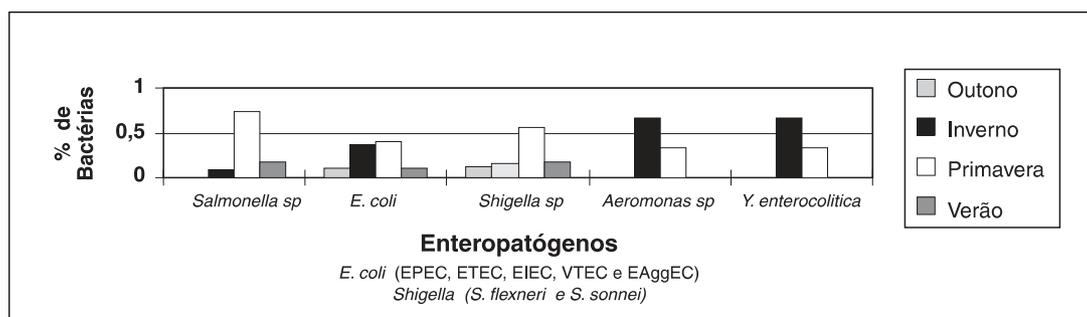


Figura 1 - Distribuição dos enteropatógenos isolados das crianças com diarreia aguda nas diferentes estações do ano (p<0,001)

Diversos estudos mostram que EPEC é um agente importante de diarreia em crianças nos grandes centros urbanos de países subdesenvolvidos^{4,6,7,10,11,26}. Em centros urbanos menores e em áreas rurais, esse grupo de bactérias parece ocorrer numa frequência bem menor^{3,7,19,27}. Os resultados do presente trabalho vêm corroborar os encontrados nos menores centros. A prevalência de EPEC foi de 10,7% nas crianças com diarreia, enquanto que nos grandes centros temos uma frequência em torno de 27%^{4,7,10}. Não se têm ainda explicações definitivas para tal fato, porém a causa mais provável seria uma maior exposição das crianças que vivem em grandes centros aos fatores de riscos (creches, hospitalizações, saneamento básico precário, entre outros).

O sorogrupo de EPEC mais isolado do grupo diarreico foi O119, seguido do O111 e O128 (Tabela 5), os quais não foram encontrados no grupo controle. A identificação de uma amostra de EPEC é feita tradicionalmente através da pesquisa dos antígenos. Através da pesquisa dos fatores de virulência foi possível determinar quais amostras de *E. coli* pertencentes aos sorogrupos de EPEC possuíam os fatores característicos do grupo, a saber: adesão íntima seguida da destruição das microvilosidades dos enterócitos¹³. Algumas das amostras anteriormente classificadas como EPEC, hoje estão no grupo das EAggEc, EHEC, muitas não são patogênicas ou ainda os fatores de virulência não foram determinados. No Simpósio Internacional de EPEC, realizado em São Paulo - SP em 1995, dividiu-se EPEC em dois grupos: EPEC e EPEC atípica. No presente trabalho, 35 amostras de *E. coli* pertencente aos sorogrupos de EPEC foram isoladas, porém somente 21 (60%) possuíam genes que codificam os fatores de virulência de EPEC (eae, EAF e/ou BFP), todas elas isoladas do grupo diarreico. Para o diagnóstico definitivo de EPEC deveria, então, se pesquisar os fatores de virulência, porém, a sorotipagem para a pesquisa do antígeno O é o único método ainda disponível de detecção de EPEC.

E. coli enterotoxigênica é uma das principais causas de diarreia infantil em países subdesenvolvidos. Nossos resultados revelaram uma pequena frequência desse colibacilo em crianças com diarreia (2,6%). Nossos dados divergem de vários autores, que encontraram uma prevalência que variava de 6% à 44%^{4,6,7,10,28}. Essas variações podem ser devida às diferenças de áreas geográficas, de nível sócio econômico ou nas técnicas de detecção. Esse enteropatógeno não possui características bioquímicas ou antigênicas que o diferenciam dos outros colibacilos. O diagnóstico de uma ETEC é feito pela pesquisa dos genes que codificam as toxinas ou pela pesquisa das mesmas através de métodos biológicos, portanto na rotina laboratorial ainda não é possível os laboratórios realizarem a pesquisa deste agente.

E. coli enteroagregativa foi isolada em 3% da população com diarreia estudada. A importância dessa bactéria como agente de diarreia ainda está em discussão, alguns trabalhos, realizados em diferentes locais geográficos, relatam a presença dessa bactéria como agente de diarreia,

que pode ser sanguinolenta ou não, aguda ou protraída²⁹⁻³¹. Já outros não têm mostrado associação entre EAggEc e diarreia^{9,32,33}. No presente trabalho, não foram encontradas amostras de EAggEc em fezes do grupo controle. A pesquisa desse agente também não é feita de rotina, pois a caracterização desse patógeno é feita pela pesquisa dos genes presentes em um plasmídeo de 60 Mda. Algumas amostras de EAggEc pertencem a sorogrupos de EPEC (O44, O55, O86, O111 e O126) outras não, mas produzem a doença por mecanismos distintos daqueles de EPEC¹³.

As outras amostras de *E. coli* diarreio gênicas EIEC e EHEC não tiveram um papel importante como agente de diarreia em nosso estudo. A primeira foi isolada apenas de um caso. A maioria dos estudos, em nosso meio, mostrou que esse patógeno não é comumente isolado^{6,7,10}, porém, Toledo e col.³⁴ em estudo com crianças com diarreia que viviam em favelas na grande São Paulo - SP, encontraram uma frequência de 15,9% de EIEC. Quanto à presença de EHEC (*E. coli* O157:H7), não temos relatos de isolamento deste microrganismo à partir de fezes humanas, de animais ou de alimentos em nosso país. Amostras de *E. coli* produtoras de verotoxinas já foram isoladas^{35,36}, porém com baixa atividade citotóxica (<1/10). No presente trabalho, duas amostras foram detectadas através da pesquisa de genes que codificam a verotoxina, contudo não mostraram atividade citotóxica em células VERO. A frequência desse patógeno, em países desenvolvidos, aproxima-se da frequência de *C. jejuni* e *Salmonella*^{37,38}. O Japão está atravessando, no momento, um grande surto, mais de 8.000 pessoas já foram contaminadas, com alta taxa de mortalidade.

A prevalência de *Salmonella sp* entre as crianças com diarreia foi de 5,6%, o isolamento foi significativamente maior na população menor que dois anos, dados estes concordantes com alguns estudos^{3,6,7}. A frequência de isolamento desse microrganismo tem mostrado oscilações de ano para ano. Em 1968, Taunay³⁹ mostrou que, entre 1956 a 1964, a prevalência desse patógeno caiu de 15% para 5% em crianças com diarreia. Em estudos mais recentes a taxa de isolamento variou de 2,9% à 10,4%^{4,6,7,40}.

A frequência de isolamento de *C. jejuni* encontrada neste trabalho (0,5%) é discordante da maioria dos relatos encontrados na literatura^{4,6,40}. Em um estudo mais recente no Brasil, a frequência desse patógeno foi comparável à nossa (comunicação pessoal). Um dos maiores reservatórios naturais desta bactéria é o frango, atualmente porém, não se tem isolado com facilidade *C. jejuni* dessa fonte, talvez devido à administração de grandes doses de antibióticos pelos criadores. Acreditamos, portanto, que esteja havendo uma diminuição da prevalência dessa bactéria em nossa população.

Y. enterocolitica foi isolada de três crianças (1,5%) do grupo diarreico. No Brasil, a frequência desse patógeno normalmente é baixa^{6,7,41,42}. Esse microrganismo tem sido relatado como importante causa de diarreia em países de clima frio. Surto têm sido descritos no norte da Europa,

Japão, Canadá e Estados Unidos^{43,44}. No Brasil há relatos de surtos no Paraná e no Rio de Janeiro (comunicação pessoal).

A importância de *Aeromonas sp* nas infecções gastrointestinais ainda é incerta, mesmo após elas terem sido implicadas como causa de gastroenterite em crianças e em adultos^{45,46}. Porém, a frequência dessa bactéria foi muito pouco estudada em grupos controles. Em nosso estudo, a prevalência desse microrganismo dentre as crianças do grupo diarreico não foi significativa. Esses dados concordam com os realizados por Elias Jr.⁴⁷, que estudando 1010 crianças (505 casos e 505 controles) encontrou uma frequência de 1,4% e 0,8% respectivamente.

A análise da distribuição dos enteropatógenos durante as estações do ano, através do ANADEP segundo Cordeiro¹⁸, nos mostra que amostras de *Shigella*, *Salmonella* e *E. coli* estão presentes em maior prevalência na primavera, principalmente as duas primeiras, podendo-se concluir que provavelmente há uma relação desses patógenos com a temperatura e umidade do meio ambiente. Em relação às amostras de *E. coli* enteropatógenas, praticamente, elas são as únicas com uma grande prevalência no inverno.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer à Sra. Sonia R. C. Buratto e à Srta. Carla R. Taddei pelo auxílio técnico prestado na identificação das bactérias. À Profa. Dra. Tania T. Gomes da EPM - Universidade Federal de São Paulo, pela pesquisa dos fatores de virulência nas amostras de *E. coli*.

Referências bibliográficas

- Black RE, Brown KN, Becker S, Alim ARMA, Huq I. Longitudinal studies of infectious diseases and physical growth of children in rural Bangladesh. II - Incidence of diarrhea and association with known pathogens. *Am J Epidemiol* 1982; 115:315-24.
- Echeverria P, Taylor DN, Lexomboon U et al. Case-control study of endemic diarrheal disease in Thai children. *J Infect Dis* 1989;159:543-8.
- Falcão DP. Estudo bacteriológico de infecções entéricas em crianças com até 2 anos no Município de Araraquara - S. Paulo. *Rev Microbiol (São Paulo)* 1972;3:127-38.
- Gomes TA, Rassi V, MacDonald KL, Ramos SR, Trabulsi LR, Vieira MA et al. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. *J Infect Dis* 1983; 148:986-97.
- Guerrant RL, Kirchhoff LV, Shields DS, Nations MK, Leslie J, de Sousa MA et al. Prospective study of diarrheal illnesses in northeastern Brazil: patterns of disease, nutritional impact, etiologies and risk factors. *J Infect Dis* 1983;148:986-97.
- Kitagawa SMS, Toledo MRF, Trabulsi LR, Ramos SRTS, Murahovich J, Fagundes Neto U, Candeias JAN. Etiologia da diarreia infecciosa endêmica, da criança de baixo nível sócio-econômico em São Paulo. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35:1013-22.
- Trabulsi LR, Toledo MRF, Ceballos BSO, Candeias JAN. Epidemiology of diarrheal diseases in South America. In: Tzipori S. ed. *Infectious diarrhea in the young*. New York: Elsevier Science, 1985; p. 121-5.
- Zaki AM, DuPont HL, El Alamy MA, et al. The detection of enteropathogens acute diarrhea in family cohort population in rural Egypt. *J Infect Dis* 1992; 166:792-96.
- Gomes TAT, Blake PA, Trabulsi LR. Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. *J Clin Microbiol* 1989;27:266-9.
- Toledo MRF, Alvariza MCB, Murahovchi J, Ramos SRTS, Trabulsi LR. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. *Infect Immun* 1983;39: 586-9.
- Trabulsi LR, Manissadjian A, Oliveira-Penha HA, Liberatore R, Duallibe L, Camargo B, Peixoto ES. Diarreias infantis por colibacilos enteropatógenos. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1961;3:267-70.
- Salyers AA, Whitt DD. *Bacterial Pathogenesis. A molecular approach*. Washington: American Society for Microbiology, 1994. 418 p.
- Law D. Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1984;7:157-73.
- Farmer III JJ, Kelly MT. Enterobacteriaceae. In: Balows A, Hausler Jr WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. *Manual of Clinical Microbiology*. 5ª ed., Washington: American Society for Microbiology; 1991. p.360-83.
- Edwards PR, Ewing WH. *Identification of Enterobacteriaceae*. 3ª ed. Minneapolis: Burgess;1972. p.536.
- Mass R. An improved colony hybridization method with significantly sensitivity for detection of single genes. *Plasmid* 1983;10:296-8.
- Sereny B. Biochemical reactions and virulence of *E. coli* O124:K72(B17). *Acta Microbiol Acad Sci Hung* 1963;10:11-8.
- Cordeiro J. A. *Análise de Dependência*. São José do Rio Preto: UNESP, 1990:129.
- Blaser MJ, Pollard RA, Feldman RA. *Shigella infections in the United States 1974-1980*. *J Infect Dis* 1983;147:771-5.
- Mikhail IA, Fox E, Haberberger RL, Ahmed MH, Abbatte EA. Epidemiology of bacterial pathogens associated with infectious diarrhea in Djibouti. *J Clin Microbiol* 1990; 28:956-61.
- Coelho MFC, Leal NC, Hofer E, Rodrigues DP. Etiologia bacteriana nos processos entéricos agudos infantis em Recife-PE. Livro de Resumos do XVII Congresso Brasileiro de Microbiologia; 1993. 7-11 de novembro; Santos (SP, Brasil). Santos: SBM, 1993:B7 121.
- Gargia MJ. Aislamiento de *Clostridium difficile* *Campylobacter fetus* sub espécie *jejuni* e *Yersinia enterocolitica* desde diarreia aguda. *Bol Inst Salud Publ Chile* 1982;23:10-5.
- Leksomboon U, Echeverria P, Suvongse C, Duangmani C. Viruses and bacteria in Thailand: a study of multiple antibiotic-resistant enteric pathogens. *Am J Trop Med Hyg* 1981; 30:1281-90.
- Sanyal SC, Sen PC, Tiwari IC, Bhatia BD, Singh S. Microbial agents in stools of infants and young children with and without acute diarrhoeal disease. *J Trop Med Hyg* 1977; 80:2-8.

25. Veloso N, Figueiroa A, Dias A, Filgueiras AL, Hofer E. *Campylobacter* e outros enteropatógenos em processos diarreicos infantis no Recife. Livro de Resumos do XVII Congresso Brasileiro de Microbiologia; 1993. 7-11 de novembro; Santos (SP, Brasil). Santos: SBM, 1993:B7 115.
26. Levine MM, Edelman R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of serotypes associated with infant diarrhea. *Epidemiology and Pathogenesis*. *Epidemiol Rev* 1984;8:31-61.
27. Montelli AC, Trabulsi LR. Diarréias causadas por *Shigella*, *Salmonella* e *E. coli* enteropatogênica no município de Botucatu, São Paulo. *Rev Assoc Med Bras* 1970;16: 23-6.
28. Guerrant RL, Moore RA, Kirchenfeld PM, Sande MA. Role of toxigenic and invasive bacteria in acute diarrhea of childhood. *New Engl J Med* 1975;293:567-73.
29. Baqui AH, Bradley Sack R, Black RE, et al. Enteropathogens associated with acute and persistent diarrhea in Bangladeshi children < 5 years of age. *J Infect Dis* 1989;159:1061-64.
30. Bhan MK, Raj P, Levine MM, et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. *J Infect Dis* 1985;151:471-75.
31. Mathewson JJ, Johnson PC, DuPont HL et al. A newly recognised cause of travelers' diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*. *Gastroenterology* 1993;105:1724-31.
32. Giron JA, HO ASY, Schoolnik GK. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 1991;254:710-3.
33. Echeverria P. Tissue culture-adherent *Escherichia coli* in infantile diarrhea. *J Infect Dis* 1992;165:141-3.
34. Toledo MRF, Trabulsi LR. Frequency of enteroinvasive *Escherichia coli* in children with diarrhea and healthy controls in São Paulo, Brazil. *Rev Microbiol (São Paulo)* 1990;21:1-4.
35. Giraldo R, Guth BEC, Trabulsi LR. Production of Shiga-like toxin among *Escherichia coli* strains and other bacteria isolated from diarrhea in São Paulo, Brazil. *J Clin Microbiol* 1990;28:1460-2.
36. Marques LRM, Moore MA, Wells JG, Wachsmuth IK, O'Brien AD. Production of Shigella-like toxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1986;154:338-41.
37. Bégué RE, Neill MA, Papa ES, Dennehy PH. A prospective study of Shiga-like toxin associated diarrhea in a pediatric population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994;19: 164-9.
38. Bokete TN, Oçallahan CM, Clausen CR et al. Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* in Seattle children: a prospective study. *J Infect Dis* 1991; 163:660-663.
39. Taunay AE. Diagnóstico bacteriológico das salmonelas de origem animal, sua importância e frequência no município de São Paulo. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1968; 28:43-69.
40. Pavan MFB, Mamizuka EM, Martinez MB. *Campylobacter* termofílico em fezes de crianças com diarreia: estudo com controles. *Rev Microbiol (São Paulo)* 1987;18:243-8.
41. Falcão DP. Yersiniosis in Brazil. *Contrib Microbiol Immunol* 1987;9:68-75.
42. Martinez MB, Moura RAA. *Yersinia enterocolitica* em fezes de crianças com diarreia aguda. *Rev Microbiol (São Paulo)* 1984;15:33-4.
43. Johnson RH. *Yersinia* infections. *Curr Sci* 1992;5:654-8.
44. Lee LA, Taylor J, Carter GP et al. *Yersinia enterocolitica* O:3: an emerging cause of pediatric gastroenteritis in the United States. *J Med Microbiol* 1992; 37:315-318.
45. Gluskin I, Batash D, Shoseyov D, Mor A, Kazak R, Azizi E et al. A 15 year study of the role of *Aeromonas spp.* in gastroenteritis in hospitalised children. *J Med Microbiol* 1992; 37:315-318.
46. King EO. Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related *Vibrio*. *J Infect Dis* 1957;101:119-22.
47. Elias Junior, VP. *Aeromonas*: prevalência, avaliação do fenômeno suicida e dos marcadores de virulência de espécies isoladas de crianças com gastroenterite aguda e controle. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 1992: 185.

Endereço para correspondência:

Dra. Marina B. Martinez
 Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - B17 - Cidade Universitária
 CEP 05508-900 - Butantan - São Paulo - SP - Brasil
 Email: mbmartin@usp.br