



## ARTIGO ORIGINAL

## ***Diarréia aguda em crianças menores de 3 anos de idade: recuperação de enteropatógenos nas amostras fecais de pacientes comparada à de grupo controle***

*Acute diarrhea in children less than 3 years of age: Enteropathogens isolated in patients' stools, compared with a control group*

Mauro Sérgio Toporovski<sup>1</sup>, Igor M. Mimica<sup>2</sup>, Pedro Paulo Chieffi<sup>3</sup>, Maria Aparecida Paschoalotti<sup>4</sup>, Angela Maria Gigliardi Dias<sup>5</sup>, Cely Barreto Silva<sup>6</sup>

### Resumo

**Objetivos:** Observar a ocorrência dos diferentes agentes etiológicos de diarréia aguda (DA) comparando a excreção fecal dos mesmos em pacientes e crianças do grupo controle.

**Material e métodos:** Foram estudadas 100 crianças com DA e 100 controles menores de 3 anos de idade no período de novembro de 93 a maio de 94. Foram colhidas amostras de fezes em ambos os grupos, pesquisando-se os seguintes enteropatógenos: *Rotavirus*, *Escherichia coli* (EPEC, ETEC, EIEC, EHEC), *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Campylobacter jejuni*, *C.coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Cryptosporidium sp*, *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica*. A análise estatística foi realizada pelo Teste exato de Fisher (nível de significância  $p < 0,05$ ). A idade média foi de 12,5 meses, com maior prevalência de DA nos menores de seis meses (35%). As crianças foram atendidas em Pronto Socorro no quinto dia, em média, após o início do evento diarreico. Procediam em sua maioria de residências dotadas de saneamento básico. Predominou diarréia aquosa sobre mucossanguinolenta na razão de 4:1.

**Resultados:** O *Rotavirus* foi o agente mais detectado, 21% no grupo com diarréia e 3% nos controles ( $p = 0,0001$ ). A *Shigella sp* foi isolada em 7% no grupo com diarréia e em nenhum caso nos controles ( $p = 0,0140$ ). A *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) foi detectada em 13% dos casos de DA e em 7% nos controles ( $p = 0,2381$ ), porém os sorogrupos clássicos O55, O111, O119 foram isolados apenas nos portadores de diarréia. Os demais enteropatógenos não atingiram freqüências elevadas, ou foram detectados na mesma proporção em ambos os grupos. O *Rotavirus* e EPEC foram os agentes mais detectados nas diarréias aquosas, enquanto a *Shigella sp* foi o agente predominante nas diarréias mucossanguinolentas.

**Conclusões:** O *Rotavirus* foi o agente mais comum determinante de DA. A detecção de *Rotavirus* e *Shigella sp* quase exclusivamente em pacientes com DA confirmam a maior patogenicidade desses agentes etiológicos, em relação aos demais pesquisados. A pesquisa de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) por soros polivalentes não confirma o respectivo potencial diarreio gênico, por ser isolada em proporção não significativamente superior nos pacientes com DA. A utilização dos antisoros monovalentes possibilitou a detecção dos clássicos sorogrupos de EPEC (O111, O119, O55) exclusivamente nas amostras de pacientes com DA, confirmando a característica patogenicidade das mesmas.

*J. pediatr. (Rio J.). 1999; 75(2):97-104: diarréia infantil, enteropatias parasitárias.*

### Abstract

**Objectives:** To observe the occurrence of different etiological agents of acute diarrhea (AD) in stool specimens of patients and children in a control group.

**Material and Methods:** 100 children less than three years of age with AD were studied as well as 100 controls, between November 1993 and May 1994. Stool specimens were collected in both groups and the following enteropathogens were searched for: *Rotavirus*, *Escherichia coli* (EPEC, ETEC, EIEC, EHEC), *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Cryptosporidium sp*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*. Statistical analysis using the exact Fisher test (at significance level  $p < 0,05$ ) was done. The mean age was 12,5 months, with more cases in patients less than 6 months (35%). Children were seen at the emergency section on an average fifth day after the start of the diarrhea. Most came from homes with basical sanitary conditions. Watery diarrhea was more frequent than bloody diarrhea with mucus, at a proportion of 4:1.

**Results:** *Rotavirus* was the most frequent agent: 21% in the AD group and 3% in the control group ( $p = 0,0001$ ). *Shigella sp* was isolated in 7% of the AD group and none of the control group ( $p = 0,0140$ ). EPEC was detected in 13% of AD cases and 7% in the control group ( $p = 0,2381$ ) but the classical subgroups O55, O111, O119 were only isolated from the patients with AD. The other enteropathogens were infrequently detected or in equal proportion in both groups. *Rotavirus* and EPEC were the more frequently isolated agents in watery diarrhea, while *Shigella sp* was the predominant agent found in bloody stools with mucus.

**Conclusions:** *Rotavirus* was the most common causative agent in AD. The detection of *Rotavirus* and *Shigella sp* nearly exclusively in patients with AD confirms the high pathogenicity of these etiological agents when compared to the others. *Escherichia coli* (EPEC) diagnosed by polyvalent sera does not confirm its respective diarreiogenic property due to isolation in the same proportion among patients with AD and controls. Monovalent antisera made possible the detection of classical subgroups of EPEC O111, O119, O55 isolated only from AD patients, confirming the already known high pathogenicity of these strains.

*J. pediatr. (Rio J.). 1999; 75(2):97-104: infantile diarrhea, parasitic enteropathies.*

1. Professor Doutor em Pediatria, assistente da disciplina de Gastroenterologia Pediátrica da FCM da Santa Casa de São Paulo.
2. Professor Pleno da disciplina de Microbiologia do Departamento de Ciências Patológicas da FCM da Santa Casa de São Paulo.
3. Professor Pleno da Disciplina de Parasitologia do Departamento de Ciências Patológicas da FCM da Santa Casa de São Paulo.
4. Professora Instrutora da Disciplina de Parasitologia do Departamento de Ciências Patológicas da FCM da Santa Casa de São Paulo.
5. Microbiologista do Setor de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo.
6. Técnica em Microbiologia do Serviço de Controle de Infecções da Santa Casa de São Paulo.

## Introdução

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define diarréia aguda (DA) como alteração repentina do hábito intestinal, caracterizada pela ocorrência de evacuações líquidas em três ou mais episódios em 24 horas, ou uma única semi-líquida contendo muco e sangue em 12 horas. A duração da mesma não deve exceder o prazo de 15 dias<sup>1</sup>.

Na infância, a diarréia aguda é provocada em geral por um agente infeccioso, que, ao colonizar o trato intestinal, determina má absorção de água, eletrólitos e nutrientes. Embora o aspecto temporal seja considerado arbitrário, o processo deve apresentar, na maior parte dos casos, uma evolução autolimitada, não excedendo o prazo de 15 dias, tempo considerado suficiente para depuração do agente causal e restabelecimento das funções absorptivas<sup>2</sup>.

Em todo o continente latino-americano, a DA constitui importante problema de saúde pública, especialmente na população infantil com menos de 3 anos de idade, em que se registram, em média, de 5 a 10 episódios diarréicos anuais<sup>1</sup>. Abandono precoce do aleitamento natural, baixo nível educacional, más condições higiênico-sanitárias e falta de refrigeradores nos domicílios contribuem para a elevada incidência de DA nos países em desenvolvimento. Nessas populações, prevalecem os processos diarréicos bacterianos frente aos virais<sup>2,7</sup>.

Nas últimas duas décadas, avanços foram alcançados no reconhecimento de novos agentes etiológicos produtores de DA, assim como foram melhor elucidados os mecanismos pelos quais as infecções entéricas produzem efeitos disabsortivos. O emprego de novas técnicas laboratoriais para detecção etiológica resultam, atualmente, em identificação positiva para patógenos em 50 a 84% das crianças e adultos com doença diarréica aguda<sup>2,3</sup>.

A quase totalidade dos estudos publicados em nosso meio até então foi realizada em populações extremamente carentes, desprovidas de saneamento básico, nas quais o bacilo *Escherichia coli* enteropatogênico (EPEC) apresenta-se como principal agente etiológico de diarréia aguda na infância, em taxas percentuais que variam de 20 a 40%<sup>4,5</sup>.

A partir da década de 80, o *Rotavirus* emerge como um dos principais agentes etiológicos determinante de diarréia nas populações infantis tanto em países industrializados como naqueles em desenvolvimento. O quadro diarréico determinado pelo *Rotavirus* freqüentemente associa-se à presença de vômitos, acarretando, em muitos casos, dificuldades na condução da terapia de hidratação oral<sup>6,7</sup>.

Estudos mais recentes demonstram que a infecção pelo *Cryptosporidium sp* determina diarréia aguda de caráter aquoso profuso, não somente em pacientes imunodeprimidos como nos imunocompetentes, especialmente crianças nos primeiros anos de vida<sup>8</sup>.

Nos últimos anos, na Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, verifica-se atendimento crescente de população com marcadores sócio-econômi-

cos mais favoráveis, com renda familiar média entre 3 e 4 salários mínimos, residente em sua maioria em casas de alvenaria dotadas de infra-estrutura sanitária, registrando-se igualmente alto percentual de lares com refrigeradores. Os dados acima mencionados motivaram os autores a estudar os aspectos epidemiológicos e etiológicos da doença diarréica infantil em nosso meio.

O objetivo básico deste estudo consiste em identificar e comparar a presença dos diferentes enteropatógenos nas amostras fecais de pacientes portadores de diarréia aguda e dos integrantes do grupo controle.

## Material e Métodos

Foram estudadas 100 crianças de ambos os sexos com idades compreendidas entre 0 e 3 anos, acometidas de diarréia aguda, atendidas no Pronto Socorro Infantil do Departamento de Pediatria da F.C.M. Santa Casa de São Paulo, no período de novembro de 1993 a maio de 1994. O grupo controle foi constituído de 100 crianças de ambos os sexos e mesma faixa etária, acompanhadas no ambulatório de Puericultura, não portadoras de doença diarréica ou sintomas gastroenterológicos pelo prazo mínimo de 30 dias. Para cada caso que integrou o grupo de pacientes com doença diarréica, selecionou-se, no mesmo período semanal, um integrante da população controle.

O levantamento dos dados clínicos e epidemiológicos incluiu os seguintes dados: idade; sexo; duração da diarréia até a efetivação da consulta; aspecto das fezes; freqüência das evacuações e registro de vômitos nas 24 horas que antecedem à consulta; presença de febre; classificação do estado nutricional, através do critério de Gomez<sup>9</sup>, tomando-se como referência a curva de desenvolvimento pôndero-estatural publicada pelo *National Center Health Statistics (NCHS)*<sup>10</sup>; classificação do grau de desidratação; procedência do paciente (creche ou domicílio); contato com doença diarréica no mesmo período; dados epidemiológicos obtidos em ambos os grupos (tipo de domicílio, saneamento básico, relação do número de habitantes por cômodo, renda mensal familiar).

Foram excluídos os pacientes com diarréia por período superior a 15 dias de duração, com internação hospitalar por qualquer patologia, e aqueles submetidos a tratamento antimicrobiano ou antiparasitário nos 30 dias antecedentes à consulta.

As amostras de fezes foram colhidas por sonda retal de polivinil de números 6 a 10, sendo encaminhadas para análise microbiológica e parasitológica. Para o grupo controle, colheu-se semanalmente o mesmo número de amostras fecais, durante o momento da entrevista com o acompanhante.

O isolamento das enterobactérias foi obtido por semeadura do material fecal em meio de MacConkey, XLD e Karmali a 37°C, em temperatura ambiente e a 4°C. Todas as colônias com crescimento positivo nos diferentes meios foram isoladas e identificadas de acordo com a seguinte série de reações para diagnóstico diferencial: indol, citra-

to, motilidade, fenilalanina, produção de gás, glicose, H<sub>2</sub>S, lactose e vermelho de metila.

As cepas de *Escherichia coli* foram aglutinadas com soros polivalentes (PROBAC do BRASIL) para efetivação do diagnóstico diferencial de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) clássica A, clássica B, clássica C, *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC) A, EIEC B e *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). As cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica e *Escherichia coli* enteroinvasora foram aglutinadas com os respectivos soros monovalentes (PROBAC do BRASIL). As cepas de EPEC, sorogrupos O55, O111 e O119 foram testadas com os antisoros flagelares H2, H6 e H7 (PROBAC do BRASIL).

Todas as colônias de *Escherichia coli* isoladas foram incubadas em meio TSB (*trypticase soy broth*) e transportadas para o Instituto Adolfo Lutz para a pesquisa de produção de toxinas termolábil (método de hemaglutinação indireta segundo técnica descrita por Ricci & Castro, 1986<sup>11</sup>) e termoestável (técnica descrita por Dean et al., 1972<sup>12</sup>).

As *Shigella sp* foram aglutinadas com os antisoros específicos (PROBAC do BRASIL) para realizar-se o diagnóstico diferencial entre as variedades *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* e *Shigella sonnei*.

Para classificação diagnóstica das cepas de *Salmonella sp* isoladas, as mesmas foram aglutinadas com os respectivos antisoros somáticos e flagelares: *Salmonella* Grupo C2, S. Grupo C1 (*S. choleraesuis* 6,7 c1,5), S. Grupo B (*S. typhimurium* 1-4-5-12i-1-2), S. Grupo A (*S. paratyphi* 1-2-12), S. Grupo D (*S. typhi* 9-12(vi)d), e S. Grupo E (*S. enteritidis* 1-9-12) (PROBAC do BRASIL).

O isolamento do *Campylobacter sp* foi obtido utilizando-se o meio de Karmali (PROBAC do BRASIL) em atmosfera microaerófila elevada a 42°C. As colônias positivas foram submetidas à prova da catalase e hidrólise do hipurato, permitindo o diagnóstico das variedades *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*.<sup>13</sup>

Para o isolamento da *Yersinia enterocolitica* utilizou-se solução salina tamponada (pH 7,6), manutenção a frio (4°C) durante período médio de 2 a 4 semanas, com repiques periódicos em ágar MacConkey<sup>14</sup>.

A detecção de *Rotavirus* foi efetivada através da técnica do imunoensaio enzimático (ELISA), utilizando-se o teste "Rotazyme II" (ABBOT). Foi aplicada a leitura colorimétrica em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492nm<sup>15</sup>.

A análise parasitológica foi realizada incubando-se parte da amostra fecal em meio de conservação denominado MIF (mertiolato-iodo-formalina). A pesquisa das formas trofozoítas dos protozoários foi realizada por método direto. Para detecção de cistos de protozoários e de ovos leves foi utilizado o método de Faust (centrífugo-flutuação em sulfato de zinco), e para ovos pesados empregou-se o método de Hoffman (sedimentação espontânea). As

técnicas utilizadas na análise parasitológica são descritas em Amato Neto & Correa (1991)<sup>16</sup>.

A segunda parte da amostra fecal foi incubada em meio de conservação denominado solução de formalina a 10% em PBS tamponado (pH 7,4). Esse meio foi utilizado como conservante destinado à pesquisa de *Cryptosporidium sp*, realizado segundo técnica de Bronsdon (1984)<sup>17</sup>.

A análise estatística compreendeu o estudo das variáveis quantitativas representadas por média, desvio padrão, mediana, valores mínimo e máximo. As variáveis qualitativas foram estudadas por frequência absoluta e frequência relativa (%). Para a comparação das medidas numéricas dos grupos com diarréia e controle utilizou-se o teste t de Student para amostras independentes.

As tabelas de frequência foram analisadas pelos testes de Qui-quadrado (X<sup>2</sup>) e Exato de Fisher em todas as ocasiões, especialmente naquelas em que a ocorrência de determinado parâmetro era muito baixa.

A influência da exposição a determinadas condições foi analisada através do cálculo de Risco Relativo (RR). O nível de significância adotado foi 0,05 ( $\alpha = 5\%$ ).

## Resultados

A média de idade das crianças do grupo com diarréia foi de 12,6 meses, e a do grupo controle de 14,7 meses. As amostras são consideradas similares quanto à idade do ponto de vista estatístico ( $p=0,0813$ ). A distribuição etária em frequências semestrais demonstra que a diarréia foi predominante no primeiro ano de vida, congregando 58% dos casos atendidos (35% no primeiro semestre e 23% no segundo). As crianças foram atendidas na Unidade do Pronto Socorro Infantil, em média 5 dias após o início do processo diarreico. Ocorreu nítido predomínio de apresentação de diarréia aquosa (80,0% dos casos) sobre a mucosanguinolenta (20,0% das amostras).

O maior contingente dos pacientes apresentou quadro diarreico com elevada frequência de evacuações, superior a 10 emissões/dia nas 24 horas que precederam o atendimento. Ocorreram vômitos em 58% dos casos e febre em 54%. Trinta e um pacientes apresentaram desidratação (14 de grau I, 14 de grau II e 3 de grau III. Segundo classificação de Gomez<sup>9</sup>, 65 pacientes eram eutróficos, 13 eram desnutridos de grau I, 12 de grau II e 10 de grau III. Sessenta e dois pacientes não apresentavam histórico anterior de diarréia aguda. Setenta e sete pacientes procediam de seus domicílios, enquanto 23 freqüentavam creches. O relato de contato positivo com doença diarreica nessas entidades foi de 78,3% e de 18,2% nas demais. Ocorre alta significância estatística no confronto dessas frequências relativas ( $p<0,0001$ ). O risco preditivo de contato com diarréia foi da ordem de 4,3 vezes maior no paciente oriundo de creche, quando comparado ao paciente domiciliar.

Oitenta e nove pacientes do grupo com diarréia e 83 crianças do grupo controle habitavam residências de alve-

na ou apartamentos. Residiam em barracos de madeira ou cortiços 11 pacientes do grupo com diarréia e 17 crianças do grupo controle. O percentual de 99% dos domicílios das crianças pertencentes ao grupo com diarréia e de 100% das crianças do grupo controle era servido por água encanada tratada. A provisão de rede de esgoto ocorreu em 88% no grupo com diarréia e em 87% no grupo controle.

A relação número de habitantes por cômodo em ambos os grupos foi similar, sendo que mais de 85% dos pacientes do grupo com diarréia e 82% do grupo controle guardavam razão inferior a três habitantes por cômodo em seus respectivos domicílios.

A renda familiar expressa em salários mínimos no grupo com diarréia foi de  $3,53 \pm 1,66$  e no grupo controle de  $3,63 \pm 1,72$  ( $t=0,40$ ;  $p=0,6863$ ).

O montante de 36,0% no grupo com diarréia e 38,0% no grupo controle relatou presença de animais domésticos nos domicílios ( $X^2= 0,00$ ;  $p=1,0000$ ).

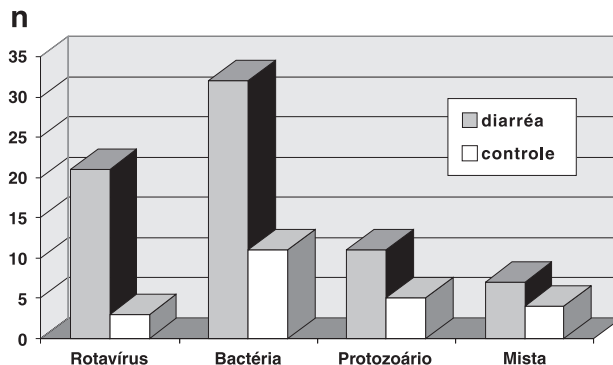
#### Dados microbiológicos- recuperação de patógenos nas amostras fecais

A Tabela 1 e a Figura 1 apresentam a freqüência de enteropatógenos nas amostras fecais do grupo com diarréia e nas do grupo controle. A presença de enteropatógenos no grupo com diarréia foi de 64% e no grupo controle de 19%. O teste comparativo entre essas freqüências foi de elevada significância estatística ( $p<0,0001$ ).

**Tabela 1** - Freqüência de enteropatógenos nas amostras fecais do grupo com diarréia e do grupo controle

Agentes	Grupo com diarréia n= 100	Grupo controle n= 100	Teste comparativo
<i>Rotavirus</i>	21	3	P = 0,0001 *
EPEC	13	7	P = 0,2381
EPEC TL	3	3	P = 1,0000
EPEC TS	1	0	P = 1,0000
EHEC	1	1	P = 1,0000
EIEC	1	0	P = 1,0000
<i>Shigella sp</i>	7	0	P = 0,0140 *
<i>Salmonella sp</i>	1	0	P = 1,0000
<i>Campylobacter jejuni</i>	5	0	P = 0,0594
<i>Campylobacter coli</i>	0	0	P = --
<i>Y. enterocolitica</i>	0	0	P = --
<i>Cryptosporidium sp</i>	5	2	P = 0,47
<i>G. lamblia</i>	6	3	P = 0,497
<i>E. histolytica</i>	0	0	P = --
<b>Total de positividade</b>	<b>64</b>	<b>19</b>	<b>p &lt; 0,0001*</b>

\* nível de significância ( p < 0,05)



**Figura 1** - Freqüência de enteropatógenos (vírus, bactérias, protozoários) nos grupos com diarréia e controle (grupo diarréia n=100, grupo controle n=100)

No grupo com diarréia, 64 amostras fecais de 57 pacientes foram positivas para pelo menos um agente patogênico, sendo que em 7 delas isolaram-se mais de um microrganismo determinante de DA. O *Rotavirus* foi detectado em 21 crianças. As enterobactérias foram isoladas em 32 amostras, 24 das quais como agente único e em 8 casos associadas a outros patógenos. Os protozoários foram detectados em 11 amostras, sendo em 9 como agente único e em 2 ocasiões em associação. No grupo controle, registrou-se positividade em 19 amostras de fezes coletadas de 15 crianças, com detecção de enterobactérias em 11 casos, parasitas em 7 e *Rotavirus* em 3. Em 4 crianças verificou-se a presença de mais de um patógeno na amostra fecal estudada.

As variedades de *Escherichia coli* enteropatogênica foram as apresentadas na Tabela 2.

A presença de animais domésticos não alterou a taxa de recuperação nem a qualidade dos agentes patogênicos encontrados nas amostras fecais de ambos os grupos.

Dos 20 casos de diarréia de caráter mucossanguinolento, observou-se a presença de agentes patogênicos em 11 amostras fecais (55,0%). Nos 80 casos de diarréia aquosa, o isolamento de agentes patogênicos ocorreu em 52 amostras (65,0%). A análise dessas freqüências não foi significativa do ponto de vista estatístico ( $p=0,5690$ ). Foram isolados os seguintes enteropatógenos nas amostras fecais mucossanguinolentas: *Shigella sp* (7), *C. jejuni* (2), EIEC (1), EPEC (1), *Rotavirus* (1). Agentes associados incidiram em apenas um caso. Nas amostras dos casos com diarréia aquosa foram isolados os seguintes enteropatógenos: *Rotavirus* (20), EPEC (12), *G. lamblia* (6), *Cryptosporidium sp* (5), EPEC TL (3), *C. jejuni* (3), EPEC TS (1), EHEC (1), *Salmonella sp* (1). Agentes associados incidiram em 4 casos.

**Tabela 2** - Distribuição dos diferentes sorogrupos de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) nos grupos com diarreia e controle

Sorogrupo EPEC	Grupo com diarreia (13 casos)	Grupo controle (7 casos)
O55:H-	1	0
O55:H7	1	
O111:H2	1	0
O111:H-	2	
O119:H6	2	0
O119:H-	2	
O114	1	2
O127	1	1
O128	0	3
O142	2	1
<b>Total n= 20</b>	<b>13</b>	<b>7</b>

\*p = 0,238 ( não significativo)

## Discussão

Na presente pesquisa, as amostras fecais foram colhidas, em média, no 5º dia de duração do evento diarreico, período em que os índices de recuperação dos diferentes patógenos ainda são elevados. Não foram colhidas amostras para análise após o 10º dia de duração da DA, fase em que a depuração do agente infectante pode determinar índices de detecção significativamente inferiores. Esse dado é enfatizado por Prado & O’Ryan<sup>2</sup> ao analisarem mais de 160 trabalhos produzidos em diferentes centros latino-americanos. O diagnóstico de *Rotavirus* pelo imunoenensaio enzimático apresenta igualmente sensibilidade diminuída a partir do 9º dia do curso da diarreia<sup>15</sup>.

O índice de 64% de positividade encontra-se em patamar pouco superior à média dos demais trabalhos da literatura efetivados no município de São Paulo. Kitagawa et al. (1989)<sup>18</sup> e Gomes et al. (1991)<sup>4</sup> obtiveram cifras de 61,7% e 55%, respectivamente. O fato pode ser explicado pela inclusão, na pesquisa, de técnicas para detecção do *Cryptosporidium sp* e das subespécies de *Escherichia coli* consideradas diarreio-gênicas. Escobar<sup>19</sup>, ao pesquisar praticamente os mesmos agentes etiológicos em diarreia aguda, obteve positividade em 65% das amostras, resultado esse semelhante ao observado no presente estudo. Em áreas insalubres, os enteropatógenos são resgatados nos grupos controle em cifras que variam de 25 a 45%, superiores, portanto, à de 19% registrada no presente estudo.

O *Rotavirus* confirma o seu alto poder patogênico ao ser isolado em 21% dos pacientes com DA e somente em 3% dos controles (p= 0,001). Esse agente tem sido apontado, nas últimas duas décadas, como um dos principais produtores de diarreia aguda na população infantil, mormente nas crianças menores de 3 anos de idade. Os diferen-

tes trabalhos latino-americanos estimam o *Rotavirus* como determinante de diarreia em taxas que variam entre 10 e 50% dos casos, com respectiva positividade em grupos controle, na ordem de 0 a 5%<sup>20,21</sup>. Timenetsky et al.<sup>22</sup>, em estudo sobre a incidência de diarreia por enterovírus na cidade de São Paulo, isolaram o *Rotavirus* em 11,3% das crianças menores de cinco anos de idade com esse tipo de afecção, motivando hospitalização por desidratação em 23,1% dos casos.

A ocorrência de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) diagnosticada pelos soros polivalentes no presente estudo registra frequências relativas de 13% para os pacientes com DA e de 7% para controles, resultado não significativo do ponto de vista estatístico (p=0,2381). No entanto, ao utilizarmos os soros monovalentes somáticos e flagelares, verificamos que os sorogrupos O119:H6, O119:H-, O111:H2, O111:H-, O55:H7 e O55:H- foram isolados exclusivamente nos pacientes portadores de diarreia aguda.

As EPEC sorogrupos O111, O119, O55 congregam fatores de virulência que foram recentemente reconhecidos e associados à maior patogenicidade: fator de enteroroaderação (FEA); gen *eae* (*attachment and effacing*), que codifica a produção de uma proteína denominada *intimina*; gen *bfp* (*bundle forming pili*), que codifica a síntese de uma adesina de superfície mediadora da aderência do tipo “localizada” às células epiteliais. Esses fatores, quando presentes, fazem com que o mecanismo de adesão e lesões às microvilosidades seja amplificado, com ativação da via fosfatidilinositol e aumento do cálcio citosólico<sup>23</sup>.

A maior parte dos trabalhos publicados quanto à etiologia de diarreia aguda na infância aponta invariavelmente para incidências muito superiores desse enteropatógeno, com frequências que variam entre 25 e 40%. Murahovschi<sup>24</sup> e posteriormente Fagundes Neto et al.<sup>25</sup> detectaram EPEC nos casos de DA e desidratação em 35% das amostras, com predomínio nítido do sorogrupo O111. Esses estudos foram conduzidos em populações pertencentes à estratificação sócio-econômica inferior ao de nossa amostragem, combinando péssimas condições ambientais, elevada prevalência de desnutrição protéico-energética e surtos anteriores de doença diarreica. Em 1995, Fagundes Neto et al.<sup>5</sup> detectaram EPEC em 42% de 200 lactentes portadores de DA e 22,5% de controles residentes em áreas periféricas de Brasília, Distrito Federal (DF). Os sorogrupos O111, O119 incidiram em 12,5% e 5%, respectivamente, nos pacientes com DA. Em nosso meio, os trabalhos mais recentes realizados no estado de São Paulo por Lomazi et al.<sup>26</sup> e Escobar<sup>19</sup> demonstram um acentuado declínio na prevalência de diarreia por EPEC nas populações residentes em áreas com saneamento básico. Ressalta-se, portanto, que a ocorrência dos sorogrupos EPEC O111, O119 e O55 exclusivamente em amostras fecais de crianças com DA verificada nesta pesquisa está em concordância com os dados da literatura<sup>23,27</sup>.

Foi isolada *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) TL em 3 amostras no grupo com diarréia e em 3 no grupo controle. A variedade produtora de toxina TS foi isolada em apenas 1 paciente com DA grave. Em geral, os trabalhos conduzidos na América Latina em comunidades desprovidas de saneamento básico registram ETEC numa proporção maior, que varia entre 15 e 33% dos casos de DA, porém demonstram proporções igualmente elevadas de recuperação em grupos controle. Esses dados apontam para o alto grau de contaminação ambiental nas comunidades em que essas populações residem, o que difere da amostra da atual pesquisa<sup>28,4</sup>.

Trabalhos nacionais realizados com populações residentes em favelas da periferia de grandes centros urbanos apontam para disparidades quanto à presença das espécies ETEC TL e TS. Há estudos em que a recuperação desses agentes atinge cifras de 6 a 8% nos portadores de DA, e 2 a 7% nos grupos controle, contrastando com outros autores que registram índices de isolamento 2 vezes superiores<sup>29</sup>.

A variedade *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC) sorogrupo O29 foi isolada, neste estudo, em apenas um paciente portador de diarréia aguda de caráter mucossanguinolento. Esse dado foi concordante com os trabalhos da literatura, que estimam, para a América Latina, isolamento desse agente em proporções de 2% a 3% dos casos<sup>2</sup>. Kitagawa et al.<sup>18</sup>, em São Paulo, isolaram EIEC em 2,3% das crianças com diarréia e em 0,9% nos controles.

Detectou-se *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) em apenas um caso de paciente com diarréia de caráter não mucossanguinolento, e um caso foi resgatado no grupo controle. Os nossos achados são concordantes com os publicados na literatura, que apontam para o isolamento de EHEC na América Latina em 2 a 3% dos pacientes com DA<sup>2</sup>.

O *Campylobacter jejuni* foi isolado em 5 pacientes com DA, não sendo verificada a presença do mesmo no grupo controle. Esse agente determinou diarréia aquosa em 3 casos, e mucossanguinolenta em 2. A baixa incidência encontrada de *C. jejuni* em ambos os grupos está em concordância com trabalhos publicados em nosso meio, efetivados em populações residentes em áreas providas de saneamento básico<sup>19,26</sup>. Trabalhos nacionais conduzidos em áreas insalubres apontam para freqüências mais elevadas desse patógeno, entre 10 e 15% dos casos de DA e índices similares em grupos controle<sup>30</sup>. Há uma correlação positiva entre recuperação de *C. jejuni* e presença de animais domésticos, especialmente cães<sup>31</sup>. Não foi possível analisar essa variável no presente estudo, pelos baixos índices de isolamento desse patógeno em ambos os grupos.

A *Shigella sp* foi isolada em 7 pacientes com diarréia de caráter mucossanguinolento, não se observando a presença da mesma nas amostras do grupo controle. Esses dados conferem alta patogenicidade para o referido agente e são concordantes com os dados da literatura. Apesar do pequeno número de casos isolados, 4 das 7 amostras

correspondem a *Shigella flexneri*, espécie igualmente predominante nos trabalhos nacionais<sup>18,19,29</sup>.

Taylor et al. enfatizam que a *Shigella sp*, pelo baixo inóculo necessário para a ocorrência de infecção sintomática, determina surtos epidêmicos de diarréia em várias comunidades, com rápida disseminação e alto número de indivíduos infectados<sup>32</sup>.

A *Salmonella sp* foi isolada em apenas um paciente de 2 anos e 11 meses de idade com diarréia aquosa de leve intensidade, não sendo detectada no grupo controle. Em trabalhos prévios realizados na enfermaria pediátrica da FCM da Santa Casa de São Paulo, Toporovski et al.<sup>33</sup>, em São Paulo, registraram ocorrência de inúmeros casos de lactentes acometidos por diarréia aguda causada pela *Salmonella typhimurium*, internados por quadros de desidratação de caráter grave, distúrbios hidroeletrólíticos e septicemias. Berezin et al.<sup>34</sup>, na mesma enfermaria pediátrica, comprovaram que os lactentes internados por diarréias e bacterimias determinadas pela *Salmonella typhimurium* mantinham excreção fecal assintomática do agente por prazos longos, em torno de 60 a 90 dias.

O isolamento de *Salmonella sp* durante os eventos diarréicos dos estudos latino-americanos tem sido estimado em 0,5% a 4%. No município de São Paulo, trabalhos recentes indicam queda nas taxas de recuperação dessa bactéria nas diarréias de lactentes, a exemplo do verificado na atual pesquisa<sup>19</sup>.

A *Yersinia enterocolitica* não foi detectada nesta pesquisa. Estima-se, nos trabalhos latino-americanos, ocorrência desse patógeno em 1% a 2% dos casos de DA. De fato, a presença dessa bactéria como produtora de enteroinfecção no nosso meio é extremamente casual<sup>2,19,26,29</sup>.

O *Cryptosporidium sp* incidiu em 5% dos casos de pacientes portadores de diarréia aguda, e em 2% nos do grupo controle. Esses dados não conferem significância estatística para a presença desse agente como produtor de quadro diarréico. Apesar de a amostra ser restrita a poucos casos, o *Cryptosporidium sp* foi recuperado em 4 dos 5 pacientes provenientes de creches, com histórico igualmente positivo de contato com doença diarréica nessas entidades. São restritos os estudos nacionais em que é efetivada a pesquisa desse agente em surtos de diarréia na infância, tanto de caráter comunitário quanto nosocomial. Bartlett et al.<sup>35</sup>, nos Estados Unidos, calcularam que o risco probabilístico de lactentes que freqüentam creches adquirirem infecção pelo referido protozoário é 3,5 vezes maior quando comparado com os da mesma idade cuidados em seus domicílios. Mangini et al.<sup>8</sup>, na cidade de São Paulo, comprovaram incidência elevada de *Cryptosporidium sp* em diarréia infantil, com índices de excreção fecal para o agente de 17,4%. Essa cifra apresentou flutuações sazonais, com maiores índices entre os meses de março e maio (27,9%) e menores entre setembro e novembro (8,3%). Os autores salientaram que as crianças participantes da pesquisa eram eutróficas e imunocompetentes, sugerindo, dessa forma, a inclusão rotineira da pesquisa

desse coccídeo em trabalhos de etiologia de diarréia infantil em crianças residentes na cidade de São Paulo.

A ocorrência de giardiose em nossa casuística foi da ordem de 6% em crianças com DA e de 3% nos controles. Esses resultados não comprovaram patogenicidade para *Giardia lamblia* como protozoário produtor de DA, quando se comparam as freqüências de detecção em ambos os grupos. Esse patógeno determinou diarréia aquosa de intensidade leve ou moderada em todos os casos. Os trabalhos nacionais revelam cifras extremamente discrepantes quanto à ocorrência de giardiose como promotora de diarréia aguda na infância, com valores que variam entre 2% e 12% em crianças sintomáticas, e entre 3% e 23% nas assintomáticas. Os resultados, sendo próximos em ambos os grupos, dificultam o estabelecimento de associação entre a detecção do patógeno e a produção de sintomas. Farthing<sup>37</sup>, analisando centenas de publicações em vários países sobre incidência de giardiose, estimou ocorrência entre 2% e 5% em portadores de diarréia nos países industrializados, até cifras de 20% a 30% nos países em desenvolvimento. As crianças menores de três anos, quando infectadas, tendem a apresentar o quadro sintomático com maior freqüência e gravidade. A simples presença de cistos de *Giardia lamblia* em fezes diarréicas não permite estabelecer relação "causa-efeito" definida, devendo os estudos futuros considerarem outros aspectos patogênicos determinantes de diarréia e má absorção, tais como produção de proteinases, lecitinas e citotoxinas. A qualidade da resposta imune do hospedeiro é extremamente importante e inclui proliferação de linfócitos intra-epiteliais, atividade de células timodependentes com produção de interleucina-2 e outras linfocinas.

Em nosso estudo não foi detectada *Entamoeba histolytica* em crianças portadoras de diarréia ou no grupo controle. Esses dados são concordantes com outros estudos efetivados em nosso meio, em que a prevalência desse patógeno tem sido da ordem de 0% a 3% em casos de diarréia<sup>36,38</sup>. Okasaki et al.<sup>38</sup>, em pesquisa realizada em estados do nordeste do Brasil, chamavam a atenção para o fato de que nas populações em que se verificava a presença endêmica de *Entamoeba histolytica*, o achado de cistos em pesquisa parasitológica de fezes não se relacionava com a viragem sorológica dos portadores, o que, na maioria das vezes, vinha a descartar a capacidade de enteroinvasividade das cepas encontradas. Tem sido valorizada a visualização de trofozoítas com hemácias fagocitadas no interior como critério sugestivo de invasividade, o que permite associar a amebíase à diarréia em questão.

O presente estudo sobre etiologia da doença diarréica difere da quase totalidade das publicações nacionais, pelo fato de ser realizado com população cujos marcadores sócio-econômicos são superiores, tais como, renda mensal familiar próxima a 4 salários mínimos, provisão de água encanada e esgoto, adequada relação número de pessoas/cômodo. Essas características epidemiológicas provavelmente relacionam-se com a condição nutricional adequa-

da da maior parte das crianças estudadas e com o histórico praticamente negativo para doença diarréica progressa. Os dados acima mencionados justificam o resgate percentual do *Rotavirus* acima dos agentes bacterianos e parasitários. Observa-se, igualmente, que as cifras de detecção de microrganismos produtores de diarréia nas amostras da população controle situam-se dentre as inferiores da literatura nacional. Confirmou-se maior patogenicidade dos agentes *Rotavirus*, *Shigella sp* e os clássicos sorogrupos de *Escherichia coli* enteropatogênica O55, O111, O119 isolados, quase exclusivamente nas crianças com doença diarréica aguda.

### Referências bibliográficas

1. World Health Organization. Persistent diarrhea in children in developing countries. Memorandum from a WHO meeting. Bull WHO 1988;66:709-17.
2. Prado V, O'Ryan ML. Acute gastroenteritis in Latin America. Infect Dis Clin North Am 1994; 8:77-106.
3. Guerrant RL, Shields DS, Thorson SM, Shorling JB, Gröschel DHM. Evaluation diagnosis of acute infectious diarrhea. Am J Med 1985;78:91-8.
4. Gomes TAT, Rassi V, Mac Donald K, Ramos SR, Trabulsi LR, Vieira MA, et al. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. J Infect Dis 1991;164:331-7.
5. Fagundes Neto U, Schmitz LG, Scaletsky I. Características clínicas e epidemiológicas da diarréia aguda por *Escherichia coli* enteropatogênica clássica. Rev Ass Med Brasil 1995; 41:259-65.
6. Linhares AC, Gabbay YB, Freitas RB, Travassos Da Rosa ES, Mascarenhas JDP, Loureiro ECB. Longitudinal study of *Rotavirus* infections among children from Belém, Brazil. Epidem Inf 1989; 102:129-45.
7. Ho MS, Glass RI, Pinsky PF, Anderson LJ. *Rotavirus* as a cause of diarrheal morbidity and mortality in the United States. J Infect Dis 1988;158:1112-6.
8. Mangini ACS, Dias RMOS, Grisi SJFE, Escobar AMU, Torres DMAGV, Zuba IPR, et al. Parasitismo por *Cryptosporidium sp* em crianças com diarréia aguda. Rev Paul Med 1992;34:341-5.
9. Gomez F. Desnutrición. Bol Med Hosp Infant (México) 1946;3:543-51.
10. National Center For Health Statistics. Growth charts. Rockville Maryland: NCHS, 1976; DHEW publication n° (HRA)76-1120. Monthly vital statistics report, series 25; n° 3, suppl.
11. Ricci LC, Castro AFP. Indirect haemagglutination test for the detection of thermolabile enterotoxin from *Escherichia coli*. Med Microbiol Immunol 1986;175:251-60.
12. Dean AG, Ching Y, Williams RG, Harden LB. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. J Infect Dis 1972;125: 407-11.
13. Karmali MA, Simor AE, Roscoe M, Fleming PC, Smith SS, Lane J. Evaluation of a blood-free charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. J Microbiol 1986;23: 456-9.

14. Wauters G, Le Minor L, Chalon AM, Lassen J. Supplement au schéma antigénique de *Yersinia enterocolitica*. Anns Inst Pasteur 1972;122: 951-6.
15. Rubenstein A, Miller MF. Comparison of an enzyme immunoassay with electron microscopic. Procedures for detecting *Rotavirus*. J Clin Microbiol 1982;15: 938-44.
16. Amato Neto V, Correa LL. Exame parasitológico de fezes, 5ª ed. São Paulo: Savier, 1991.
17. Bronsdon MA. Rapid dimethyl sulfoxide-modified acid-fast stain of *Cryptosporidium oocysts* in stool specimens. J Clin Microbiol 1984;19:952-3.
18. Kitagawa SMS, Toledo MRF, Trabulsi LR, Ramos SRTS, Murahovschi J, Fagundes Neto U, et al. Etiologia da diarréia infecciosa endêmica da criança de baixo nível sócio-econômico em São Paulo. Rev Paul Pediatr 1989;7:16-25
19. Escobar AMU. Contribuição ao estudo da doença diarréica aguda em crianças com idade inferior a 5 anos e recuperação fecal de *Campylobacter jejuni*. São Paulo-SP, [Tese] São Paulo, Universidade de São Paulo, 1993.
20. Avenaño LF, Spencer E, Calderon A. Infección por *Rotavirus* en lactentes con diarrea aguda. Rev Med Chil 1983; 11:240-4.
21. Cruz JR, Cáceres P, Cano F, Flores J, Bartlett A, Torún B. Adenovirus type 40 and 41 rotaviruses associated with diarrhea in children from Guatemala. J Clin Microbiol 1990; 28:1780-4.
22. Timenetsky MCST, Kisielius JJ, Grisi SJFE, Escobar AMU, Ueda M, Tanaka H. *Rotavirus*, *Adenovirus*, *Astrovirus*, *Calicivirus* e "small round virus particles" em fezes de crianças com e sem diarréia aguda, no período de 1987 a 1988, na grande São Paulo. Rev Inst Med Trop 1993;35:275-80.
23. Campos LC, Whittam TS, Gomes TAT, Andrade JRC, Trabulsi LR. *Escherichia coli* serogroup 0111 includes several clones of diarrheagenic strains with different virulence properties. Infect Immun 1994;62:3282-8.
24. Murahovschi J. Contribuição ao estudo do valor dos antimicrobianos no tratamento das diarréias agudas do lactente. [Tese] São Paulo, Universidade de São Paulo, 1969.
25. Fagundes Neto U, Reis JC, Sabbag NA, Oliva CAG. Diarréia aguda: evolução clínica em crianças. Rev Paul Pediatr 1989;7:27-34.
26. Lomazi EA, Collares EF, Viccari MS, de Castro AFP. Identificação de agentes enteropatogênicos nas fezes de crianças com diarréia aguda no município de Paulínia - SP. J pediatr (Rio J.) 1993;69:159-64.
27. Blake PA, Ramos S, MacDonald KL, Rassi V, Gomes TAT, Ivey C, et al. Pathogen-specific risk factors and prospective factors for acute diarrheal disease in urban Brazilian infants. J Infect Dis 1993;167: 627-32.
28. Fernandes RM, Ramos SRTS, Rassi V, Blake PA, Gomes TAT. Use of plasmid profiles to differentiate strains within specific serotypes of classical enteropathogenic *Escherichia coli*. Braz J Med Biol Res 1992;25: 667-72.
29. Queiroz DMM, Mendes EN, Penna FJ, Peret Filho LA, Figueiredo Filho PP, Duarte MA, et al. Pesquisa de bactérias enteropatogênicas em crianças com diarréia aguda, em Belo Horizonte, MG. Arq Gastroenterol São Paulo 1987; 24:46-50.
30. Mendes EN, Queiroz DMM, Cisalpino EO, Peres JN, Penna FJ, Figueiredo Filho PP. Ocorrência de *Campylobacter jejuni* em crianças com e sem diarréia, em Belo Horizonte. Rev Microbiol 1987;18:25-30.
31. Blaser MJ, Checko P, Bopp C, Buce A, Hughes JM. *Campylobacter* enteritis associated with foodborne transmission. Am J Epidemiol 1982;116: 886-94.
32. Taylor DN, Echeverria P, Pal T, Sethabutr O, Wankijcharoen S, Sricharmorn S, et al. The role of *Shigella* species, enteroinvasive *Escherichia coli*, and other enteropathogens as causes of childhood dysentery in Thailand. J Infect Dis 1986;153:1132-8.
33. Toporovski MS, Tolaini GO, Sallowicz Jr R, Mimica I. Septicemia por *Salmonella typhimurium*. Estudo de 32 casos. J pediatr (Rio J.) 1985;59:291-6.
34. Berezin EN, Carvalho ES, Farhat CK, Mimica IM, Mimica L, Raphaelian TA. Estudo da persistência de colonização em pacientes infectados por *Salmonella*. Rev Ass Med Brasil 1990;36:100-6.
35. Bartlett AV, Moore M, Gary GW, Starko KM, Erben JJ, Meredith BA. Diarrheal illness among infants and toddlers in day-care centers: I. Epidemiology and Pathogens. J Pediatr 1985;107:495-502.
36. Chieffi PP, Waldman EA, Waldman CCS, Sakata EE, Gerbi LV, Rocha AB, et al. Aspectos epidemiológicos das enteroparasitoses no estado de São Paulo, Brasil. Rev Paul Med 1982;99:34-6.
37. Farthing MJG. Diarrhoeal disease: current concepts and future challenges. Pathogenesis of giardiasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1993;87:17-21.
38. Okasaki M, Okasaki M, Miranda P, Neto J, Diegues V, Alves J, et al. Parasitological and serological studies on amebiasis and other intestinal parasitic infections in Recife and its suburban areas, Northeast, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 1988;30:312-21.

Endereço para correspondência:

Dr. Mauro S. Toporovski  
Avenida Pacaembú, 1083  
CEP 01234-001 - São Paulo - SP  
Fax (011) 825.1757