

Lizandra Duarte da Rocha Araújo

PESQUISA DOS PATOTIPOS ENTEROPATOGÊNICO,
ÊNTERO-HEMORRÁGICO E PRODUTOR DE TOXINA SHIGA
DE *Escherichia coli* EM CRIANÇAS COM DIARREIA AGUDA
E SEM DIARREIA EM BELO HORIZONTE

Laboratório de Diagnóstico Genético de Doenças Infecciosas
Departamento de Propedêutica Complementar/Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais

2011

Lizandra Duarte da Rocha Araújo

PESQUISA DOS PATOTIPOS ENTEROPATOGÊNICO,
ÊNTERO-HEMORRÁGICO E PRODUTOR DE TOXINA SHIGA
DE *Escherichia coli* EM CRIANÇAS COM DIARREIA AGUDA
E SEM DIARREIA EM BELO HORIZONTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Aplicadas a Saúde do Adulto, Área de Concentração em Ciências Aplicadas ao Aparelho Digestivo.

Orientadora: Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Co-orientador: Edilberto Nogueira Mendes

Laboratório de Diagnóstico Genético de Doenças Infecciosas
Departamento de Propedêutica Complementar/Faculdade de Medicina

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2011

LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO

Laboratório de Diagnóstico Genético de Doenças Infecciosas

Departamento de Propedêutica Complementar

Faculdade de Medicina

Universidade Federal de Minas Gerais

COLABORAÇÃO

Professora Paula Prazeres Magalhães

Departamento de Microbiologia

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

APOIO FINANCEIRO

FAPEMIG

CNPQ

CAPES

PRPq/UFMG

Aos meus pais,

por sempre me incentivarem a seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado força e sabedoria para chegar até aqui.

À Prof. Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari pela orientação, colaboração e grande ajuda.

Ao Prof. Dr. Edilberto Nogueira Mendes pelo grande apoio, ajuda incondicional, dedicação, sabedoria e amizade. Obrigado por estar sempre ao meu lado e me incentivar a seguir em frente, passando por cima de todos os obstáculos e dificuldades.

À Prof. Dra. Paula Prazeres Magalhães por estar sempre presente, me incentivando e ajudando nos momentos difíceis.

Aos meus pais, irmão, tios, primos e demais familiares que tanto amo, pelo carinho, paciência e por sempre me incentivarem a não desistir.

Ao meu querido Reinaldo pelo enorme apoio, paciência, carinho, dedicação, renúncia e grande compreensão.

Aos amigos do Laboratório de Diagnóstico Genético de Doenças Infecciosas, Leticia, Jack, Shirley, Cecília, Matheus, Ana Carolina e Lidiane pela grande ajuda em todo o trabalho e por também estarem sempre ao meu lado. À Carol, por estar presente em todas as etapas, pelas férias perdidas e por estar sempre me ajudando em tudo. Ao amigo Millan pela ajuda, apoio, conselhos e conversas na hora do almoço. Em especial ao meu amigo Roger pelo apoio técnico, ajuda, grande amizade construída nesses anos e por sempre me ouvir. Você é muito especial para mim.

Aos funcionários e professores do Departamento de Propedêutica Complementar da Faculdade de Medicina da UFMG.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da UFMG pelos conhecimentos transmitidos.

Aos secretários do Centro de Pós-graduação por todos os esclarecimentos prestados.

Aos meus amigos, principalmente ao eterno Rebanho, pela grande amizade e compreensão.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	x	
LISTA DE TABELAS	xi	
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii	
RESUMO	xv	
ABSTRACT	xviii	
1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1	Considerações gerais	6
2.2	<i>Escherichia coli</i>	8
2.3	<i>Escherichia coli</i> diarreiogênica	9
2.4	EPEC	13
2.5	STEC	19
2.6	EHEC	20
2.7	Suscetibilidade de EPEC, STEC e EHEC a antimicrobianos	24
3	OBJETIVOS	27

3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	PACIENTES E MÉTODOS	29
4.1	Pacientes	30
4.2	Amostras fecais	31
4.3	Estudo clínico epidemiológico	31
4.4	Estudo laboratorial	32
4.4.1	Pesquisa de EPEC, STEC e EHEC	32
4.4.1.1	Isolamento e identificação por método bioquímico – fisiológico	32
4.4.1.2	Diagnóstico genético	33
4.4.1.2.1	Processamento das amostras	33
4.4.1.2.2	Extração de DNA	33
4.4.1.2.3	Identificação bacteriana e pesquisa de fatores de virulência	34
4.4.2	Teste de Suscetibilidade a Drogas Antimicrobianas e Pesquisa de ESBL	36
4.4.3	Manutenção dos microrganismos	37

4.5	Análise estatística	38
5	RESULTADOS	39
5.1	População estudada	40
5.2	Isolamento e identificação de <i>E. coli</i>	40
5.3	Pesquisa de <i>eae</i> , <i>bfpA</i> e <i>stx</i>	41
5.4	Infecção por EPEC, EHEC e STEC	42
5.5	Estudo clínico e epidemiológico	43
5.5.1	Distribuição anual da infecção por EPEC, EHEC e STEC	43
5.5.2	Distribuição sazonal da infecção por EPEC, EHEC e STEC	44
5.5.3	Distribuição etária da infecção por EPEC, EHEC e STEC	44
5.5.4	Distribuição da infecção por EPEC, EHEC e STEC de acordo com o sexo	45
5.5.5	Parâmetros clínicos na infecção por EPEC, EHEC e STEC	45
5.6	Suscetibilidade de amostras de EPEC, STEC e EHEC a antimicrobianos	46
6	DISCUSSÃO	58
6.1	EPEC	61

6.2	STEC	66
6.3	EHEC	67
6.4	Resistência a drogas	70
7	CONCLUSÕES	75
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
9	ANEXOS	94
	Anexo I: Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do Hospital Infantil João Paulo II	95
	Anexo II: Termo de Consentimento para Participação na Pesquisa	97
	Anexo III: Ficha Clínica	100
	Anexo IV: Cópia da Ata da Defesa	103
	Anexo V: Declaração de Aprovação	105

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	<i>Primers</i> utilizados para pesquisa de marcadores genéticos de EPEC, EHEC e STEC	36
----------	--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Relação entre colonização por amostras de <i>E. coli eae</i> (n = 125), <i>bfpA</i> (n = 19) e <i>stx</i> (n = 10) positivas e parâmetros clínicos e epidemiológicos	48
TABELA 2	Patotipos de <i>E. coli</i> diarreiogênica isolados de crianças com e sem diarreia em Belo Horizonte, MG, entre março de 2004 e julho de 2007	49
TABELA 3	Infecção mista por patotipos de <i>E. coli</i> diarreiogênica detectadas em crianças com e sem diarreia em Belo Horizonte, entre março de 2004 e julho de 2007	50
TABELA 4	Distribuição anual da infecção por EPEC, EHEC e STEC (n = 127) em crianças com diarreia aguda e sem diarreia atendidas entre março de 2004 e julho de 2007, em Belo Horizonte, MG	51
TABELA 5	Distribuição sazonal da infecção por EPEC, EHEC e STEC (n = 127) em crianças com diarreia aguda e sem diarreia atendidas entre março de 2004 e julho de 2007, em Belo Horizonte, MG	52

TABELA 6	Distribuição, de acordo com a faixa etária, das crianças colonizadas por amostras de <i>E. coli</i> diarreiogênica atendidas em Belo Horizonte, MG, entre março de 2004 e julho de 2007	53
TABELA 7	Distribuição, de acordo com o sexo, das crianças colonizadas por <i>E. coli</i> diarreiogênica atendidas em Belo Horizonte, MG, entre março de 2004 e julho de 2007	54
TABELA 8	Relação entre dados clínicos e infecção pelos diferentes patotipos de <i>E. coli</i> diarreiogênica identificados em amostras fecais de crianças com diarreia aguda atendidas em Belo Horizonte, MG, entre março/2004 e julho/2007	55
TABELA 9	Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de amostras de <i>Escherichia coli</i> diarreiogênica isoladas de crianças com diarreia aguda e sem diarreia atendidas entre março de 2004 e julho de 2007 em Belo Horizonte, MG	56
TABELA 10	Distribuição anual das porcentagens de resistência a antimicrobianos ¹ das amostras diarreiogênicas de <i>E. coli</i> isoladas de crianças com diarreia aguda e sem diarreia atendidas entre março de 2004 e julho de 2007 em Belo Horizonte, MG	57

LISTA DE ABREVIATURAS

A/E: *attaching and effacing* (aderência e achatamento)

Ágar SS: ágar *Salmonella-Shigella*

aEPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica atípica

ATCC: *American Type Culture Collection* (Coleção Americana de Amostras de Referência)

BFP: *bundle forming pilus* (*pilus* de aderência)

bfpA: gene que codifica BFP

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention* (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Instituto de Padronização em Clínica e Laboratório)

CTAB: brometo de cetiltrimetilamônio

DAEC: *Escherichia coli* de aderência difusa

DEC: *Escherichia coli* diarreiogênica

dNTP: deoxinucleotídeo trifosfato

eae: gene que codifica intimina

EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativa

EAF: EPEC *adherence factor* (fator de aderência de EPEC)

EAST1: *enteroaggregative heat stable toxin* (toxina termoestável de *Escherichia coli* enteroagregativa)

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EHEC: *Escherichia coli* êntero-hemorrágica

EIEC: *Escherichia coli* enterinvasora

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica

ESBL: β -lactamases de espectro ampliado

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica

FHEMIG: Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais

INCQS: Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde/FIOCRUZ

LEE: *locus of enterocyte effacement* (*locus* de achatamento de microvilosidades de enterócitos)

pb: pares de bases

PCR: reação de polimerização em cadeia

RNase A: ribonuclease A

SDS: dodecilsulfato de sódio

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences (Pacote Estatístico para Ciências Sociais)

STEC: *Escherichia coli* produtora de toxina shiga

stx: gene que codifica toxina shiga

Taq DNA polimerase: *Thermus aquaticus* DNA polimerase

tEPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica típica

Tir: *translocated intimin receptor* (receptor translocado para intimina)

RESUMO

Diarreia infecciosa aguda é uma das causas mais importantes de morbidade e mortalidade em todo o mundo, principalmente em países em desenvolvimento. Diversos microrganismos são reconhecidos como agentes etiológicos da doença, entre eles *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC). DEC inclui diversos patótipos como *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteremorrágica (EHEC) e *E. coli* produtora de toxina shiga (STEC). EPEC induz lesão A/E (aderência e achatamento de microvilosidades) associada à intimina, proteína codificada pelo gene *eae*. Com base na expressão de BFP, codificada pelo gene *bfp*, EPEC é classificada em EPEC típica, *bfpA*-positiva, e EPEC atípica. EHEC é caracterizada pela expressão de intimina, à semelhança de EPEC, e de toxinas shiga, codificadas pelos genes *stx*. De forma semelhante a EHEC, STEC expressa toxinas shiga, associadas a inibição da síntese protéica em células eucariotas. O conhecimento relativo à diarreia associada a estes dois patótipos de DEC ainda é escasso e estudos relativos ao tema são desenvolvidos, mais comumente, em países industrializados. Os objetivos deste estudo foram investigar, em crianças com e sem diarreia com idade até 5 anos, a prevalência e o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de EPEC, EHEC e STEC, bem como verificar a existência de relação entre infecção pelos patótipos e parâmetros clínicos e epidemiológicos. Setecentos e oitenta e nove crianças (392 com diarreia aguda e 397 sem diarreia) que procuraram assistência médica entre março/2004 e julho/2007 em um hospital público de Belo Horizonte, referência em pediatria na região, foram estudadas. Amostras de fezes eliminadas espontaneamente foram obtidas e transportadas para o laboratório em banho de

gelo em até uma hora e cultivadas em ágar MacConkey e ágar Shigella-Salmonella. Após 24 horas de incubação, 5 colônias lactose positivas e 5 lactose negativas foram selecionadas e transferidas para ágar Tríplice Açúcar-Ferro, EPM, meio MILi e ágar Citrato. Todas as colônias identificadas como *E. coli* foram utilizadas no restante do estudo. EPEC, EHEC e STEC foram identificadas por PCR. O teste de suscetibilidade a antimicrobianos foi feito pela técnica de difusão em ágar. Diarréia aguda foi mais comum nos meses secos e em meninos. EPEC foi detectada em 118 crianças, 12 (2,4%) com EPEC típica e 116 (13,4%) com EPEC atípica. EHEC e STEC foram identificadas em 8 (1,0%) e em 3 (0,4%), respectivamente. Nove crianças apresentavam infecção mista por mais de um patótipo de DEC. Febre e vômito foram relatadas para mais de metade das crianças com diarreia estudadas. Fezes com sangue/pus foram raramente reportadas. As maiores taxas de resistência a antimicrobianos de EPEC, EHEC e STEC foram observadas para cefazolina (mais de 50%) and cefalotina (mais de 30%). As menores taxas de resistência foram observadas para ciprofloxacina (1,5%) e ácido nalidíxico (abaixo de 10%). Resistência a ampicilina e sulfametoxazol-trimethoprim foi identificada em mais de um quarto das amostras testadas. Amostras produtoras de ESBL não foram detectadas. EPEC, especialmente EPEC atípica é muito comum tanto em crianças com diarreia como em pacientes sem diarreia. As taxas elevadas de resistência a antimicrobianos são, provavelmente devidas ao uso indiscriminado dos mesmos. Nossos dados reforçam a necessidade de vigilância constante da etiologia da diarreia no nosso meio e do padrão de suscetibilidade de amostras de *E. coli* associadas à gênese da diarreia aguda. Estes resultados serão úteis para melhorar nosso conhecimento relativo à etiologia da diarreia no nosso meio e contribuirão para

que se possam traçar estratégias visando à prevenção e controle da doença.

Key-words: EPEC, aEPEC, tEPEC, infectious diarrhea, diarrheagenic bacteria, virulence markers, antimicrobial susceptibility.

ABSTRACT

Acute infectious diarrhea is a leader cause of morbidity and mortality worldwide, mainly in developing countries. Several organisms have been implicated in the etiopathogenesis of diarrheal disease among them diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC). DEC includes several pathotypes such as enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) and shiga toxin producing *E. coli* (STEC). EPEC induces *eae* encoded intimin-dependent A/E (attaching and effacing) lesion. On the basis of BFP expression, encoded by *bfpA*, EPEC strains are named typical or atypical. EHEC is characterized by expression of intimin, such as EPEC, and shiga toxins, encoded by *stx*. Similarly to EHEC, STEC express shiga toxins, associated to protein synthesis impairment in eukaryotic cells. Knowledge on disease associated to EHEC and STEC is still scarce and studies on the organisms have been conducted more frequently in industrialized countries. We aimed to investigate the prevalence and antimicrobial susceptibility profile of EPEC, EHEC and STEC as well as clinical and epidemiological parameters associated to infection with these pathotypes in children younger than five years with and without diarrhea. A total of 789 children (392 with acute diarrhea and 397 without diarrhea) who searched for medical assistance from March 2004 to July 2007 at a public hospital in Belo Horizonte which is reference in paediatrics the region were consecutively studied. Passed fecal samples were obtained and transported to the laboratory in an ice bath within an hour. Stools were plated onto MacConkey Agar and Shigella-Salmonella Agar. After 24-hours incubation, 5 lactose-positive and 5 lactose-negative colonies were picked from each medium and transferred to Triple Sugar Iron Agar, EPM medium, MILi

medium, and Citrate Agar. All colonies identified as *E. coli* were further studied. EPEC, EHEC, and STEC were identified by PCR and antimicrobial susceptibility testing was performed by an agar diffusion technique. Acute diarrhea was more common in dry months and in males. EPEC was found in 118 children, 12 of them colonized with typical EPEC (2.4%) and 106 with atypical EPEC (13.4%). EHEC and STEC were identified in eight (1.0%) and three (0.4%) patients, respectively. Nine children presented mixed infection by more than one DEC pathotype. Fever and vomits were reported for more than half of the diarrhea patients studied. Bloody/purulent feces were rarely reported. The highest levels of antimicrobial resistance among EPEC, EHEC, and STEC were detected for Cefazolin (higher than 50%) and Cephalotin (higher than 30%). The lowest antimicrobial resistance levels were found for Ciprofloxacin (1.5%) and Nalidixic Acid (under 10%). Resistance to Ampicillin and to Sulphamethoxazole-Thrimethoprim was identified in more than 25% of the examined strains. ESBL testing was negative for all EPEC, EHEC, and STEC strains. These results demonstrate that EPEC, specially atypical EPEC, are common in children with and without diarrhea in our region. The high levels of resistance are probably due to the indiscriminate use of antimicrobials. Our data reinforce the need for constant epidemiological surveillance to improve our knowledge on several aspects of infectious diarrhea in order to give clues for designing strategies for preventing, diagnosing and treating patients presenting with the disease.

Key-words: EPEC, aEPEC, tEPEC, infectious diarrhea, diarrheagenic bacteria, virulence markers, antimicrobial susceptibility.

A enterite infecciosa aguda ainda constitui importante problema de saúde pública, especialmente nas regiões mais carentes do mundo. Atinge indivíduos de todas as faixas etárias e estratos sociais, estando associada a taxas elevadas de morbidade e mortalidade, especialmente entre crianças. Os agentes etiológicos da doença são, principalmente, vírus, bactérias e protozoários.

Entre as bactérias, merece menção, especialmente pela prevalência elevada, o grupo diarreiogênico de *Escherichia coli* (DEC), que inclui sete patotipos: enteropatogênico (EPEC), enterotoxigênico (ETEC), enteroinvasivo (EIEC), produtor de toxina shiga (STEC), êntero-hemorrágico (EHEC), enteroagregativo (EAEC) e de aderência difusa (DAEC). Cada patotipo apresenta habilidades de virulência características, cuja expressão está associada às manifestações clínicas da doença. A identificação dos diferentes patotipos de DEC é baseada, atualmente, na detecção, por métodos de genética molecular, dos genes que possibilitam a expressão de tais habilidades de virulência. Assim, EPEC caracteriza-se pela produção de intimina, codificada pelo gene *eae*, proteína que permite a aderência íntima de EPEC ao epitélio intestinal. Este patotipo não expressa as enterotoxinas termolábil ou termoestável, características de ETEC, ou toxina shiga, tipicamente observada em STEC e EHEC. Na dependência da presença do gene *bfpA*, que codifica a fímbria BFP, EPEC é subdividida nos grupos EPEC típica (tEPEC), *bfpA* positivo, e EPEC atípica (aEPEC), que não carrega o gene *bfpA*.

Os estudos relativos à prevalência de EPEC em crianças com e sem diarreia em Belo Horizonte remontam à década de 80 do século passado, quando as habilidades de virulência do microrganismo eram ainda desconhecidas. Naquela ocasião, a identificação de EPEC era realizada por meio de reações de

aglutinação em que eram empregados antissoros para a detecção de antígenos de superfície bacterianos específicos. Desta forma, eram reconhecidas como EPEC amostras de *E. coli* dos sorotipos O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158, denominados sorotipos clássicos de EPEC. Atualmente, numerosos outros sorotipos de *E. coli* foram descritos e é amplamente reconhecido que a correlação entre sorotipo e habilidades de virulência é extremamente baixa, razão pela qual este método de identificação de EPEC não é recomendado. Deve ser salientado que, naquela oportunidade, os patótipos STEC e EHEC não eram ainda conhecidos.

Com o advento da reação de polimerização em cadeia (PCR), a identificação de EPEC tornou-se mais rápida e acurada. Embora ainda seja considerado dispendioso, o método é tecnicamente simples, sensível e específico, podendo vir a facilitar o diagnóstico etiológico da enterite aguda associada a *E. coli* diarreiogênica, à semelhança do que já ocorre com outras doenças infecciosas.

EPEC é importante agente de enterite aguda em crianças menores de dois anos em países em desenvolvimento. De fato, em diversas regiões do mundo, tem sido demonstrado que EPEC é o patótipo de DEC mais comumente associado à doença, em especial as amostras atípicas do mesmo.

EHEC está associado a diarreia que pode se manifestar como colite hemorrágica e evoluir para síndrome hemolítica-urêmica. O principal reservatório do microrganismo na natureza é o intestino de ruminantes. Apenas um estudo desenvolvido em Belo Horizonte incluiu a pesquisa deste patótipo em amostras fecais de crianças com e sem diarreia; aproximadamente 1% das crianças apresentaram-se infectadas por EHEC.

À semelhança de EHEC, a prevalência de STEC também é pouco conhecida na população de Belo Horizonte. No mesmo estudo referido no parágrafo anterior, STEC não foi detectada.

Tendo estes fatos em vista e considerando o desconhecimento do perfil de importantes agentes etiológicos da infecção intestinal aguda no nosso meio, a inexistência de uniformidade da distribuição global destes agentes, o que impede a generalização dos dados obtidos em uma região geográfica, a falta de informações locais relativas à biologia do microrganismo, entre elas o padrão de suscetibilidade a drogas antimicrobianas, desenvolvemos este estudo, que visa contribuir para o conhecimento da etiologia e epidemiologia da enterite infecciosa aguda no nosso meio, no que se refere a EPEC, EHEC e STEC.

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Diarreia é uma manifestação clínica de diversas doenças. Entre elas, é uma das manifestações mais comuns da infecção intestinal aguda. Diarreia aguda é definida como alteração brusca do hábito intestinal, com aumento da frequência evacuatória e eliminação de fezes mais amolecidas que o habitual (WHO, 1987; Thielman & Guerrant, 2004).

A diarreia aguda de natureza infecciosa, enterite infecciosa aguda, é a principal causa de doença diarréica em todo o mundo. É importante problema de saúde pública, atingindo indivíduos de todas as faixas etárias e níveis socioeconômicos, especialmente crianças menores de cinco anos dos estratos menos favorecidos da sociedade (Baker *et al.*, 2002; O’Ryan *et al.*, 2005). É responsável por taxas elevadas de morbidade e mortalidade, estando intimamente ligada à desnutrição que, por sua vez, facilita a aquisição e persistência do processo infeccioso (Gianella, 1993). Queda das taxas de mortalidade tem sido observada nas últimas décadas, provavelmente em decorrência da ampla utilização da terapia de reidratação oral, mas calcula-se que a diarreia aguda de origem infecciosa ainda seja responsável por mais de dois milhões de óbitos por ano em todo o planeta (Thielman & Guerrant, 2004; O’Ryan *et al.*, 2005).

A doença pode ser causada por vírus, bactérias e protozoários. O agente etiológico do processo multiplica-se no intestino do hospedeiro, ser humano ou outro animal, podendo ou não causar doença clinicamente evidente. É eliminado pelas fezes, permanecendo disponível no ambiente por espaço de tempo variável, dependente do microrganismo e das condições ambientais (Baker *et al.*, 2002).

Via de regra, a transmissão se faz pela via fecal oral. Esta é um dos mais importantes motivos para que a doença seja mais comum em populações que vivem em condições precárias de higiene e saneamento básico. É neste cenário que o microrganismo encontra condições adequadas para alcançar o intestino do ser humano, aderir à superfície epitelial do órgão, expressar seus fatores de virulência e desencadear doença (O’Ryan *et al.*, 2005). O reservatório do agente etiológico na natureza pode ser constituído pelo homem ou outros animais e a aquisição do mesmo pode ser feita através do contato homem-homem, com animais e suas excretas, consumo de água e alimentos e contato com objetos contaminados e atividades de lazer em águas poluídas (Park & Gianella, 1993). A maioria dos casos de infecção intestinal aguda ocorre de forma endêmica. Entretanto, devido ao caráter mais dramático, são os surtos da doença que mais chamam a atenção da população e dos órgãos envolvidos no controle da mesma (Baker *et al.*, 2002).

Apesar das taxas elevadas de morbidade e mortalidade e dos impactos da doença na sociedade, o conhecimento de diversos aspectos da doença diarréica é, ainda, insatisfatório, tanto no que se refere à biologia do microrganismo e de sua interação com o hospedeiro, como à suscetibilidade a agentes físicos e químicos, à prevalência da doença associada, suas características clínicas e evolução, entre outros. Conhecimento mais preciso de diferentes aspectos do agente etiológico e da doença associada são fundamentais para que medidas de proteção e controle da doença possam ser tomadas pelos órgãos competentes. É importante estar atento à observação de que a epidemiologia da diarreia infecciosa aguda vem se alterando ao longo do tempo, com a mudança das condições econômicas, de saneamento básico e de hábitos da população e com a

globalização, razão pela qual a etiologia da doença deve ser constantemente monitorada.

Este estudo está restrito à investigação de apenas alguns patótipos de *E. coli* diarreiogênica, razão pela qual não faremos referência a outros microrganismos diarreiogênicos.

2.2 *Escherichia coli*

A bactéria atualmente reconhecida como *Escherichia coli* foi primeiramente isolada das fezes de uma criança, em 1885, por Theodor Escherich, um pediatra da Bavária pioneiro nos estudos da microbiota intestinal de crianças (Kaper *et al.*, 2004). É um bastonete Gram negativo, com aproximadamente 0,5 µm de diâmetro e 1,0 a 3,0 µm de comprimento, com uma camada simples de peptidoglicano. É um microrganismo móvel, anaeróbio facultativo, capaz de fermentar lactose, produzir gás, reduzir nitrato a nitrito e hidrolisar triptofano a indol. A grande maioria das amostras é capaz de se multiplicar em temperaturas entre 15 a 48°C, mas a maior taxa de multiplicação ocorre entre 37 e 42°C. *E. coli* pode se multiplicar em uma faixa de pH compreendida entre 5,5 e 8,0, mas, idealmente, em pH próximo da neutralidade (Souza, 2006).

É membro subdominante da microbiota do intestino de seres humanos e outros animais (Sousa, 2006) e está associada a infecções em diferentes locais do organismo, entre outros trato urinário, meninges, podendo causar infecções sistêmicas. Infecção intestinal está associada a amostras da bactéria que não são membros da microbiota indígena intestinal de seres humanos (Kaper *et al.*, 2004).

2.3 *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA

O reconhecimento da existência de relação entre *E. coli* e infecção intestinal data da década de 40, ocasião em que John Bray definiu que um subgrupo de amostras de *E. coli* encontrava-se associado à diarreia aguda em crianças, com base na demonstração de que sorotipos específicos da bactéria eram responsáveis por surtos da doença. Por esta razão, o subgrupo da bactéria foi denominado *E. coli* enteropatogênica (EPEC) (Bray, 1945). Aproximadamente 50 anos após a Organização Mundial de Saúde reconheceu 12 sorotipos de EPEC: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O127, O128, O142 e O 158 (WHO, 1987). Na década de 60, dois outros subgrupos de *E. coli* associados à etiopatogênese da diarreia aguda foram descritos e denominados *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (Clarke, 2001; Kaper *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2005).

À semelhança de numerosos outros microrganismos patogênicos, amostras de *E. coli* associadas à etiologia da diarreia, ou amostras diarreiogênicas, apresentam atributos de virulência que tornam a bactéria um enteropatógeno bem sucedido, quais sejam habilidade de colonizar a mucosa intestinal e capacidade de evadir das defesas e de causar danos ao hospedeiro por meio da produção de diferentes substâncias. A expressão de adesinas é uma característica de praticamente todas as amostras deste grupo bacteriano. Estas proteínas, na maioria das vezes organizadas em fímbrias, possibilitam a aderência da bactéria à superfície intestinal, dificultando sua remoção pelo movimento peristáltico e pelo movimento do bolo digestivo e permitindo a localização da bactéria na proximidade da superfície dos enterócitos. Uma vez aderida, a estratégia utilizada

pela *E. coli* diarreio gênica é diversa, na dependência do tipo patogênico, ou patotipo, em questão (Nataro & Kaper, 1998; Clarke, 2001; Scaletsky *et al.*, 2005).

EPEC é atualmente reconhecida como um dos patotipos de *E. coli* mais frequentes em todo o mundo. Causa diarreia não inflamatória especialmente em crianças de baixa idade de países em desenvolvimento. Tem tropismo pelo intestino delgado e apresenta a habilidade de induzir lesão A/E (*attaching and effacing*) nos enterócitos, associada à presença do gene *eae*. Pode ser diferenciada, com base na presença ou não do gene *bfpA*, carregado pelo plasmídeo EAF, em EPEC típica (tEPEC) e atípica (aEPEC), respectivamente. A diarreia associada ao microrganismo caracteriza-se pela eliminação de fezes aquosas em grande volume, poucas vezes ao dia, em geral sem febre (Trabulsi, 2002; Scaletsky *et al.*, 2005).

ETEC é um grupo capaz de causar diarreia não inflamatória, caracterizada pela eliminação de fezes aquosas em grande volume, sem febre, especialmente em crianças com idade inferior a cinco anos. É um dos patotipos de *E. coli* diarreio gênica mais prevalentes em todo o mundo, em especial nas regiões mais pobres do planeta. Está também associada à etiologia da diarreia do viajante. Produz dois tipos de enterotoxinas denominadas LT (termolábil) e ST (termestável) que, após serem transportadas para o interior do enterócito, provocam, em última análise, alteração da homeostasia com diminuição da absorção e aumento da secreção de fluidos e eletrólitos (Kaper *et al.* 2004; Souza, 2006).

EIEC é um grupo muito semelhante a *Shigella* uma vez que ambas exibem habilidades de virulência análogas, entre elas tropismo pelo intestino grosso, invasão celular, multiplicação intracelular e disseminação célula-célula, causando

diarreia inflamatória caracterizada pela eliminação de fezes amolecidas em pequeno volume e várias vezes ao dia, com pus e raias de sangue, acompanhada de febre em geral elevada. São também muito semelhantes do ponto de vista metabólico, mas podem ser diferenciadas com base na produção de gás a partir de glicose, utilização da xilose e descarboxilação da lisina. Embora, na maioria das vezes, formem colônias lactose negativas, algumas amostras são capazes de fermentar este carboidrato (Nataro & Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004; Souza 2006).

EHEC é um patotipo de *E. coli* diarreiogênica associado à colite hemorrágica e a uma complicação grave do processo, a síndrome hemolítica-urêmica. Os principais veículos reconhecidos do microrganismo são alimentos de origem animal mal preparados, em especial carne e leite. Água contaminada tem sido responsabilizada por surtos de diarreia associados a EHEC. O patotipo expressa toxinas shiga (Stx1 e Stx2), fatores de virulência responsabilizados pelas manifestações mais características de doença grave associada à bactéria: a eliminação de fezes com grande quantidade de sangue, hemólise e insuficiência renal aguda. Tem tropismo pelo intestino grosso e apresenta a habilidade de causar lesão A/E (*attaching and effacing*), à semelhança de EPEC. Acomete qualquer faixa etária, mas crianças com idade inferior a cinco anos são as vítimas mais comuns da diarreia por EHEC (Souza, 2006; Ferens *et al.*, 2011).

Escherichia coli enteragregativa (EAEC) é um grupo que causa diarreia persistente, especialmente em crianças de países em desenvolvimento, caracterizada pela eliminação de grande quantidade de muco nas fezes. É um patotipo ainda pouco conhecido. Expressa uma fímbria de adesão denominada

fímbria de aderência agregativa (AAF) e enterotoxinas, como a EAST1, e citotoxinas (Scaletsky *et al.*, 2001; Kaper *et al.*, 2004; Souza 2006).

Escherichia coli de aderência difusa (DAEC) é um patotipo de *E. coli* diarreio gênica que se adere de forma difusa às células epiteliais, causando alongamento das vilosidades dos enterócitos do intestino delgado, o que confere proteção às células bacterianas contra, por exemplo, a ação de antimicrobianos. DAEC é pouco conhecida, mas estudos demonstram que é mais comum em crianças maiores de cinco anos e adultos em países em desenvolvimento (Nataro & Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004; Souza 2006).

A melhor compreensão dos fatores de virulência que caracterizam cada patotipo de *E. coli* diarreio gênica e a identificação dos genes responsáveis pela codificação dos mesmos tornaram o uso de técnicas de genética molecular imprescindível para a identificação e caracterização dos diferentes da bactéria (Nataro & Kaper, 1998; Trabulsi *et al.*, 2002). Além disto, as reações de aglutinação para identificação dos sorotipos de *E. coli*, empregadas para identificação de patotipos diarreio gênicos da bactéria são, muitas vezes, falhas na diferenciação dos mesmos. Assim, algumas amostras de *E. coli* O157, classificadas tradicionalmente como enteremorrágicas, são, de fato, EPEC, uma vez que não produzem toxina shiga e amostras caracterizadas como EPEC por sorotipagem podem não ser diarreio gênicas ou pertencer a outros grupos diarreio gênicos (Donnenberg & Kaper, 1992; Nataro & Kaper, 1998; Blank *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2004). Deste modo, alguns autores sugerem o abandono da sorotipagem como método de identificação de *E. coli* diarreio gênica, sugerindo a utilização de PCR para a pesquisa dos fatores de virulência característicos de

cada patotipo (Campos, 1996; Kaper, 1996; Nataro, 1996; Campos *et al.*, 2004, Tamaki *et al.*, 2005).

2.4 EPEC

Como mencionado anteriormente, EPEC foi o primeiro grupo de *E. coli* a ser associado à etiologia da diarreia aguda. Durante décadas, a identificação de amostras pertencentes a este patotipo estava centrada na identificação, por testes bioquímico-fisiológicos, de *E. coli* e sua posterior caracterização, através de reações de aglutinação, empregando antissoros específicos, como um dos sorotipos classicamente reconhecidos como enteropatogênicos (Hernandes *et al.*, 2009; Tennant *et al.*, 2009).

A descoberta de diferentes fatores de virulência e dos genes que os codificam levou a mudanças drásticas na identificação e classificação de EPEC. Em 1995, no *International Symposium on Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC), realizado em São Paulo, chegou-se a um consenso sobre as características básicas do grupo, quais sejam produção de lesão A/E e incapacidade de produzir toxina shiga (Kaper, 1996). Assim, as amostras de *E. coli eae* positivas e *stx* negativas são consideradas EPEC. Além disso, como já mencionado, com base na presença do gene *bfpA*, o grupo pode ser dividido em EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC) (Kaper, 1996; Nataro & Kaper, 1998; Trabulsi *et al.*, 2002). Por estes motivos, a identificação de EPEC e de outros patotipos de *E. coli* diarreiogênica deve ser realizada através do emprego de técnicas de genética molecular (Trabulsi *et al.*, 2002; Tennant *et al.*, 2009). De fato, as reações de aglutinação para identificação dos sorotipos de *E. coli* são

pouco específicas para diferenciação dos grupos diarreio gênicos. Assim, é atualmente amplamente reconhecido que amostras classificadas como sorotipos clássicos de EPEC não são, necessariamente, membros deste patotipo de *E. coli*, podendo ser classificadas em outros grupos diarreio gênicos da bactéria, ou, ainda, ser membros da microbiota intestinal (Blank *et al.*, 2003; Nataro & Kaper, 1998; Campos *et al.*, 2004).

As variantes típica e atípica de EPEC possuem, em comum, a habilidade de induzir a formação de lesão A/E. Esta lesão caracteriza-se por aderência íntima da bactéria ao intestino delgado, achatamento das microvilosidades do enterócito, acúmulo de actina polimerizada e formação de uma estrutura em pedestal que pode ter até 10 µm de extensão (Nataro & Kaper, 1998; Trabulsi, 2002).

As proteínas necessárias para desenvolvimento da lesão A/E são codificadas por genes localizados na ilha de patogenicidade denominada LEE (*locus of enterocyte effacement*). Estes genes codificam os componentes estruturais do sistema de secreção do tipo III e moléculas reguladoras, translocadoras e efetoras que alteram diversos processos de sinalização celular (Garmendia *et al.*, 2005; Sousa, 2006). Codificam também intimina e o receptor Tir. A organização da sequência de nucleotídeos da ilha de patogenicidade LEE é semelhante em tEPEC e aEPEC. Embora os genes que codificam as proteínas estruturais do aparato de secreção tipo III sejam muito conservados, aqueles envolvidos na síntese de proteínas efetoras e das regiões flanqueadoras da ilha LEE exibem consideráveis diferenças na sequência de nucleotídeos. A ilha LEE pode estar inserida em diferentes sítios do cromossomo de *E. coli*. Essa variação de localização pode ser devida à aquisição a partir de progenitores diversos e em

tempos diferentes ou a movimento e reintegração gênica nas mesmas amostras da bactéria (Hernandes, *et al.*, 2009; Vieira, 2001).

Intimina, codificada por *eae*, é necessária para a adesão íntima da bactéria às células epiteliais e reorganização do citoesqueleto. Uma seqüência de 280 aminoácidos define uma grande variedade de subtipos da proteína. Os tipos α , β , γ , ζ , δ e ϵ são os mais frequentemente observadas em aEPEC em todo o mundo (Mora *et al.* 2009; Hernandez *et al.*, 2009). Diversidade geográfica de amostras de aEPEC, com base na intimina produzida, tem sido demonstrada. Por exemplo, o tipo θ é comum no Brasil e Uruguai. Sorotipos diferentes de aEPEC podem carrear tipos diversos de genes *eae*. Assim, o sorotipo O80:H26 pode expressar os subtipos β ou ϵ de intimina (Hernandes, *et al.*, 2009). Este achado, ocorrência de cepas de aEPEC do mesmo sorotipo carreando diferentes subtipos de intimina, confirma a grande diversidade de cepas de aEPEC e reforça a teoria de que a ilha LEE pode ter sido adquirida em diferentes ocasiões por diferentes amostras da bactéria (Donnenberg & Whittam, 2001).

O mecanismo pelo qual EPEC causa diarreia pode ser mais bem entendido por um modelo de estágios sucessivos, que serão descritos em conjunto com os fatores de virulência envolvidos. No primeiro estágio, ocorre aderência localizada ao epitélio intestinal, formando microcolônias compactas. Esta propriedade está relacionada à presença do plasmídio EAF, que contém um grupo de 13 genes responsáveis pela codificação de uma fímbria, denominada BFP. O plasmídio EAF não é essencial para o efeito A/E, mas sua presença está associada a maior eficiência na indução da lesão (Nataro & Kaper, 1998; Trabulsi *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2003). Recentemente, a estrutura da fímbria foi elucidada, permitindo uma

melhor compreensão de seu papel na virulência do microrganismo (Ramboarina *et al.*, 2005). Em um segundo estágio ocorre transdução de sinal, dependente da presença de proteínas efetoras, também codificadas por genes presentes na ilha LEE, localizada no cromossomo bacteriano. Este sistema é responsável pela secreção de diversas proteínas também codificadas por genes presentes na ilha de patogenicidade mencionada. Como resultado da ação das proteínas efetoras, ocorre aumento de cálcio intracelular, o que inibe a absorção de cálcio e sódio e, em consequência, de água pelos enterócitos. A fosforilação de diversas proteínas de células epiteliais intestinais, devido à ativação de quinases, como fosfoquinase, levando a alterações na secreção intestinal de água e eletrólitos, é outro mecanismo de lesão por EPEC (Nataro & Kaper, 1998; Garmendia *et al.*, 2005). Finalmente, ocorre aderência íntima ao enterócito, relacionada à presença do gene *eae*, parte da estrutura da ilha LEE. Este gene, universalmente presente em EPEC, codifica uma proteína de membrana externa, chamada intimina, essencial para produção de lesão A/E. Foi demonstrado que o receptor da intimina na célula epitelial, denominado Tir, é produzido pela própria EPEC e transportado, pelo sistema de secreção do tipo III, para o citoplasma do enterócito, onde é fosforilado, permitindo sua inserção na membrana celular. Há acúmulo de actina e outros elementos do citoesqueleto logo abaixo do local de aderência íntima, resultando na formação da estrutura em pedestal, característica da infecção (Vallance & Finlay, 2000; Hecht, 2001; Nougayréde *et al.*, 2003; Lommel *et al.*, 2004; Shaw *et al.* 2005; Hernandez, *et al.*, 2006).

Apesar de não possuírem EAF e não produzirem BFP, amostras de aEPEC mantêm a capacidade de produzir lesão A/E, mesmo não exibindo padrão localizado de aderência. Outras adesinas, e a própria ligação da intimina ao Tir,

são responsáveis pela aderência destas amostras (Nougayrède *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005).

O avanço do conhecimento da patogênese do microrganismo possibilitou a compreensão dos mecanismos através dos quais EPEC induz diarreia. A perda de microvilosidades, devido à lesão A/E, pode causar diarreia por má absorção e retenção de substâncias osmoticamente ativas na luz intestinal. Entretanto, má absorção, isoladamente, não explica o pequeno período de incubação observado. Mecanismos secretórios ativos parecem também estar envolvidos, incluindo elevação da concentração de cálcio nos enterócitos e fosforilação de proteínas (Kallas *et al.*, 1997; Nataro & Kaper, 1998; Nguyen, 2006). Outro mecanismo que pode estar envolvido é a ruptura das junções intercelulares, devido à ativação de quinases de miosina de cadeia leve (DeVinney *et al.*, 1999; Shifflett *et al.*, 2005; Tennant *et al.*, 2009; Scaletsky, 2009).

A infecção por EPEC é amplamente distribuída em todo o mundo. É observada tanto em indivíduos com diarreia como em portadores assintomáticos. Atinge principalmente crianças com idade abaixo de cinco anos de regiões pobres, desprovidas de água tratada e saneamento básico. Sua transmissão é feita por via fecal-oral, através de água, alimentos e objetos contaminados. O reservatório do microrganismo é o próprio ser humano, crianças sintomáticas ou não e adultos sintomáticos, mas admite-se que especialmente gado bovino, mas também outros animais como suínos, coelhos, cães e gatos, constituam fonte importante de aEPEC (Trabulsi *et al.*, 2002; Nakazato *et al.*, 2004; Morato, 2009). A dose infectante de EPEC não está bem estabelecida, mas admite-se que seja da ordem de 10^8 a 10^{10} para adultos com acidez gástrica diminuída. Estudos epidemiológicos recentes sugerem aumento da prevalência de episódios de

diarreia por aEPEC em crianças de países desenvolvidos e em desenvolvimento (Trabulsi *et al.*, 2002). De acordo com Hernandez e colaboradores (2009), as amostras mais prevalentes de EPEC em todo o mundo são dos sorotipos O111, O39:NM e ONT:H45.

EPEC está associada à diarreia aguda principalmente em crianças com idade inferior a dois anos, mas pode ser agente de diarreia também em adultos (Nataro & Kaper, 1998; Garcia *et al.*, 2009).

A frequência de isolamento de EPEC é extremamente variável. Em Belo Horizonte, Collares (2005), identificou o microrganismo em aproximadamente 18% das crianças com e sem diarreia estudadas. Entre elas, 15,9% encontravam-se infectadas por aEPEC e 1,9% por tEPEC. Em Teresina, em estudo desenvolvido entre 2003 e 2007, Nunes (2008) observou infecção por aEPEC e tEPEC em mais de 12% e 2% das crianças estudadas, respectivamente.

Em estudo realizado em São Paulo, entre 1994 e 1996, Souza e colaboradores (2002) observaram EPEC em 9% das crianças estudadas, com predomínio de tEPEC (60%) em relação a aEPEC. Prevalência semelhante de EPEC foi observada em Ribeirão Preto, entre 1994 e 1997 (Medeiros *et al.*, 2001). Em 2002 e 2003, no mesmo estado, 5% das amostras foram identificadas como aEPEC, 0,3% tEPEC e 0,5% como EHEC por Araújo e colaboradores (2007). Em Salvador, Bahia, 9,4% das amostras foram positivas para aEPEC e apenas 0,1% foram positivas para tEPEC durante o período compreendido entre 2003 e 2004 (Bueris *et al.*, 2007).

Estudo realizado no Camboja, no período de 2004 a 2006, demonstrou que EPEC estava presente em aproximadamente 9% dos casos estudados (Meng *et al.*, 2011). Prevalência semelhante do microrganismo (em torno de 10%) foi

observada na Noruega em 2001. Entre estas, mais de 95% foram classificadas aEPEC (Afset *et al.*, 2004). Em Tunis, Tunísia, entre 2001 e 2004, entre 169 amostras de fezes de crianças com diarreia, EPEC foi isolada de mais de 8% dos pacientes, sendo cerca de 5% classificadas como tEPEC e em torno de 4% como aEPEC (Gallas *et al.*, 2007). No México, em 1998, aEPEC foi isolada de 44,5% e tEPEC de aproximadamente 10% das amostras de fezes de crianças menores de 2 anos de idade incluídas no estudo (Garcia *et al.*, 2009). Segundo Alikhani e colaboradores (2006), no Irã, em 2005, em estudo que incluiu 191 amostras de fezes de crianças com e sem diarreia, 34% das amostras isoladas eram tEPEC e 36% aEPEC.

2.5 STEC

Este patotipo de *E. coli* diarreiogênica caracteriza-se pela expressão de toxina shiga, Stx, codificada pelo genes *stx*, carregados em bacteriófagos. De fato, a toxina é considerada o *sine qua non* da virulência deste grupo de bactérias diarreiogênicas.

A família Stx de citotoxinas engloba dois tipos denominados Stx1 e Stx2. Stx1, que pode ser diferenciada em Stx1 e Stx1c, é antígenicamente semelhante à toxina shiga produzida por *Shigella dysenteriae* tipo 1. Stx2 é mais heterogênea, incluindo os subtipos Stx2c, Stx2d, Stx2e e Stx2f, e diferente de Stx1 do ponto de vista antígeno. Entretanto, as duas formas de Stx apresentam a clássica estrutura A-B, a subunidade A com atividade N-glicosidase e as cinco subunidades B responsáveis pela ligação da citotoxina à superfície da membrana celular por meio de um receptor de natureza glicolipídica. Seu principal

mecanismo de ação é a interrupção da síntese protéica em células eucariotas, mediado pela subunidade A, por meio da clivagem do RNA ribossômico (Karch *et al.*, 2005; Ramamurthy, 2008). Maiores detalhes do mecanismo de ação de STX serão apresentados no próximo item, relativo a EHEC.

A dose infectante do microrganismo é desconhecida, mas, aparentemente é baixa. Após ingestão de água e alimentos contaminados, a bactéria sobrevive aos mecanismos de defesa gástricos e atinge o intestino. Admite-se que o principal reservatório do microrganismo na natureza seja constituído pelo gado bovino, que, comumente, não manifesta sinais ou sintomas da infecção (Gyles, 2011; Hussein, 2006). O órgão alvo de STEC não é bem conhecido, provavelmente em decorrência do fato de que EHEC tem sido o foco principal dos estudos relativos a bactérias que expressam toxina shiga. De forma semelhante, as manifestações clínicas da infecção por STEC são pouco conhecidas. Entretanto, é unânime a opinião dos investigadores de que STEC provoca quadros clínicos extremamente variados, desde infecção assintomática até quadros graves de colite hemorrágica e complicações dramáticas como síndrome hemolítica-urêmica (Gyles, 2006). Aparentemente, infecção por STEC é habitualmente menos grave que a doença associada a EHEC (Ramamurthy, 2008).

2.6 EHEC

Este patotipo expressa fatores de virulência tipicamente exibidos por EPEC, como intimina, e por STEC, como toxina shiga. Desta forma, produz alterações no enterócito denominadas lesão A/E e alterações localizadas no intestino ou a

distância nos rins e sistema nervoso, relacionadas com a produção e liberação de Stx (Ferens *et al.*, 2011).

As manifestações clínicas da infecção por EHEC são variáveis, desde formas assintomáticas e quadros clínicos discretos caracterizados por diarreia aquosa sem eliminação de sangue a quadros extremamente graves de diarreia sanguinolenta, denominados colite hemorrágica, até a complicação mais grave do processo, a síndrome hemolítica-urêmica, caracterizada por hemólise intravascular, trombocitopenia e falência renal aguda. O membro mais conhecido do grupo é a *E. coli* O157:H7 que, entretanto, não é o único sorotipo de *E. coli* associado aos quadros graves da doença (Ferens *et al.*, 2011; Gyles, 2006).

As primeiras evidências de participação de associação entre *E. coli* e síndrome hemolítica-urêmica datam de 1983 (Karmali *et al.*, 1983). Desde então, numerosos estudos, desenvolvidos em diferentes regiões do planeta, têm documentado a associação entre EHEC e colite hemorrágica e síndrome hemolítica-urêmica (Karch *et al.*, 2005).

O fator de virulência que explica a maioria das manifestações clínicas associadas à infecção por EHEC é Stx. Como mencionado anteriormente, duas famílias de Stx são reconhecidas com base em estudos imunológicos e de sequenciamento dos genes *stx* (O'Brien *et al.*, 1992). A cascata de eventos que culmina com o surgimento de colite hemorrágica e insuficiência renal é complexa, mas, aparentemente, está associada a lesão da microvasculatura do intestino e dos rins (Karch *et al.*, 2005). Em síntese, após aderência íntima aos enterócitos, à semelhança de EPEC, EHEC produz Stx. A citotoxina age sobre os enterócitos e é também translocada do intestino para o sistema circulatório. Pode atingir sobre

diversos órgãos e tecidos, mas a lesão mais conhecida ocorre nos capilares glomerulares e intestinais.

Após ligar-se ao receptor Gb3 (globotriaosilceramida) na superfície de células alvo eucarióticas por meio das subunidades B, a subunidade A é internalizada por endocitose e atinge retículo endoplasmático, onde sofre processamento, e, finalmente, os ribossomos. Nestas organelas, cliva o RNA ribossômico e induz parada da síntese protéica e morte celular. Este não é o único mecanismo de agressão de Stx. A toxina induz, ainda, a expressão de citocinas, provavelmente envolvidas na fisiopatologia da doença associada a bactérias capazes de produzir a citotoxina. Acredita-se, atualmente, que as manifestações clínicas mais graves da infecção por EHEC, colite hemorrágica e síndrome hemolítica-urêmica, estejam associadas à lesão endotelial induzida por Stx. Não existem explicações para o fato, mas Stx2 parece estar associada aos eventos mais graves que podem ocorrer na infecção por EHEC (Taylor, 2008; Ferens *et al.*, 2011).

Embora muitas amostras de EHEC sejam produtoras de Stx, o sorotipo O157:H7 é o mais conhecido, sendo responsabilizado pela maioria dos casos de síndrome hemolítica-urêmica em todo o mundo (Ferens *et al.*, 2011; Frank *et al.*, 2011). O reservatório da bactéria é, principalmente, o gado bovino e outros ruminantes. EHEC pode ser transmitida para o ser humano através do consumo de água e alimentos contaminados, entre eles carne e leite e seus derivados crus ou mal processados, assim como vegetais contaminados com excreta de bovinos e outros ruminantes (Ferens *et al.*, 2011).

O genoma da *E. coli* O157:H7 foi recentemente sequenciado. Contém 1387 novos genes ausentes em amostras consideradas não patogênicas. A análise do

genoma sugere que há uma variedade de genes de virulência potencial que ainda não foram exploradas, incluindo aqueles que codificam adesinas, sistemas de secreção e toxinas. Como mencionado, Stx é carregada por fago lisogênico. *eae*, como em EPEC, está presente na ilha de patogenicidade LEE (WHO, 2011¹).

EHEC pode ser identificada por técnicas genéticas que detectam a presença dos genes *eae* e *stx1* e *stx2* e pelo método microbiológico convencional por meio da confirmação do isolamento de *E. coli* sorbitol negativo. Este teste, entretanto, é presuntivo, não possibilitando a confirmação de que a bactéria isolada é EHEC (WHO, 2011¹).

Pacientes que não apresentam complicações evoluem para a cura em até 10 dias. Por outro lado, transfusão de sangue e hemodíalise podem ser necessários no tratamento de pacientes com síndrome hemolítica-urêmica. A infecção pode ser prevenida por meio do emprego das regras gerais de higiene e saneamento (Ferens *et al.*, 2011; Gyles, 2011).

Em Belo Horizonte, em estudo que incluiu crianças com até cinco anos de idade atendidas entre março de 2004 e março de 2005, EHEC foi isolada de 1,3% dos pacientes. Destes, 50% apresentaram resistência a ampicilina e associação sulfametoxazol-trimetoprim (Collares, 2005). Na Noruega, Afset e colaboradores (2004) detectaram EHEC em aproximadamente 1% das crianças atendidas em 2001. Por outro lado, na Tunísia, entre 2001 e 2004, a prevalência do patotipo em amostras fecais de crianças foi superior a 10% (Gallas *et al.*, 2007).

¹ <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>

No primeiro semestre deste ano, foi detectado, na Alemanha, surto de infecção por uma amostra de *E. coli* produtora de Stx, que acometeu mais de 3000 indivíduos. A amostra de *E. coli* responsável pelo surto foi identificada como sorotipo O104:H4. Trata-se de amostra fermentadora de lactose e sorbitol, que expressa STx2 e carrega diversos outros genes de virulência típicos de *E. coli* enteroagregativa, como *attA*, *aggR*, *aap*, *aggA* e *aggC*, todos localizados em um plasmídeo. Não alberga *eae*, típico de EPEC e EHEC, não produz EAST-1, uma enterotoxina termoestável e é resistente a antibióticos β -lactâmicos, cefalosporinas de terceira geração e quinolonas. Admite-se que a amostra foi adquirida por meio do consumo de vegetais crus ou condimentos de salada consumidos crus. Entre os mais de 3000 casos da infecção, 25% apresentaram síndrome hemolítica-urêmica entre os quais aproximadamente 30 evoluíram para óbito. Os demais pacientes (2412 casos) apresentaram dor abdominal intensa e diarreia sanguinolenta; destes, 12 evoluíram para óbito. A maioria dos casos ocorreu em adultos (aproximadamente 90%) do sexo feminino (cerca de 70%). O período de incubação foi, em média, de 8 dias (Frank *et al.*, 2011).

2.7 SUSCETIBILIDADE DE EPEC, STEC e EHEC A ANTIMICROBIANOS

Não há indicação de tratamento com antimicrobianos para erradicação do agente etiológico da imensa maioria dos casos de diarreia associados EPEC, STEC e EHEC. A doença é autolimitada na maioria das vezes, havendo indicação apenas de reposição fluidos e eletrólitos e manutenção de alimentação adequada. Entretanto, especialmente nos casos graves e prolongados, em crianças desnutridas e em pacientes com deficiência do sistema imune, tratamento com

antimicrobianos pode ser necessário. A seleção da droga antibacteriana a ser utilizada deve obedecer ao perfil de suscetibilidade da bactéria, podendo haver diferenças regionais importantes que justificam a regionalização da escolha do antimicrobiano e tornam necessária a vigilância permanente. Acredita-se que a resistência aos antimicrobianos de EPEC, como para outras bactérias, esteja relacionada à pressão seletiva exercida pelo uso abusivo dos mesmos (Scaletsky *et al.*, 2010).

Estudos recentes relativos à resistência de EPEC, STEC e EHEC a antimicrobianos são escassos no Brasil, em especial no que se refere aos dois últimos patótipos de *E. coli* diarréiogênicos mencionados.

Scaletsky e colaboradores (2010) demonstraram que, em São Paulo, mais de 60% das amostras de tEPEC eram resistentes a ampicilina e sulfametoxazol-trimetoprim, não tendo sido detectada resistência à ciprofloxacina e ácido nalidíxico. Para aEPEC, resistência à ampicilina e à associação sulfametoxazol-trimetoprim estava presente em, aproximadamente, um quarto das amostras isoladas. Altas taxas de resistência de EPEC a ácido nalidíxico (quase 30%) sulfametoxazol-trimetoprim (mais de 80%) foi observada no Camboja entre 2004 e 2006 (Meng *et al.*, 2011). Por outro lado, à semelhança dos dados relatados para São Paulo, resistência a ciprofloxacina não foi detectada pelos mesmos autores. Na Tunísia, entre 2001 e 2004, alta resistência à associação sulfametoxazol-trimetoprim foi observada na totalidade das amostras de EPEC isoladas de amostras fecais de crianças com diarreia (Gallas *et al.*, 2007).

Em Belo Horizonte, Collares (2005) demonstrou que mais de 30% das amostras de tEPEC eram resistentes a sulfametoxazol-trimetoprim e 67% a ampicilina e cefazolina. Entre as aEPEC, 16% mostraram-se resistentes à

associação sulfametoxazol-trimetoprim e 44% a ampicilina e cefazolina (Collares, 2005). Para EHEC, os dados são de 50% de resistência a ampicilina e à associação sulfametoxazol-trimetoprim (Collares, 2005).

Em Teresina, Nunes (2008) observou que todas as amostras de aEPEC e tEPEC isoladas eram suscetíveis à ciprofloxacina e aproximadamente 95% ao ácido nalidíxico. Resistência a ampicilina, cefalotina e sulfametoxazol-trimetoprim foi detectada em mais de 50%, 75% e 50%, respectivamente, das amostras de aEPEC e tEPEC isoladas de crianças com diarreia aguda.

3.1 OBJETIVO GERAL

- Contribuir para o conhecimento da etiologia da diarreia infecciosa aguda em crianças em Belo Horizonte/MG.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar, por PCR, os genes *eae*, *bfpA* e *stx1* e *stx2* em amostras de *E. coli* isoladas de crianças com diarreia aguda e sem diarreia.
- Investigar a prevalência de EPEC, STEC e EHEC em crianças com diarreia aguda e sem diarreia atendidas em Belo Horizonte.
- Estudar fatores clínicos e epidemiológicos associados à diarreia por EPEC, EHEC e STEC.
- Investigar o padrão de suscetibilidade a drogas antimicrobianas das amostras de EPEC, EHEC e STEC isoladas.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (ANEXO I). Autorização para participação das crianças foi obtida dos pais ou responsáveis (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - ANEXO II).

4.1 PACIENTES

Foram avaliadas 831 crianças com até 69 meses de idade, atendidas entre março/2004 e julho/2007, no Hospital Infantil João Paulo II/FHEMIG, em Belo Horizonte/MG, cujos pais procuraram atendimento espontaneamente ou por encaminhamento. O Hospital é responsável por prestar assistência de qualidade a crianças referenciadas pelas macrorregiões do Estado de Minas Gerais e pelos municípios que compõem a microrregião e a Região Metropolitana de Belo Horizonte, como centro de referência em atendimento ambulatorial e de internação e para os programas especiais do Governo em relação à pediatria, instituindo-se ainda como um hospital de ensino.

Nas culturas de fezes de 42 crianças, *E. coli* não foi isolada; por esta razão, estes pacientes foram excluídos desta investigação. Entre as 789 crianças incluídas na análise, 392 (220 do sexo masculino, idade média 13,1 meses, mediana 10,0 meses, até 66 meses de idade) apresentavam diarreia aguda e 397 (222 do sexo masculino, idade média 10,4 meses, mediana 7,0 meses, até 69 meses de idade) não apresentavam diarreia.

Diarreia aguda foi definida como alteração súbita do hábito intestinal, com eliminação de fezes com consistência mais amolecida que o habitual, duração de

até sete dias e ocorrência de pelo menos três episódios evacuatórios nas últimas 24 horas. Foram excluídos pacientes hospitalizados, que apresentavam qualquer contra-indicação à coleta da amostra fecal ou que haviam feito uso de drogas antimicrobianas nos 15 dias anteriores à data da coleta.

4.2 AMOSTRAS FECALIS

As amostras fecais foram obtidas após evacuação espontânea ou, quando necessário, pelo emprego de sonda retal nº 8¹, após aplicação de pomada de Cloridrato de Lidocaína 2%². O material foi introduzido em dois frascos estéreis³, um deles contendo 5 mL de tampão fosfato glicerinado (Forbes *et al.*, 1998), e transportado para o Laboratório, em banho de gelo, no prazo máximo de 1 h.

A amostra transportada em tampão foi utilizada para cultura e a outra para preparação de esfregaço e manutenção do espécime.

4.3 ESTUDO CLÍNICO E EPIDEMIOLÓGICO

Os dados clínicos e epidemiológicos foram registrados em ficha própria (ANEXO III). Foram obtidas informações relativas a nível socioeconômico, condições de higiene e saneamento básico, uso de medicamentos, duração e dados epidemiológicos relativos à doença diarréica, presença de desidratação, entre outras informações clínicas.

¹ Mark Med, Bragança Paulista, SP, Brasil

² Cristália, Itapira, SP, Brasil

³ J. Prolab, São José dos Pinhais, PR, Brasil

4.4 ESTUDO LABORATORIAL

4.4.1 PESQUISA DE EPEC, STEC E EHEC

4.4.1.1 Isolamento e identificação por método bioquímico-fisiológico

Após homogeneização, as amostras fecais foram cultivadas, com auxílio de alça bacteriológica, em MacConkey Agar⁴ e em SS Agar⁵. As culturas foram incubadas a 36°C, por até 48 h.

Após este período, cinco colônias lactose negativas e cinco colônias lactose positivas, obtidas de cada meio de cultura, morfologicamente diferentes sempre que possível, foram transferidas para Triple Sugar Iron Agar⁶ para identificação presuntiva de *E. coli*. A identificação da espécie bacteriana foi confirmada através de testes bioquímico-fisiológicos por meio da utilização dos meios EPM (Toledo *et al.*, 1982), citrato⁷ e MiLi (Toledo *et al.*, 1982), que permitiram avaliar a habilidade de fermentar e de produzir gás a partir de glicose, de produzir H₂S a partir de aminoácidos sulfurados, urease e indol a partir de triptofano, de descarboxilar lisina, desaminar fenilalanina por via oxidativa e utilizar citrato como única fonte de carbono, bem como a presença de motilidade.

As amostras de *E. coli* isoladas foram cultivadas em Tryptic Soy Agar⁸ por 24 horas a 36°C para extração de DNA, empregado para a pesquisa de marcadores genéticos do microrganismo, e para avaliação do perfil de

⁴ Difco, Sparks, MD, Estados Unidos

⁵ Difco

⁶ Himedia, Mumbai, India

⁷ Himedia

⁸ Himedia

suscetibilidade a drogas antimicrobianas e manutenção dos isolados.

4.4.1.2 Diagnóstico genético

4.4.1.2.1 Processamento das amostras

Parte do crescimento bacteriano em Tryptic Soy Agar de todas as amostras de *E. coli* isoladas, foi transferido para tubos de microcentrifuga contendo 500 µL de água Milli-Q estéril. Após homogeneização em vórtex, o material foi centrifugado a 6000 x *g*, por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento empregado para extração de DNA.

4.4.1.2.2 Extração de DNA

Os sedimentos de culturas bacterianas foram homogeneizados em tampão STET (sacarose⁹ 8%, Tris-HCl¹⁰ 50 mM, EDTA¹¹ 50 mM, Triton X-100¹² 0,1%; pH 8,0). A seguir, foram adicionados SDS¹³ (1,5%) e RNase A¹⁴ (0,02 µg/µL). O material foi homogeneizado e, após 1 h de incubação a 37°C, foi adicionada proteinase K¹⁵ (0,7 µg/µL). A suspensão foi homogeneizada e incubada a 37°C. Após aproximadamente 12 h, NaCl¹⁶ (0,7 µmol/µL) e solução contendo partes

⁹ Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

¹⁰ Promega, Madison, WI, Estados Unidos

¹¹ Promega

¹² Calbiochem, La Jolla, CA, Estados Unidos

¹³ Calbiochem

¹⁴ Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos

¹⁵ Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS, Brasil

¹⁶ Vetec

iguais de CTAB¹⁷ 5% e NaCl 0,7 M (1:10) foram adicionadas e a suspensão foi agitada delicadamente e incubada por 10 min, a 56°C. DNA foi extraído em mistura de fenol¹⁸ e clorofórmio¹⁹ (1:1) e precipitado a -20°C com acetato de sódio²⁰ 0,3 M (2,6 µmol/µL) e dois volumes de etanol absoluto²¹. A suspensão foi centrifugada a 12000 x *g* por 75 min e, após evaporação do etanol residual, foram acrescentados dois volumes de etanol 70%. O material foi novamente centrifugado a 12000 x *g* por 30 min e o sedimento de DNA foi diluído em água quimicamente pura estéril²² (Fox *et al.*, 1994). A concentração de DNA foi determinada em espectrofotômetro UV (Nanodrop 1000 Spectrophotometer)²³, empregando-se comprimento de onda de 260 nm.

4.4.1.2.3 Identificação bacteriana e pesquisa de fatores de virulência

A identificação de tEPEC e aEPEC foi realizada pela pesquisa de fatores de virulência, por PCR multiplex, conforme protocolo geral descrito a seguir. Uma das reações multiplex foi utilizada para detecção dos genes *eae* e *bfpA* (reação 1) e a outra para pesquisa de *stx1* e *stx2* (reação 2). DNA extraído das amostras isoladas de *E. coli* (concentração final de 1 ng/µL) foi adicionado a uma mistura de reação (volume final de 20 µL) contendo tampão (concentração final Tris HCl 10 mM - pH 8,4, KCl 25 mM), MgCl₂ 1,5 mM, 200 µM de cada dNTP²⁴, 0,5 µM de

¹⁷ Sigma

¹⁸ Phoneytria

¹⁹ Merck^a, Darmstadt, Alemanha

²⁰ Merck

²¹ Merck^a

²² Millipore-Direct Q3, Molsheim, França

²³ Thermo Scientific, Wilmington, DE, Estados Unidos

²⁴ Ludwig

*primer*²⁵ (Quadro 1) e 1 U de *Taq* DNA polimerase²⁶. Os microtubos contendo a mistura de reação foram transferidos para termociclador²⁷, e submetidos às seguintes condições de reação: desnaturação inicial a 94°C por 5 min seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 90 s, anelamento a 60°C por 90 s e extensão a 72°C por 90 s. Na sequência, as reações foram submetidas a período de extensão final a 72°C por 5 min (Vidal *et al.*, 2005).

Em cada lote de reação foram incluídos controles negativo (*E. coli* ATCC 25922) e negativo interno (água quimicamente pura). Amostras de DNA extraído de EHEC (CDC EDL-933, INCQS 00171; *eae*⁺*stx1*⁺*stx2*⁺) e EPEC (CDC 0126, INCQS 00184; *eae*⁺*bfp*⁺) foram utilizadas como controle positivo na reação 1. Na reação 2, foi utilizado DNA da amostra de EHEC (CDC EDL-933, INCQS 00171; *eae*⁺*stx1*⁺*stx2*⁺).

Os produtos amplificados foram discriminados por eletroforese em gel de poliacrilamida²⁸ 8%, empregando-se tampão Tris-borato²⁹-EDTA (Sambrook *et al.*, 1989). Após coloração com brometo de etídio³⁰ 2,5 µg/mL, o gel foi examinado em transiluminador de luz UV³¹. Padrão de 100 pb³² foi empregado como marcador de peso molecular.

²⁵ Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA, Estados Unidos

²⁶ Phorontia

²⁷ Eppendorf Mastercycler, Hamburg, Alemanha

²⁸ Ludwig

²⁹ Synth, Diadema, SP, Brasil

³⁰ Sigma

³¹ Cole-Parmer, Vernon Hills, Illinois, Estados Unidos

³² Fermentas, Glen Burnie, MD, Estados Unidos

QUADRO 1

Primers utilizados para pesquisa de marcadores genéticos de EPEC¹.

Gene	<i>Primers</i>	<i>Amplicon</i> (pb)
<i>eae</i>	F: 5'-TCA ATG CAG TTC CGT TAT CAG TT-3'	482
	R: 5'-GTA AAG TCC GTT ACC CCA ACC TG-3'	
<i>bfp</i>	F: 5'-GGA AGT CAA ATT CAT GGG GGT AT-3'	300
	R: 5'-GGA ATC AGA CGC AGA CTG GTA GT-3'	
<i>stx1</i>	F: 5'-CAG TTA ATG TGG TGG CGA AGG-3'	348
	R: 5'-CAC CAG ACA ATG TAA CCG CTG-3'	
<i>stx2</i>	F: 5'-ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G-3'	584
	R: 5'-GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C-3'	

¹, *Escherichia coli* enteropatogênica; Fonte: Vidal *et al.*, 2005.

Amostras com genótipo *eae*⁺*stx*⁻*bfpA*⁺ foram consideradas tEPEC e aquelas com genótipo *eae*⁺*stx*⁻*bfpA*⁻ foram identificadas como aEPEC. Amostras *eae*⁺*stx*⁺ e *eae*⁻*stx*⁺ foram classificadas como EHEC e STEC, respectivamente.

4.4.2 TESTE DE SUSCETIBILIDADE A DROGAS ANTIMICROBIANAS E PESQUISA DE ESBL

Foi realizado teste de suscetibilidade a drogas antimicrobianas, pelo método de difusão em ágar (CLSI – M100-S21, 2011), de uma amostra de tEPEC e/ou

aEPEC, selecionada ao acaso, de cada paciente colonizado por EPEC. Parte do crescimento bacteriano em Tryptic Soy Agar, conforme descrito no item 4.4.1.1, foi transferido para tubo de ensaio contendo Tryptic Soy Broth³³ que foi incubado a 36°C até a obtenção de turvação correspondente ao padrão McFarland 0,5. As culturas foram semeadas, com auxílio de *swab*, em Ágar Mueller-Hinton³⁴ e, após 10 a 15 min, discos comerciais impregnados com drogas antimicrobianas³⁵ foram depositados, com auxílio de pinça estéril, na superfície do meio de cultura. As culturas foram incubadas a 37°C e, após aproximadamente 18 h, a leitura foi realizada pela medida do diâmetro dos halos de inibição do crescimento das amostras e por comparação dos resultados com tabelas padronizadas publicadas pelo CLSI (CLSI – M100-S21, 2011). Foram empregadas as seguintes drogas antimicrobianas: ácido nalidíxico, ampicilina, cefalotina, cefazolina, ciprofloxacina e associação sulfametoxazol-trimetoprim (Mota *et al.*, 2003; CLSI – M100-S21, 2011). A amostra padrão *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle (CLSI – M100-S21, 2011).

Foi realizado teste de triagem para produção de ESBL, pelo método de difusão em ágar, empregando-se discos de ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima e aztreonam (CLSI document M100-S21, 2011).

4.4.3 MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Após identificação presuntiva em Triple Sugar Iron Agar³⁶, parte do crescimento bacteriano em Tryptic Soy Agar, conforme descrito no item 4.1.1, foi

³³ Difco

³⁴ Himedia

³⁵ Cecon, São Paulo, SP, Brasil

³⁶ Himedia

transferido para frasco de criopreservação contendo Caldo Brucella³⁷ acrescido de glicerol 10%. Os frascos foram mantidos em freezer -70°C até o momento de sua utilização.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados por meio dos testes χ^2 com correção de Yates e exato de Fisher, conforme a necessidade, considerando-se as diferenças significativas quando $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas empregando-se o *software* SPSS 19.0³⁸.

³⁷ Difco

³⁸ SPSS Inc., Chicago, Illinois, Estados Unidos

5.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

Amostras fecais foram obtidas de 831 pacientes com até 69 meses de idade. *E. coli* não foi isolada de 42 (5,1%) crianças, razão pela qual estes pacientes foram excluídos da investigação. Entre as 789 crianças incluídas no estudo (média de idade 11,8 meses, mediana 8,0 meses, um mês a 69 meses), 392 (49,7%) apresentaram-se com diarreia aguda e 442 (56,0%) eram do sexo masculino. Aproximadamente metade das crianças estudadas tinha até oito meses de idade e pouco mais de 80% até um ano e seis meses.

Um total de 431 (54,6%) amostras fecais foi obtido nos meses mais secos do ano, compreendidos entre abril e setembro³⁹; entre elas 227 (52,7%) provenientes de crianças com diarreia. Entre as crianças atendidas no período chuvoso (n = 358, 45,4%), 165 (46,1%) apresentavam diarreia aguda.

A renda familiar mensal média foi de 1,8 salários mínimos (de inferior a um até 10 salários mínimos). Renda familiar de até 2,5 salários mínimos mensais foi informada pelos responsáveis por aproximadamente 80% dos pacientes atendidos.⁴⁰

5.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *E. coli*

Foram isoladas 9507 colônias de *E. coli* (média de 11,44 por paciente, entre uma e 37 colônias por paciente).

Como mencionado anteriormente, *E. coli* não foi cultivada a partir de

³⁹ www.inpe.gov.br

amostras fecais de 42 pacientes (média de idade 10,7 meses; renda familiar mensal média 1,7 salários mínimos; 27/64,3% do sexo masculino; 24/57,1% obtidas nos meses secos; 19/45,2% com diarreia). Outras bactérias ou vírus diarreiogênicos foram detectados em amostras fecais de nove (21,4%) destas crianças; estes resultados são parciais uma vez que a pesquisa de enteropatógenos de todo o período de estudo ainda não foi concluída. Outras enterobactérias (*Klebsiella*, *Morganella*, *Enterobacter*, *Proteus* e *Citrobacter*) foram obtidas, isolada ou em diferentes combinações, das fezes dos demais 33 (78,6%) pacientes.

5.3 PESQUISA DE *eae*, *bfpA* e *stx*

eae, *bfpA* e *stx* foram detectados em amostras de *E. coli* isoladas de 127 (16,1%) pacientes: *eae* em 125 (98,4%), *bfpA* em 19 (15,0%) e *stx* em 10 (7,9%): *stx1* em oito (80,0%) e *stx2* em dois (20,0%). *eae* foi detectado isoladamente em 99 (79,2%) crianças, em associação com *bfpA* em 19 (15,2%) e simultaneamente com *stx1* ou *stx2* em sete (5,6%) e um (0,8%) pacientes, respectivamente. Os genes *stx1* e *stx2* foram detectados isoladamente em amostras de *E. coli* obtidas de um (10,0%) paciente cada. Nenhuma amostra de *E. coli* carregava apenas o gene *bfpA* (TAB. 1).

Entre as amostras de *E. coli stx* positivas, a maioria foi isolada de crianças com diarreia aguda. A maioria dos pacientes carregando amostras *eae*, *bfpA* ou *stx* positivas era do sexo masculino e foram atendidos nos meses mais secos do ano, exceto para *stx* (50,0%). A média de idade dos pacientes colonizados por amostras de *E. coli eae* ou *stx* positivas foi, aproximadamente, 11 meses. A

distribuição por ano de atendimento das crianças infectadas por amostras de *E. coli* albergando os três genes investigados foi semelhante: entre aproximadamente 11% e 17% para *eae* e 0% e 3% para *bfpA* e *stx*. Quando o número total de amostras da bactéria carreando cada gene foi considerado, aquelas *eae* positivas foram mais comuns em 2005 e 2006 (mais de 30%), *bfpA* positivas em 2005 (mais de 40%) e *stx* positivas em 2004 e 2006 (40,0%). Se a análise considera o número de crianças atendidas em cada ano, observa-se predomínio de amostras *stx* positivas em 2004 e menor frequência de isolamento daquelas *eae* positivas em 2004 (TAB. 1). Associação estatística não foi observada para qualquer dos parâmetros analisados.

5.4 INFECÇÃO POR EPEC, EHEC e STEC

Entre as 789 crianças incluídas no estudo, EPEC típica, EPEC atípica, EHEC e STEC foram identificadas em 19 (2,4%), 106 (13,4%), 8 (1,0) e 3 (0,3%) amostras isoladas de 127 pacientes (TAB. 2). Não foi observada associação estatisticamente significativa entre patotipo de *E. coli* diarreiogênica e diarreia.

Nove (1,1%) crianças apresentaram infecção mista (TAB. 2 e TAB. 3): cinco (55,6%) com diarreia, três (33,3%) do sexo masculino, média de idade $9,2 \pm 4,3$ meses, mediana 9,0 meses, de 4 a 15 meses, quatro (44,4%) atendidos em 2005, sete (77,8%) nos meses mais secos do ano. Associação estatística entre infecção mista e diarreia, sexo, idade média e estação do ano não foi observada. O perfil de infecção mista mais frequentemente observado foi a associação entre tEPEC e aEPEC, detectado em 66,7% dos casos (6/9) (TAB. 3).

Para evitar distorções, os pacientes com infecção mista não foram incluídos

nas análises relativas à relação entre patotipo de *E. coli* e presença de diarreia e parâmetros clínicos e epidemiológicos.

5.5 ESTUDO CLÍNICO E EPIDEMIOLÓGICO

5.5.1 Distribuição anual da infecção por EPEC, EHEC e STEC

Quando a análise considerou o número de pacientes infectados por cada patotipo diarreiogênico de *E. coli*, aEPEC e infecção mista foram mais comuns em 2005 e EHEC em 2006. Colonização por tEPEC e STEC mostrou-se distribuída igualmente em 2005, 2006 e 2007 e em 2004 e 2005, respectivamente. Quando o estudo considerou o número total de crianças com infecção por *E. coli* diarreiogênica em cada ano, tEPEC foi mais freqüente em 2007, aEPEC em 2005, STEC em 2004, EHEC em 2006 e infecção mista em 2005 e 2007. A TAB. 4 apresenta os dados relativos à distribuição anual de monoinfecção por EPEC, STEC e EHEC e de infecção mista. Associação estatística referente à distribuição anual de monoinfecção por EPEC, STEC e EHEC ou infecção mista não foi observada, independente do parâmetro considerado, ou seja, número total de pacientes com infecção por cada patotipo ou total anual de pacientes com infecção por *E. coli* diarreiogênica.

5.5.2 Distribuição sazonal da infecção por EPEC, EHEC e STEC

A TAB. 5 mostra a distribuição sazonal da infecção pelos diferentes grupos diarreiogênicos de *E. coli* identificados. Infecção por tEPEC e STEC mostrou-se igualmente distribuída nos meses secos e nos meses chuvosos. Não houve diferença significativa no que se refere à distribuição sazonal da infecção por EPEC, STEC e EHEC.

5.5.3 Distribuição etária da infecção por EPEC, EHEC e STEC

A média de idade das crianças com monoinfecção por EPEC, EHEC ou STEC foi 11 meses (desvio padrão 8,6; idade variando entre 1 e 48 meses) e a mediana 9,0 meses. No que se refere às crianças infectadas por tEPEC ou aEPEC, as médias de idade foram 8,6 e 11,3 meses, respectivamente. A média de idade das crianças com infecção por EHEC ou STEC foi 9,0 e 15,5 meses, respectivamente. Diferença estatisticamente significativa entre as médias de idade das crianças colonizadas por cada patotipo de *E. coli* diarreiogênica não foi observada.

A TAB. 6 mostra a distribuição, por faixa etária, das crianças monocolonizadas por amostras dos patotipos EPEC, EHEC e STEC de *E. coli* diarreiogênica.

5.5.4 Distribuição da infecção por EPEC, EHEC e STEC de acordo com o sexo.

Embora diferença estatisticamente significativa não tenha sido observada, a infecção pelos patótipos enteropatogênico, enterohemorrágico e produtor de toxina shiga foi mais comum em crianças do sexo masculino, tanto se considerados globalmente como quando foram analisados por patótipo. Exceção foi observada para STEC, para o qual a distribuição entre os sexos foi idêntica (TAB. 7).

5.5.5 Parâmetros clínicos na infecção por EPEC, EHEC e STEC

Na TAB. 8, estão apresentados dados clínicos relacionados à infecção pelos patótipos diarreiogênicos de *E. coli* observados nas crianças com diarreia aguda. Associação estatisticamente significativa não foi observada para qualquer parâmetro analisado.

Fezes líquidas ou semi-líquidas e volume evacuatório aumentado foram observadas em mais de 50% dos casos com infecção por tEPEC e EHEC e aEPEC e EHEC, respectivamente. Presença de sangue ou pus foi raramente relatada pelos responsáveis pelas crianças com diarreia associada aos patótipos de *E. coli* investigados neste estudo; nenhum paciente com infecção por tEPEC e STEC apresentou sangue ou pus macroscopicamente visível nas fezes. Vômito foi relatado para a maioria das crianças investigadas, independente do tipo diarreiogênico de *E. coli* identificado. Febre foi informada pelos responsáveis por

mais de 50% dos pacientes com diarreia por aEPEC e EHEC. Mais de dois terços dos pacientes apresentavam desidratação; a totalidade dos pacientes com infecção por EHEC e STEC para as quais o parâmetro foi registrado encontrava-se desidratada no momento do atendimento.

5.6 SUSCETIBILIDADE DE AMOSTRAS DE EPEC, STEC E EHEC A ANTIMICROBIANOS

Consideramos, para estas análises, a totalidade das amostras de *E. coli* diarreiogênicas isoladas, tanto dos pacientes mono infectados como daqueles com infecção mista.

As maiores taxas de resistência das amostras de EPEC, EHEC e STEC foram observadas para cefazolina (76/136; 55,9%) e cefalotina (46/136; 33,8%) e as menores para ciprofloxacina (2/136; 1,5%) e ácido nalidíxico (12/136; 8,8%). Os índices de resistência a ampicilina e sulfametoxazol-trimetoprim foram idênticos e ligeiramente superiores a 25%.

Todas as amostras de tEPEC e STEC foram suscetíveis à ciprofloxacina e ao ácido nalidíxico. As duas amostras de aEPEC resistentes à ciprofloxacina foram também resistentes ao ácido nalidíxico. Resistência à ciprofloxacina foi observada apenas em 2006 (duas amostras) e ao ácido nalidíxico em 2005 (cinco amostras), 2006 (seis amostras) e 2007 (uma amostra).

A compilação dos resultados dos testes de sensibilidade das amostras de *E. coli* diarreiogênica isoladas encontra-se na TAB. 9.

O teste de triagem para produção de ESBL foi negativo para todas as amostras de *E. coli* diarreiogênica estudadas.

Quando a resistência aos antimicrobianos das amostras de EPEC, EHEC e STEC foi analisada de acordo com o ano de atendimento do paciente (TAB. 10), observou-se aumento gradativo nas taxas relativas a cefalotina (aproximadamente 10 vezes; comparação entre taxas observadas em 2004 e 2007) e cefazolina (3 vezes; comparação entre taxas observadas em 2004 e 2007) e diminuição das porcentagens referentes ao ácido nalidíxico quando os índices obtidos para 2005 (2,6 vezes) e 2006 (4,1 vezes) foram comparados aos de 2007. Os índices de resistência à ampicilina permaneceram relativamente estáveis durante o período do estudo. Em relação à associação sulfametoxazol-trimetoprim, observou-se queda (1,5 vezes) nas taxas de resistência quando os dados de 2004 foram comparados com aqueles de 2005. A partir de então, os índices de resistência à associação de antimicrobianos permaneceu relativamente estável. Diferença estatisticamente significativa foi observada apenas para cefalotina e cefazolina ($p < 0,01$ para ambos).

Tabela 1 – Relação entre colonização por amostras de *E. coli eae* (n = 125), *bfpA* (n = 19) e *stx* (n = 10) positivas e parâmetros clínicos e epidemiológicos.

Parâmetro	<i>eae</i> n (%)	<i>bfpA</i> n (%)	<i>stx</i> n (%)
Presença de diarreia	58 (46,4)	7 (36,8)	8 (80,0)
Sexo masculino	76 (60,8)	12 (63,2)	6 (60,0)
Idade (em meses)			
Média ± desvio padrão	10,8 ± 8,3	8,5 ± 5,4	11,5 ± 4,17
Mediana	9,0	7,0	12,5
Limites	1 a 48	3 a 24	5 a 18
Distribuição anual			
2004 (n = 138)	15 (12,0 ¹ /10,9 ²)	0 (0,0/0,0)	4 (40,0/2,9)
2005 (n = 268)	46 (36,8/17,2)	8 (42,1/3,0)	1 (10,0/0,4)
2006 (n = 231)	38 (30,4/16,5)	6 (31,6/2,6)	4 (40,0/1,7)
2007 (n = 152)	26 (20,8/17,1)	5 (26,3/3,3)	1 (10,0/0,7)
Período chuvoso	54 (43,2)	7 (36,8)	5 (50,0)

¹, considerando o total de amostras *eae*, *bfpA* e *stx* positivas; ², considerando o número total de amostras obtidas em cada ano.

Tabela 2 - Patotipos de *E. coli* diarreio gênica isolados de crianças com e sem diarreia em Belo Horizonte entre março de 2004 e julho de 2007.

Diarreia	EPEC ¹		EHEC ²		STEC ³		Mista
	típica	atípica	<i>stx1</i> ⁺ ⁴	<i>stx2</i> ⁺	<i>stx1</i> ⁺	<i>stx2</i> ⁺	
Com	3	46	4	0	1	1	5
Sem	9	53	1	0	0	0	4
Total	12	99	5	0	1	1	9

¹, *Escherichia coli* enteropatogênica; ², *Escherichia coli* êntero-hemorrágica;

³, *Escherichia coli* produtora de toxina shiga; ⁴, *stx*: gene que codifica a produção de toxina shiga.

Tabela 3 - Infecção mista por patótipos de *E. coli* diarreiogênica detectadas em crianças com e sem diarreia em Belo Horizonte, entre março de 2004 e julho de 2007.

	tEPEC ¹	tEPEC	aEPEC	STEC1 ⁵
Diarreia	+	+	+	+
	aEPEC ²	EHEC2 ³	EHEC1 ⁴	EHEC1
Com	3	1	0	1
Sem	3	0	1	0
Total	6	1	1	1

1, *Escherichia coli* enteropatogênica típica; aEPEC, *Escherichia coli* enteropatogênica atípica; EHEC2, *Escherichia coli* enteremorrágica *stx2* positiva; EHEC1, *Escherichia coli* enteremorrágica *stx1* positiva; STEC1, *Escherichia coli* produtora de toxina shiga *stx1* positiva.

Tabela 4 - Distribuição anual da infecção por EPEC¹, EHEC² e STEC³ (n = 127) em crianças com diarreia aguda e sem diarreia atendidas entre março de 2004 e julho de 2007, em Belo Horizonte, MG.

Ano	EPEC		STEC n (%)	EHEC n (%)	Mista n (%)
	típica	atípica			
	n (%)	n (%)			
2004 (n = 16)	0 (0 ⁴ /0 ⁵)	12 (9,4/75,0)	1 (0,8/6,3)	2 (1,6/12,5)	1 (0,8/6,3)
2005 (n = 48)	4 (3,1/8,3)	39 (30,7/81,3)	1 (0,8/2,1)	0 (0/0)	4 (3,1/8,3)
2006 (n = 38)	4 (3,1/10,5)	29 (22,8/76,3)	0 (0/0)	3 (2,4/7,9)	2 (1,6/5,3)
2007 (n = 25)	4 (3,1/16,0)	19 (15,0/76,0)	0 (0/0)	0 (0)	2 (1,6/8,0)
Total	12 (9,4)	99 (78,0)	2 (1,6)	5 (3,9)	9 (7,1)

¹, *Escherichia coli* enteropatogênica; ², *Escherichia coli* êntero-hemorrágica; ³, *Escherichia coli* produtora de toxina shiga; ⁴, valores calculados em relação ao número total de pacientes com infecção; ⁵, cálculo considerando o total anual de pacientes com infecção por *Escherichia coli* diarreiogênica.

Tabela 5 - Distribuição sazonal da infecção por EPEC, EHEC e STEC (n = 127) em crianças com diarreia aguda e sem diarreia atendidas entre março de 2004 e julho de 2007 em Belo Horizonte, MG.

Período	EPEC ¹		EHEC ² n (%)	STEC ³ n (%)	Mista n (%)
	típica	atípica			
	n (%)	n (%)			
Seco (n = 358)	6 (50,0 ⁴ /1,7 ⁵)	56 (56,6/15,6)	2 (40,0/0,6)	1 (50,0/0,3)	7 (77,8/2,0)
Chuvoso (n = 431)	6 (50,0/1,4)	43 (43,4/10,0)	3 (60,0/0,7)	1 (50,0/0,3)	2 (22,2/0,5)
Total	12 (9,5)	99 (78,0)	5 (3,9)	2 (1,6)	9 (7,1)

¹, *Escherichia coli* enteropatogênica; ², *Escherichia coli* enteremorrágica; ³, *Escherichia coli* produtora de toxina shiga; ⁴, valores calculados em relação ao número total de pacientes com infecção por EPEC, EHEC e STEC; ⁵, cálculo considerando o total de pacientes em cada período do ano.

Tabela 6 - Distribuição, de acordo com a faixa etária, das crianças colonizadas por amostras de *E. coli* diarreio gênica atendidas em Belo Horizonte, MG, entre março de 2004 e julho de 2007.

Faixa etária (meses)	EPEC ¹		EHEC ²	STEC ³	Total
	típica	atípica			
1-6	6	35	2	0	43
7-12	4	32	2	0	38
13-18	1	15	1	2	19
19-24	1	9	0	0	10
25-30	0	4	0	0	4
31-36	0	1	0	0	1
37-42	0	1	0	0	1
43-69	0	2	0	0	2
Total	12	99	5	2	118
Média	8,6	11,3	9,0	15,5	11,0
Desvio padrão	6,1	9,0	3,5	3,5	8,6
Mediana	6,5	9,0	9,0	15,5	9,0
Faixa	3 – 24	1 – 48	5 – 13	13 – 18	1 – 48

¹, *Escherichia coli* enteropatogênica; ², *Escherichia coli* enteremorrágica;

³, *Escherichia coli* produtora de toxina shiga.

Tabela 7 - Distribuição, de acordo com o sexo, das crianças colonizadas por *E. coli* diarreiogênica atendidas em Belo Horizonte, MG, entre março de 2004 e julho de 2007.

Sexo	EPEC ¹		EHEC ²	STEC ³	Total
	típica	atípica			
Feminino	5	40	1	1	47
Masculino	7	59	4	1	71
Total	12	99	5	2	118

¹, *Escherichia coli* enteropatogênica; ², *Escherichia coli* enteremorrágica;

³, *Escherichia coli* produtora de toxina shiga.

Tabela 8 - Relação entre dados clínicos e infecção pelos diferentes patótipos de *E. coli* diarreiogênica identificados em amostras fecais de crianças com diarreia aguda atendidas em Belo Horizonte, MG entre março/2004 e julho/2007.

Parâmetros	tEPEC ¹	aEPEC ²	EHEC ³	STEC ⁴
	n (%) ⁵	n (%) ⁶	n (%) ⁷	n (%) ⁸
Sangue e/ou pus nas fezes	0 (0,0)	10 (22,2)	1 (25,0)	0 (0,0)
Vômito	2 (66,7)	34 (75,6)	3 (75,0)	2 (100)
Febre	1 (33,3)	28 (62,2)	3 (75,0)	1 (50,0)
Desidratação	2 (66,7)	31 (68,9)	4 (100)	2 (100)

¹, *Escherichia coli* enteropatogênica típica; ², *Escherichia coli* enteropatogênica atípica; ³, *Escherichia coli* enteremorrágica; ⁴, *Escherichia coli* produtora de toxina shiga; ⁵, dados disponíveis para 3 pacientes; ⁶, dados disponíveis para 45 crianças; ⁷, dados disponíveis para 2 pacientes; ⁸, dados disponíveis para 4 pacientes.

Tabela 9 - Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de amostras de *Escherichia coli* diarreiogênica isoladas de crianças com diarreia aguda e sem diarreia atendidas entre março de 2004 e julho de 2007 em Belo Horizonte, MG.

Antimicrobiano	aEPEC ¹ n = 106	tEPEC ² n = 19	EHEC ³ n = 8	STEC ⁴ n = 3
Ácido nalidíxico	95 (89,6) ⁵	19 (100)	7 (87,5)	3 (100)
Ampicilina	77 (72,6)	17 (89,5)	4 (50,0)	2 (66,6)
Cefalotina	69 (65,1)	14 (73,7)	5 (62,5)	2 (66,6)
Cefazolina	48 (45,3)	8 (42,1)	3 (37,5)	1 (33,3)
Ciprofloxacina	104 (98,1)	19(100)	8 (100)	3 (100)
Sulfametoxazol-trimetoprim	77 (72,6)	17 (89,5)	4 (50,0)	2 (66,6)

¹, *Escherichia coli* enteropatogênica atípica; ², *Escherichia coli* enteropatogênica típica; ³, *Escherichia coli* enteremorrágica; ⁴, *Escherichia coli* produtora de toxina shiga; ⁵, os números entre parênteses indicam porcentagem.

Tabela 10 - Distribuição anual das porcentagens de resistência a antimicrobianos¹ das amostras diarreio gênicas de *E. coli* isoladas de crianças com diarreia aguda e sem diarreia atendidas entre março de 2004 e julho de 2007 em Belo Horizonte, MG.

Antimicrobiano	2004 (n ² = 17)	2005 (n = 52)	2006 (n = 40)	2007 (n = 27)
Ácido nalidíxico	0,0	9,6	15,0	3,7
Ampicilina	23,5	28,8	22,5	29,6
Cefalotina	5,9	21,2	45,0	59,3
Cefazolina	29,4	32,7	75,0	88,9
Sulfametoxazol-trimetoprim	41,2	26,9	20,0	25,9

¹, os valores referentes a ciprofloxacina não foram incluídos porque apenas duas amostras, obtidas em 2006, foram resistentes ao antimicrobiano; ²,. número total de amostras de *E. coli* diarreio gênicas testadas.

Diarreia infecciosa aguda é um importante problema de saúde pública. Calcula-se que ocorram mais de um bilhão de episódios da doença em todo o mundo, anualmente, entre os quais mais de dois milhões evoluem para o óbito (Podewils *et al.*, 2004; O’Ryan *et al.*, 2005).

Nesta investigação, foram estudadas crianças com diarreia aguda e sem diarreia atendidas em um hospital pediátrico de referência na região metropolitana de Belo Horizonte. O estudo abrangeu um período de mais de três anos, de março de 2004 a julho de 2007.

Embora *E. coli* seja membro da microbiota subdominante do intestino de seres humanos (Nicoli, 1995), não é incomum a ausência do microrganismo em cultivos realizados a partir de amostras fecais de crianças com e sem diarreia. O achado pode ser explicado por limitações inerentes ao método microbiológico convencional, entre elas seletividade dos meios de cultura e competição com outros microrganismos, e à diminuição da população residente de bactérias na vigência de outras infecções intestinais. Não se pode descartar, ainda, o uso de antimicrobianos não informado pelos pais/responsáveis durante a realização da entrevista, previamente à coleta da amostra.

A média de idade da população estudada (11,8 meses) é um reflexo da frequência elevada de diarreia e da maior gravidade da doença nos primeiros 12 meses de vida (Guerrant *et al.*, 1990; Aranda-Michel & Gianella, 1999), razão pela qual a busca por atendimento médico é mais frequente.

No presente estudo, observou-se predomínio de casos de diarreia nos meses mais secos, provavelmente em decorrência da prevalência elevada da rotavirose, mais comum nesta época do ano (Podewils *et al.*, 2004; Duarte, 2007).

Todos os pacientes incluídos nesta investigação foram atendidos no Hospital

Infantil João Paulo II/FHEMIG, centro médico que atende grande parte da população de baixa renda da região leste de Belo Horizonte, o que explica a renda familiar média baixa observada no presente estudo.

eae e *bfpA* foram mais comumente observados em amostras de *E. coli* obtidas de paciente sem diarreia, reflexo da frequência elevada de amostras de *E. coli eae* positivas e *bfpA* positivas circulantes no nosso meio e da infecção assintomática por aEPEC e tEPEC. Por outro lado, *stx* foi mais comum em crianças com diarreia, o que pode ser explicado pela maior virulência das amostras bacterianas que carregam o gene e da gravidade da doença associada a EHEC, patotipo que se caracteriza pela presença dos genes *eae* e *stx* simultaneamente.

Embora não disponhamos de uma explicação cientificamente comprovada, o maior número de crianças do sexo masculino colonizadas por amostras de *E. coli eae*, *bfpA* e *stx* positivas pode estar relacionado ao fato de que meninos estão mais propensos à aquisição mais precoce de microrganismos diarreiogênicos devido a hábitos culturais de nossa população. De forma semelhante, não temos explicação para o predomínio de crianças infectadas por amostras de *E. coli stx* positivas em 2004 e 2006 e para a ausência de infecção por amostras *bfpA* positivas em 2004. Na realidade, esperávamos a ocorrência de distribuição homogênea das amostras da bactéria ao longo do período de estudo, uma vez que não temos conhecimento da existência de surto de diarreia por qualquer destes microrganismos no período abrangido pela investigação.

Infecção mista pelos patotipos de *E. coli* diarreiogênica pesquisados foi observada em aproximadamente 1% das crianças estudadas, na maioria das vezes naquelas do sexo feminino (quase 70%) e em 2005 (mais de 40%). Não

encontramos uma explicação lógica para estas observações. Em estudo desenvolvido em Teresina/PI, Nunes (2008) detectou infecção mista em mais de 5% das crianças. Deve ser mencionado que o estudo incluiu outros patótipos diarreio gênicos de *E. coli* e outras espécies enteropatogênicas, o que torna maior a chance de detecção de infecção mista.

A associação de patótipos mais frequentemente observada foi tEPEC e aEPEC, achado que pode ser explicado pela maior prevalência dos mesmos no nosso meio.

6.1 EPEC

EPEC é um dos principais agentes etiológicos de diarreia aguda em crianças com menos de dois anos de idade em países em desenvolvimento (Nataro & Kaper, 1998; Trabulsi *et al.*, 2002). Dados obtidos por métodos genéticos em outras regiões do País demonstram que a frequência de EPEC é inferior àquela observada na presente investigação (aproximadamente 15%). Rodrigues e colaboradores (2004) detectaram *eae* em apenas 5,6% das amostras de *E. coli* isoladas de crianças com diarreia aguda com até um ano de idade. Franzolin e colaboradores (2005) relataram EPEC em 10,9% de pouco mais de 100 pré-escolares de Salvador. No Rio de Janeiro, Regua-Mangia e colaboradores (2004), observaram EPEC em apenas 2,0% de quase 200 crianças com até 3 anos de idade com diarreia aguda. Em 2007, Araújo e colaboradores detectaram tEPEC e aEPEC em 0,4% e 5,1%, respectivamente, das crianças com diarreia e, naquelas sem diarreia, EPEC foi identificada em 0,7% dos pacientes estudados. Em Teresina, em estudo desenvolvido entre 2003 e 2007, Nunes (2008) detectou

aEPEC em aproximadamente 12% e 15% das crianças com e sem diarreia, respectivamente, e tEPEC em cerca de 3% e 1%, respectivamente, nas crianças sem diarreia. Esta prevalência discretamente superior dos subtipos de EPEC em Teresina pode estar relacionada ao nível socioeconômico e ao menor acesso a água tratada e saneamento básico da população estudada.

É possível que as taxas de identificação de EPEC observadas neste estudo sejam devidas ao maior número de colônias de *E. coli* estudadas por paciente (média superior a 11). Outros autores, entre eles Rodrigues e colaboradores (2004) estudaram média de 1,2 colônias por criança, Franzolin e colaboradores (2005) de 2 a 3 colônias sugestivas de *E. coli* por paciente e Regua-Mangia e colaboradores (2004) de 2,3 colônias por criança. É indiscutível que a chance de identificação de bactérias diarreiogênicas a partir de amostras fecais aumenta na proporção do número de colônias analisadas.

EPEC é classificada tEPEC e aEPEC na dependência da presença ou não, respectivamente, do plasmídeo EAF, que carrega o gene *bfpA*, associado à aderência localizada do microrganismo. Amostras de tEPEC são importantes agentes de diarreia em crianças menores de dois anos em países do terceiro mundo (Nataro & Kaper, 1998; Trabulsi *et al.*, 2002). Em países industrializados, infecções por este patótipo são raras (Nataro & Kaper, 1998). Neste estudo, foi observada baixa frequência de tEPEC (2,4%), à semelhança de relatos feitos para outras regiões do País: em Salvador e em Botucatu, a frequência de tEPEC foi de 0,8% (Rodrigues *et al.*, 2004; Franzolin *et al.*, 2005) e de 2,5% no Rio de Janeiro (Regua-Mangia *et al.*, 2004). Nunes (2008) detectou a bactéria, em crianças com e sem diarreia em Teresina, em níveis praticamente idênticos (2,5%) aos observados no presente estudo.

Em outros países em desenvolvimento, a frequência de isolamento de tEPEC foi superior à observada neste estudo: 9,7% em Bangladesh (Albert *et al.*, 1999), 9,4% na Índia (Kahali *et al.*, 2004). Em outros, como Moçambique (Rappelli *et al.*, 2005) e Tailândia (Ratchtrachenchal *et al.*, 2004), os resultados obtidos foram semelhantes aos observados na presente investigação (2,3% e 3,2%, respectivamente). Por outro lado, tEPEC é rara nos países desenvolvidos: 0,3% na Austrália (Robins-Browne *et al.*, 2004) e 0,4% na Noruega (Afset *et al.*, 2004). A frequência baixa deste patotipo de *E. coli* diarreiogênica nestes países, pode estar relacionada ao fato de que o ser humano é o mais importante, talvez o único, reservatório de tEPEC (Trabulsi *et al.*, 2002) associado à melhoria das condições de higiene e saneamento das populações urbanas no mundo desenvolvido ao longo das últimas décadas (Franzolin *et al.*, 2005).

aEPEC, definido pela ausência do plasmídeo EAF, é um subtipo de EPEC ainda pouco conhecido, merecendo grande atenção da comunidade científica da área na última década (Trabulsi *et al.*, 2002; Afset *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2004; Franzolin *et al.*, 2005; Nunes, 2008). Existem controvérsias quanto ao papel do microrganismo na etiopatogenia da diarreia. À semelhança dos resultados do presente estudo, alguns autores não observaram associação estatística entre o microrganismo e presença de diarreia (Gomes *et al.*, 1991; Scaletsky *et al.*, 2002; Regua-Mangia *et al.*, 2004, Nunes, 2008). Por outro lado, Scaletsky e colaboradores (1999), Vieira e colaboradores (2001) e Dulguer e colaboradores (2003) demonstraram existência de associação entre colonização por aEPEC e diarreia. O microrganismo foi também associado a diarreia persistente, com duração superior a 14 dias (Afset *et al.*, 2004).

A frequência elevada de aEPEC (11,5%) em crianças com diarreia aguda

confirma dados obtidos em estudos realizados em outras regiões do Brasil (Regua-Mangia *et al.*, 2004; Franzolini *et al.*, 2005). Ao contrário das EPEC típicas, encontradas quase exclusivamente em seres humanos, as amostras atípicas são comuns em animais domésticos (Trabulsi *et al.*, 2002; Nakazato *et al.*, 2004; Morato, 2009). É possível que a melhoria das condições de saneamento básico no País tenha resultado em maior redução da ocorrência de tEPEC quando comparado à frequência de aEPEC. Assim, é provável que infecção por este patotipo de *E. coli* diarreiogênica venha a ser mais frequentemente diagnosticada no nosso meio, como já observado em países industrializados (Franzolin *et al.*, 2005).

Como esperado, aEPEC mostrou-se similarmente distribuída nos quatro anos da investigação e tEPEC entre 2005 e 2007. Não temos explicação cientificamente aceitável para a ausência deste patotipo de *E. coli* diarreiogênica em 2004. A distribuição de tEPEC e aEPEC foi semelhante nos meses chuvosos e nos meses mais secos do ano, com discreto predomínio de aEPEC nos meses secos. Este achado não confirma observações de que a diarreia causada por bactérias é mais comum nos meses quentes e chuvosos, nos quais as taxas de multiplicação bacteriana no ambiente seriam mais elevadas e a ocorrência de maiores índices pluviométricos favoreceriam a disseminação das mesmas (Qadri *et al.*, 2005).

Mais de 90% das infecções por tEPEC e aEPEC ocorreram em crianças com idade inferior a dois anos e mais de 50% naquelas com até um ano de idade. Dados semelhantes foram relatados por Collares (2005) para crianças de Belo Horizonte e por Nunes (2008) para Teresina. Os achados refletem, provavelmente, a maior suscetibilidade de crianças dessa faixa etária às

infecções, uma vez que ainda não apresentam mecanismos de defesa completamente desenvolvidos.

Não encontramos explicação plausível para a maior frequência de tEPEC e aEPEC no sexo masculino, mas é possível que o achado esteja relacionado a hábitos culturais.

Sangue e/ou pus foram relatados para mais de 20% dos responsáveis pelas crianças com diarreia por aEPEC e para nenhuma daquelas com doença associada a tEPEC. O dado para aEPEC é surpreendente, uma vez que não há invasão tecidual neste tipo de infecção. Explicações para o fato podem estar relacionadas à forma de obtenção dos dados, ou seja, informação fornecida pelos pais/responsáveis.

Como esperado, vômito e desidratação foram relatados para a maioria das crianças com infecção pelos dois subtipos de EPEC. A desidratação é o resultado das perdas hídricas tanto por vômitos como por diarreia e os dois parâmetros clínicos são menos sujeitos à subjetividade que o aspecto das fezes eliminadas. Fomos também surpreendidos, pelas mesmas razões apresentadas para o parâmetro presença de pus/sangue, pela prevalência elevada de febre em crianças com diarreia por aEPEC, o que, certamente, indica a participação de outros componentes além da invasão tecidual na etiopatogenia da febre associada à infecção pela bactéria.

6.2 STEC

Este patotipo diarreiogênico caracteriza-se pela expressão de toxina shiga, codificada pelos genes *stx1* e/ou *stx2*, e ausência de *eae*. A biologia do microrganismo e sua relação com o hospedeiro são pouco conhecidos.

Aparentemente, a lesão induzida por este patotipo de *E. coli* diarreiogênica está relacionada à expressão da referida toxina que, como já mencionado, bloqueia a síntese protéica. Lesa o endotélio, causando trombose capilar e inflamação, o que explica a colite hemorrágica e, pelo menos em parte, a síndrome hemolítica-urêmica (Fernandez & Sansonetti, 2003; Thorpe, 2004). Os mecanismos através dos quais STEC adere ao intestino, bem como seu órgão alvo, são pouco conhecidos (Gyles, 2006).

STEC é mais frequentemente isolada de outros animais e, apenas ocasionalmente, de fezes de seres humanos (Torres *et al.*, 2005). Em sua maioria, os estudos relativos ao tema foram desenvolvidos em países industrializados. Tem sido considerada patógeno relevante nos Estados Unidos, Canadá, alguns países da Europa e Japão (Nataro & Kaper, 1998). À semelhança do que foi mencionado para EHEC, apenas recentemente foram desenvolvidas investigações em países do terceiro mundo. Aparentemente, STEC é importante enteropatógeno nestas regiões do mundo, sendo também transmitidos por alimentos como carne e leite (Farah *et al.*, 2007).

No presente estudo, STEC foi isolada de espécimes fecais de apenas duas crianças monoinfectadas com diarreia, atendidas em 2004 e 2005, com idade entre 13 e 18 meses e de uma apresentando infecção mista (também colonizada por EHEC *stx1* positiva). Como o número de crianças infectadas pela bactéria é muito pequeno, qualquer análise mais profunda referente ao patotipo diarreiogênico de *E. coli* fica prejudicada.

6.3 EHEC

Como já mencionado, EHEC é caracterizada pela produção de lesão A/E no

epitélio intestinal e pela expressão de toxina shiga. Pode ser diagnosticada por métodos de genética molecular, através da detecção dos genes *eae* e *stx1* e/ou *stx2* (Nataro & Kaper, 1998). Este grupo diarreiogênico de *E. coli*, descrito na década de 80, está associado à colite hemorrágica e à síndrome hemolítica-urêmica, caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiência renal aguda (Nataro & Kaper, 1998). Pode também estar associado a quadros menos graves de diarreia e ser observada em indivíduos assintomáticos. EHEC tem sido considerada causa importante de diarreia epidêmica em países desenvolvidos (Pai *et al.*, 1988; Karmali, 1989; Nataro & Kaper, 1998; Boerlin *et al.*, 1999). No Brasil, relatos referentes à prevalência de doença associada à bactéria são escassos, mas taxas crescentes de detecção de EHEC têm sido relatadas no País (Cantarelli *et al.*, 2000; Guth *et al.*, 2002a; Irino *et al.*, 2002; Franzolin *et al.*, 2005), provavelmente devido ao emprego mais amplo da tecnologia disponível para identificação dos diferentes patótipos de *E. coli* diarreiogênica.

Foi primeiramente relatada em seres humanos no Brasil por Giraldi e colaboradores (1990) e descrita pela primeira vez em Minas Gerais por Collares (2005) De acordo com Guth e colaboradores (2005), a bactéria foi raramente isolada das fezes de crianças com e sem diarreia em São Paulo.

O principal reservatório da bactéria é constituído pelo intestino de ruminantes, especialmente bovinos, mas EHEC foi descrita em suínos e gatos, cães e aves domésticas (Nataro & Kaper, 1998). A frequência de isolamento a partir de fezes de bovinos é elevada no Brasil (Cerqueira *et al.*, 1999).

No presente estudo, EHEC foi isolada de cinco crianças mono infectadas, quatro delas com diarreia. Todas as amostras albergavam o gene *stx1*; de acordo

com dados da literatura são, portanto, consideradas menos virulentas (Taylor, 2008; Ferens *et al.*, 2011). Estas amostras foram isoladas de crianças atendidas em 2004 e 2006 e distribuídas de forma semelhante no período chuvoso e seco. Não encontramos, na literatura disponível, referência a padrões de distribuição sazonal da infecção pelo microrganismo. É possível que, de fato, não haja predomínio da infecção em determinada estação do ano, uma vez que a transmissão de EHEC se faz, na maioria das vezes, a partir de carne contaminada de bovinos e que o microrganismo é membro da microbiota intestinal destes animais.

Oitenta por cento dos casos ocorreram em pacientes com idade inferior a 12 meses. Considerando reservatórios e forma de transmissão deste patotipo de *E. coli* diarreiogênica, esperávamos que a infecção por EHEC fosse mais comum em crianças mais velhas. Entretanto, o número de casos diagnosticados de infecção por EHEC é pequeno, o que dificulta conclusões mais abrangentes. Deve ser salientado que não encontramos dados na literatura relativos à distribuição etária da infecção pela bactéria. De forma semelhante, não temos conhecimento de publicações sobre a distribuição de acordo com sexo de EHEC. Nossos dados demonstram que 80% das infecções pelo patotipo ocorreram em meninos.

No que se refere aos aspectos clínicos da infecção, apenas 25% dos pacientes apresentaram sangue/pus nas fezes, resultado esperado considerando que todas as amostras isoladas eram *stx1* positivas, considerado genótipo menos agressivo de EHEC (Taylor, 2008; Ferens *et al.*, 2011). Após aderência íntima e liberação de toxina shiga na intimidade do tecido, EHEC desencadeia reação inflamatória na mucosa do intestino grosso bem como desarranja a secreção de

fluidos e eletrólitos, razão pela qual, como observado, está comumente associada à presença de febre e desidratação, tanto em consequência da diarreia como pela indução de vômito. Neste estudo, estas manifestações clínicas foram relatadas pelos responsáveis pela maioria dos pacientes EHEC positivos.

Em relação aos pacientes com infecção mista, EHEC esteve igualmente associada a tEPEC, aEPEC e STEC (um caso cada). Entre as três crianças com infecção mista por EHEC, uma delas, aquela que mostrou-se colonizada por tEPEC, estava também infectada por amostra de EHEC *stx2*, considerada o tipo mais agressivo entre as amostras da bactéria e mais comumente associada a colite hemorrágica e síndrome hemolítica-urêmica (Ferens *et al.*, 2011). Trata-se de paciente de 15 meses de idade, com diarreia, atendida no período seco de 2006. Não apresentava sangue/pus nas fezes e encontrava-se afebril. Desta forma, embora colonizada por amostra considerada mais virulenta, os dados clínicos obtidos para este paciente demonstram o contrário. Deve ser salientado que as manifestações clínicas apresentadas por determinado paciente são, em última análise, resultantes de diversos fatores que incluem, entre outros, o *status* do sistema de defesa do mesmo. É ainda possível admitir que a diarreia apresentada por esta criança seja devida a tEPEC ou a outro agente não identificado.

Em resumo, o número de casos de diarreia por EHEC observado na presente investigação é pequeno, o que torna necessário a ampliação do estudo, visando à melhor compreensão da biologia do microrganismo e de sua relação com o hospedeiro.

6.4 RESISTÊNCIA A DROGAS

A diarreia infecciosa aguda é geralmente auto-limitada, não havendo necessidade, na imensa maioria dos casos, de tratamento com drogas antimicrobianas visando à erradicação do agente etiológico. O risco imediato para o paciente é a desidratação e sua correção ou prevenção deve ser a medida terapêutica inicial. Estes princípios também se aplicam à diarreia associada a EPEC, EHEC e STEC (Nataro & Kaper, 1998). Entretanto, em alguns pacientes, como desnutridos graves, imunodeficientes e recém-nascidos, entre outros, o uso de drogas antimicrobianas pode ser essencial (Mota *et al.*, 2003; Mota *et al.*, 2005). Nestas situações, é importante o conhecimento do perfil regional de suscetibilidade a antimicrobianos dos agentes diarreiogênicos para que a antibioticoterapia, na maioria das vezes empírica, possa ser decidida em bases mais racionais.

Entre as amostras de tEPEC, foi observada frequência elevada de resistência a cefalotina e cefalozina, padrão já relatado anteriormente (Gomes *et al.*, 1991; Vila *et al.*, 1999; Kahali *et al.*, 2004). O uso indiscriminado das duas drogas antimicrobianas na prática clínica é, provavelmente, responsável pelos níveis de resistência observados. Ao contrário de dados obtidos na presente investigação (taxa de suscetibilidade a sulfametoxazol-trimetoprim superior a 90%), resistência em aproximadamente 90% e 70% das amostras da bactéria foi observada em São Paulo (Gomes *et al.*, 1991) e em Teresina (Nunes 2008). É importante ressaltar que a associação sulfametoxazol-trimetoprim tem sido indicada como primeira escolha para o tratamento de pacientes com disenteria em nosso meio (Mota *et al.*, 2003). Não foi observada resistência ao ácido

nalidíxico, medicamento também recomendado para o tratamento de pacientes com diarreia infecciosa aguda, especialmente quando de natureza inflamatória (Mota *et al.*, 2003). De forma semelhante, não foi observada resistência a ciprofloxacina, medicamento utilizado no tratamento da diarreia do viajante. Gomes e colaboradores (1991) e Nunes (2008) também observaram taxas elevadas de suscetibilidade ao antimicrobiano (94% e 100%) entre amostras de tEPEC isoladas em São Paulo e Teresina, respectivamente.

Em relação a aEPEC, frequência elevada de suscetibilidade a ácido nalidíxico e ciprofloxacina (mais de 90%) foi detectada. Em São Paulo, as taxas de suscetibilidade aos dois agentes antimicrobianos relatadas por Gomes e colaboradores (1991) e Nunes (2008) foram de 100% e mais de 90%, respectivamente. A taxa de resistência à ampicilina de amostras de aEPEC observada neste estudo foi próxima àquela descrita para São Paulo (cerca de 50%) (Gomes *et al.*, 1991). As taxas de resistência à cefazolina (mais de 50%) no nosso meio são também preocupantes, à semelhança do que ocorre para cefalotina e ampicilina e sulfametoxazol-trimetoprim (aproximadamente 30%). Estas observações, certamente, estão relacionadas ao emprego indiscriminado destas drogas antimicrobianas e à facilidade de transmissão horizontal de genes de resistência entre o patógeno e outros microrganismos, em especial no ambiente intestinal.

O uso de antimicrobianos para o tratamento de indivíduos com diarreia aguda por EHEC é assunto ainda controverso (Nataro & Kaper, 1998; Paton & Paton, 1998). Alguns autores admitem que o uso de antimicrobianos reduz o risco de síndrome hemolítica-urêmica (Martin *et al.*, 1990; Proulx *et al.*, 1992, White *et*

al., 2002). Outros investigadores sugerem que a antibioticoterapia favorece a instalação da síndrome, uma vez que a lise celular facilita a liberação de toxina shiga e reduz a microbiota intestinal, o que favorece a absorção local da toxina (Nataro & Kaper, 1998). À semelhança do que já foi discutido para EPEC, taxas elevadas de suscetibilidade de amostras de EHEC foi observada apenas para ácido nalidíxico e ciprofloxacina, confirmando relatos de outros autores que demonstram disseminação crescente de resistência a antimicrobianos em amostras de EHEC de países desenvolvidos (White *et al.*, 2002; Mota *et al.*, 2005). Em estudo realizado em São Paulo, aproximadamente 20% das amostras de EHEC mostraram-se resistentes a três ou mais antimicrobianos (Vaz *et al.*, 2004).

Dados relativos à suscetibilidade a antimicrobianos de STEC são escassos em todo o mundo. À semelhança do que já foi mencionado para EHEC, taxas elevadas de suscetibilidade de amostras de STEC foram observadas apenas para ácido nalidíxico e ciprofloxacina (100%). Dados semelhantes foram obtidos por Nunes (2008) em Teresina.

Apesar do aumento da freqüência de *E. coli* produtora de ESBL em todo o mundo (Paterson & Bonomo, 2005; Romero *et al.*, 2005), nenhuma amostra produtora destas enzimas foi observada na presente investigação. É possível que o achado seja devido ao fato de que os pacientes incluídos na presente investigação tenham sido atendidos em ambulatório e não tenham história de hospitalização frequente, uma vez que a disseminação deste mecanismo de resistência é mais comum em ambiente hospitalar.

Em síntese, esta foi uma das primeiras investigações realizadas em crianças em Belo Horizonte empregando técnicas de genética molecular, consideradas fundamentais para identificação dos diversos grupos diarreio gênicos de *E. coli*.

Trata-se também do primeiro estudo, desenvolvido no Estado, que demonstra a ocorrência de infecção por STEC em crianças com diarreia aguda. Este achado se reveste de especial importância, uma vez que revela a necessidade de maior vigilância dos casos de diarreia infecciosa aguda devido à frequente associação entre infecção por amostras de *E. coli stx* positivas e desenvolvimento de complicações graves, como colite hemorrágica e síndrome hemolítica-urêmica.

Deve ser, ainda, ressaltada a contribuição desta investigação para o conhecimento de alguns aspectos da epidemiologia da infecção por EPEC, extremamente comum na população estudada, STEC e EHEC, mesmo que as taxas de infecção pelos dois últimos patótipos sejam muito baixas.

Finalmente, é importante ressaltar a necessidade de que estudos desta natureza sejam realizados periodicamente, diversos aspectos relativos à diarreia infecciosa aguda possam ser mais bem compreendidos. Este conhecimento é fundamental como suporte para o delineamento de estratégias visando à prevenção e ao diagnóstico e tratamento da infecção intestinal aguda, ainda responsável por taxas elevadas de morbidade e mortalidade no País, especialmente nas classes menos favorecidas.

- Na população estudada, diarreia aguda por EPEC, STEC e EHEC é mais comum nos meses secos, provavelmente devido à prevalência elevada de rotavirose, e acomete, mais frequentemente, crianças com idade inferior a um ano do sexo masculino.
- aEPEC é o subtipo mais comum de EPEC em crianças menores de cinco anos na população investigada.
- aEPEC e tEPEC são mais comuns, no nosso meio, em crianças sem diarreia e naquelas do sexo masculino.
- STEC e EHEC são mais comuns em crianças com diarreia e o subtipo mais comum no nosso meio alberga o gene *stx1*, em geral associado a quadros menos graves da doença.
- Infecção mista por EPEC, STEC e EHEC na população estudada é um evento raro, sendo mais frequente a associação de aEPEC e tEPEC.
- Infecção por aEPEC e tEPEC é distribuída de forma relativamente homogênea ao longo do tempo, mas esta observação não é válida para STEC e EHEC
- Colonização por EPEC e EHEC é mais comum em crianças menores de um ano no nosso meio, possivelmente devido a imaturidade do sistema de defesa.
- Vômito e desidratação são comuns e sangue/pus nas fezes é raro em crianças com diarreia associada a EPEC, STEC e EHEC na população estudada.
- Os dados relativos ao padrão de resistência a drogas antimicrobianas das amostras de EPEC, EHEC e STEC indicam a necessidade de vigilância

frequente do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de bactérias diarreiogênicas.

- Este é o primeiro relato de infecção por STEC em crianças com diarreia aguda na população estudada.

- Afset JE, Bevanger L, Romundstad P, Bergh K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhea. *J Med Microbiol*, 53:1137-44, 2004.
- Albert MJ, Faruque ASG, Faruque AM, SWack RB, Mahalanabis D. Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh. *J Clin Microbiol*, 37:3458-3464, 1999.
- Alikhani, MY, Mirsalehian A, Aslani, MM. Detection of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Iranian children with and without diarrhoea. *J Med Microbiol*, 55:1159-63, 2006.
- Aranda-Michel J & Gianella RA. Acute diarrhea: a practical review. *Am J Med*, 106:670-676, 1999.
- Araújo JM, Tabarelli GF, Aranda KRS, Fabbriotti SH, Fagundes-Neto U, Mendes CMF, Scaletsky ICA. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. *J Clin Microbiol*, 45:3396-99, 2007.
- Baker M, Bartram J, Cairncross S, Calderon RL, Chalmers R, Colford Jr. JM, Cormican M, Dufour AP, Fewtrell L, Ford T, Glass R, Griffiths JK, Havelar A, Hogue A, Hunter PR, Jaykus L-A, Keevil CW, Lang D, Larson E, Liang AP, Levy D, Moe CL, O'Brien S, Payment P, Sockett P. Resolving the global burden of gastrointestinal illness: a call to action. In: *The global burden of infectious diseases through the gastrointestinal tract: a critical assessment of exposure*. 2002, Galway, Ireland. This report is based on a colloquium...Washington: American Academy of Microbiology, 2002. Available from Internet: <<http://www.asmsusa.org>>. Cited: 22 Jan. 2003.

- Blank TE, Lacher DW, Scaletsky ICA, Zhong H, Whittam TS, Donnenberg MS. Enteropathogenic *Escherichia coli* O157 strains from Brazil. *Emerg Infect Dis*, 9:113-5, 2003.
- Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson RP, Gyles CL. Associations between virulence factors of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol*, 37:497-503, 1999.
- Bray J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli neopolitanum* from summer diarrhoea of infants. *J Pathol Bacteriol*, 57:239, 1945.
- Bueris V, Sircili MP, Taddei CR, Santos MF, Franzolin MR, Martinez MB, Ferrer SR, Barreto ML, Trabulsi LR. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102:839-44, 2007.
- Campos LC, Franzolin MR, Trabulsi LR. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups – a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99:545-52, 2004.
- Campos LC. Conventional methods for the diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli* infections. *Rev Microbiol (São Paulo)*; 27 (Suppl 1):50-3, 1996.
- Cantarelli V, Nagayama K, Takahashi A, Honda T, Cauduro PF, Dias GAG, Mezzari A, Brodt T. Isolation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotype O91:H21 from a child with diarrhea in Porto Alegre city, RS, Brazil. *Braz J Microbiol*, 31: 266-70, 2000.

- Cerqueira AMF, Guth BEC, Joaquim RM, Andrade JRC. High occurrence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in health cattle at Rio de Janeiro State, Brazil. *Vet Microbiol*, 70:111-21, 1999.
- Chen HD & Frankel G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev*, 29:83-98, 2005.
- Clark SC, Haigh RD, Freestone PPE, Williams PH. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 16:365-78, 2003.
- Clarke SC. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* – an emerging problem? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 41: 93-98, 2001.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. Vol. 31, nº 1, January, 2011.
- Cohen MB, Nataro JP, Bernstein DI, Hawkins J, Roberts N, Staat MA. Prevalence of Diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: a prospective controlled study. *The Journal of Pediatrics*, 54-60, 2005.
- Collares, GB. Pesquisa de *Escherichia coli* Enteropatogênica em crianças com diarreia aguda em Belo Horizonte/MG, Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG, 2005 (Dissertação de mestrado). 87p.
- DeVinney R, Gauthier A, Abe A, Finlay BB. Enteropathogenic *Escherichia coli*: a pathogen that inserts its own receptor into host cells. *Cell Mol Life Sci*, 55:961-76, 1999.

Donnenberg MS & Kaper JB. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 60:3953-61, 1992.

Donnenberg MS & Whittam TS. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Invest*, 107: 539-48, 2001.

Duarte, RJ. Etiologia da diarreia infecciosa aguda em Belo Horizonte/MG: Pesquisa de Rotavírus e Adenovírus, Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG, 2007 (Dissertação de mestrado). 80 p.

Dulguer MV, Fabbricotti SH, Bando SY, Moreira-Filho CA, Fagundes-Neto U, Scaletsky ICA. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. *J Infect Dis*, 188:21-29, 2003.

Farah SMSS, Sousa EM, Pedrosa OF, Irino K, Silva LR, Rigo LU, Steffens MBR, Pigato CP, Fadel-Picheth CMT. Phenotypic and genotypic traits of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Paraná State, Southern Brazil. *Letters Appl Microbiol*, 44:607-12, 2007.

Ferens WA, Hovde CJ. *Escherichia coli* O157:H7: Animal Reservoir and Sources of Human Infection. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8:465-87, 2011.

Fernandez MI & Sansonetti PJ. Effector molecules of Shigella pathogenesis and host responses. In: Hecht GA (Ed.). *Microbial Pathogenesis and the Intestinal Epithelial Cell*. Washington: ASM Press, 2003, cap. 25, p. 455-479.

Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. (eds.). *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 10th ed. St. Louis/USA, Mosby, 1998.

Fox, JG, Dewhirst, FE, Fraser, GJ, Paster, BJ, Shames, B, Murphy, JC. Intracellular *Campylobacter*-like organism from ferrets and hamsters with proliferative bowel disease is a *Desulfovibrio* sp. *J Clin Microbiol*, 32:1229-37, 1994.

Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, Heiden M, Bernard H, Fruth A, Prager R, Spode A, Wadl M, Zoufaly A, Jordan S, Stark K, Krause G. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany – Preliminary report. *N Engl J Med*, 1-11, 2011.

Franzolin MR, Alves RCB, Keller R, Gomes TAT, Beutin L, Barreto ML, Milroy C, Strina A, Ribeiro H, Trabulsi LR. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100:359-63, 2005.

Gallas NA, Bahri O, Bouratbeen A, Haasen AB, Aissa RB. Etiology of acute diarrhea in children and adults in Tunis, Tunisia, with emphasis on Diarrheagenic *Escherichia coli*: prevalence, phenotyping, and molecular epidemiology. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77(3): 571-82, 2007.

Garcia TE, Saucedo CL, Bonilla RT, Abonce M, Hernandez DL, Santos JI, Rosado JL, DuPont HL, Long KZ. Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 47: 93-98, 2009.

- Garmendia J, Frankel G, Crepin VF. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun*, 73:2573-85, 2005.
- Giannella RA. Preface. *Gastroenterol Clin N Am*, 22:xi-xii, 1993.
- Giraldi R, Guth BEC, Trabulsi LR. Production of shiga toxin among *Escherichia coli* strains and other bacteria isolated from diarrhea in São Paulo, Brazil. *J Clin Microbiol*, 28:1460-62, 1990.
- Gomes TAT, Irino K, Girão DM, Guth BEC, Vaz TMI, Moreira FC, Chinarelli SH, Vieira MAM. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? *Emerg Infect Dis*, 10:1851-55, 2004.
- Gomes TAT, Rassi V, MacDonald KL, Ramos SRTS, Trabulsi LR, Vieira MAM, Guth BEC, Candeias JAN, Ivey C, Toledo MRF, Blake PA. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. *J Infect Dis*, 164:331-7, 1991.
- Guerrant RL, Hughes JM, Lima NL, Crane J. Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings and etiologies. *Rev Infect Dis*, 12:S41-S50, 1990.
- Guth BEC, Lopes R, Vaz TMI, Irino K. First shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome in Brazil. *Emerg Infect Dis*, 8:535-6, 2002.

- Guth BEC, Vaz TMI, Gomes TAT, Chinarelli SH, Rocha MMM, Castro AFP, Irino K. Re-emergence of O103 shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in São Paulo, Brazil. *J Med Microbiol*, 54:805-6, 2005.
- Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci*, 85 (suppl):E45-E62, 2006.
- Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci*, 85:E45-E62, 2011.
- Hecht G. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions. VII. Enteropathogenic *Escherichia coli*: physiological alterations from an extracellular position. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281:G1-G7, 2001.
- Hernandes RT, Elias WP, Vieira MAM, Gomes TAT. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Federation or European Microbiological Societies*, 1-13, 2009.
- Hernandes, RT, Vieira MAM, Carneiro SM, Salvador FA, Gomes TAT. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains that express typical localized adherence in HeLa cells. *Journal of clinical microbiology*, 44:4214-17, 2006.
- Hussein HS. Prevalence and pathogenicity of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *J Anim Sci*, 85 (suppl):E63-E72, 2006.
- Irino K, Vaz TMI, Kato MAMF, Naves ZVF, Lara RR, Marco MEC, Rocha MM, Moreira TP, Gomes TA, Guth BEC. O157:H7 shiga toxin-producing

Escherichia coli strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 8:446-7, 2002.

Kahali S, Sarkar B, Chakraborty S, Macaden R, Deokule JS, Ballal M, Nandy RK, Bhattacharya SK, Takeda Y, Ramamurthy T. Molecular epidemiology of diarrhoeagenic *Escherichia coli* associated with sporadic cases and outbreaks of diarrhea between 2000 and 2001 in India. *Eur J Epidemiol*, 19:473-9, 2004.

Kallas MRE, Scaletsky ICA, Fagundes Neto U. *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC). *Arq Gastroenterol*, 34:62-8, 1997.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2:123-140, 2004.

Kaper JB. Definig EPEC. *Rev Microbiol (São Paulo)*, 27 (Suppl 1):130-3, 1996.

Karch H, Tarr PI, BielasWska M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol*, 295: 405-18, 2005.

Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. Sporadic cases of hemolytic uremic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Lancet*, i:619-20, 1983.

Karmali MA. Infections by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 2:15-38, 1989.

Lommel S, Benesch S, Rohde M, Wehland J, Rottner K. Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use different mechanisms for actin pedestal formation that converge on N-WASP. *Cell Microbiol*, 6:243-54, 2004.

- Martin DL, MacDonald KL, White KE, Soler JT, Osterholm MT. The epidemiology and clinical aspects of the hemolytic uremic syndrome in Minnesota. *N Engl J Med*, 323:1161-7, 1990.
- Medeiros MIC, Neme SN, Silva P, Capuano DM, Errera MC, Fernandes AS, Valle GR, Ávila FA. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto – SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, 43:21-4, 2001.
- Meng CY, Smith BL, Bodhidatta L, Richard SA, Vansith K, Thy B, Srijan A, Serichantaslergs O. Etiology of Diarrhea in young children and patterns of antibiotic resistance in Cambodia. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 30(4): 331-35, 2011.
- Mora A, Blanco M, Yamamoto D, Dahbi G, Blanco JE, López C, Alonso MP, Vieira MAM, Hernandez RT, Abe CM, Piazza RMF, Lacher DW, Elias WP, Gomes TAT, Blanco J. HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different *eae* and *tir* alleles. *International Microbiology*, 12:243-251, 2009.
- Morato EP, Leomil L, Beutin L, Krause G, Moura RA, Castro P. Domestic cats constitute a natural reservoir of human Enteropathogenic *Escherichia coli* types. *Zoonoses Public Health*, 56:229-37, 2009.
- Mota JAC, Norton RC, Penna FJ, Leão E. Diarréia aguda. In: Leão E, Corrêa EJ, Mota JAC, Viana MB. *Pediatria ambulatorial*. 4ª ed. Belo Horizonte/Brasil: Coopmed: 379-385, 2005.

- Mota JAC, Norton RC, Penna FJ. Doença diarreica aguda. In: Silva ACS, Norton RC, Mota JAC, Penna FJ. *Manual de urgências em Pediatria*. 1 ed. Rio de Janeiro/Brasil: Medsi: 217-222, 2003.
- Nakazato G, Gyles C, Ziebell K, Keller R, Trabulsi LR, Gomes TAT, Irino K, Silveira WD, Castro AFP. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Vet Microbiol*, 101:269-77, 2004.
- Nataro JP & Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 11:142-201, 1998.
- Nataro JP. Molecular diagnosis of EPEC. *Rev Microbiol (São Paulo)*, 27 (Suppl 1):54-7, 1996.
- Nguyen RN, Taylor LS, Tauschek M, Browne RMR. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. *Emerging Infectious Diseases*, 12(4): 597-603, 2006.
- Nicoli JR. Normal gastrointestinal microbiota in domestic animals and human beings. *Enferm Infecç Microbiol*, 15: 183-90, 1995.
- Nougayrède JP, Fernandes PJ, Connenberg MS. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell Microbiol*, 5:359-72, 2003.
- Nunes, M. R. C. M. Pesquisa de *Escherichia coli* Diarreio gênica, *Shigella* e *Salmonella* entérica em crianças com diarreia aguda e sem diarreia em Teresina/PI: Identificação e avaliação do perfil de suscetibilidade a

antimicrobianos, Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG, 2008 (Tese de Doutorado). 137 p.

O'Ryan M, Prado V, Pickering LK. A millenium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. *Semin Pediatr Infect Dis*, 16:125-36, 2005.

O'Brien AD, Tesh VL. Adherence and colonization mechanisms of Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 12: 245-254, 1992.

Pai CH, Ahmed N, Lior H, Johnson WM, Sims HV, Woods DE. Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: a two year prospective study. *J Infect Dis*, 157:1054-7, 1988.

Park SI & Giannella RA. Approach to the adult patient with acute diarrhea. *Gastroenterol Clin North Am*, 22:483-97, 1993.

Paterson DL & Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 18:657-86, 2005.

Paton JC & Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev*, 11:450-79, 1998.

Podewils LJ, Mintz ED, Nataro JP, Parashar UD. Acute, infectious diarrhea among children in developing countries. *Semin Pediatr Infect Dis*, 15:155-68, 2004.

Proulx F, Turgeon JP, Delage G, Lafleur L, Chicoine L. Randomized controlled trial of antibiotic therapy for *Escherichia coli* O157:H7 enteritis. *J Pediatr*, 121:299-303, 1992.

- Qadri F, Svennerholm AM, Faruque ASG, Sack RB. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev*, 18:465-83, 2005.
- Ramamurthy T. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): the bug is in our backyard. *Indian J Med Res*, 128:233-6, 2008.
- Ramboarina S, Fernandes PJ, Daniell S, Islam S, Simpson P, Frankel G, Booy F, Sonnenberg MS, Matthews S. Structure of the bundle-forming pillus from enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 280:40252-60, 2005.
- Rappelli P, Folgosa E, Solinas ML, Costa JL, Pisanu C, Sidat M, Melo J, Cappuccinelli P, Colombo MM. Pathogenic enteric *Escherichia coli* in children with and without diarrhea in Maputo, Mozambique. *FEMS Immun Med Microbiol*, 43:67-72, 2005.
- Ratchtrachenchal AO, Subpasu S, Hayashi H, Ba-Thein W. Prevalence of childhood diarrhea-associated *Escherichia coli* in Thailand. *J Med Microbiol*, 53:237-43, 2004.
- Regua-Mangia AH, Gomes TAT, Vieira MAM, Andrade JRC, Irino K, Teixeira LM. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. *J Infect*, 48:161-7, 2004.
- Robins-Browne RM, Bordun AM, Tauschek M, Bennett-Wood VR, Russell J, Oppedisano F, Lister NA, Bettelheim KA, Fairlay CK, Sinclair M, Hellard ME.

Escherichia coli acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. *Emerg Infect Dis*, 10:1797-805, 2004.

Rodrigues J, Thomazini CM, Morelli A, Batista GCM. Reduced etiological role for *Escherichia coli* in cases of diarrhea in Brazilian infants. *J Clin Microbiol*, 42:398-400, 2004.

Romero L, López L, Rodríguez-Baño J, Hernandez JR, Martinez-Martinez L, Pascual A. Long term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended spectrum beta-lactamase. *Clin Microbiol Infect*, 11:625-31, 2005.

Scaletsky ICA, Aranda KRS, Souza TB, Silva NP, Morais MB. Evidence of pathogenic subgroups among Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 47: 3756-59, 2009.

Scaletsky ICA, Fabbriotti SH, Carvalho RLB, Nunes CR, Maranhão HS, Morais MB, Riley L, Neto UF. Diffuse and enteroaggregative patterns or adherence of *Escherichia coli* isolated from stools of children in Northeasterns Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32: 313-19, 2001.

Scaletsky ICA, Fabbriotti SH, Silva SOC, Morais MB, Fagundes Neto U. Hep-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute diarrhea, São Paulo, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 8:855-8, 2002.

Scaletsky ICA, Michalski J, Torres AG, Dulguer MV, Kaper JB. Identification and characterization of Locus for Diffuse Adherence, which encodes a novel

afimbrial adhesin found in Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 73: 4753-65, 2005.

Scaletsky ICA, Pedroso MZ, Oliva CA, Carvalho RL, Morais MB, Fagundes Neto U. A localized adherence like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. *Infect Immun*, 67:3410-5, 1999.

Scaletsky ICA, Souza TB, Aranda KRS, Okeke IN. Genetic elements associated with antimicrobial resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from Brazil. *BMC Microbiology*, 10:25, 2010

Shaw RK, Cleary J, Murphy MS, Frankel G, Knutton S. Interaction of enteropathogenic *Escherichia coli* with human intestinal mucosa: role of effector proteins in brush border remodeling and formation of attaching and effacing lesions. *Infect Immun*, 73:1243-51, 2005.

Shifflett DE, Clayburgh DR, Koutsouris A, Turner JR, Hecht GA. Enteropathogenic *E. coli* disrupts tight junction barrier function and structure *in vivo*. *Lab Invest*, 85:1308-24, 2005.

Souza CP. *Escherichia coli* as a specialized bacterial pathogen. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 6: 2, 2006.

Souza EC, Martinez MB, Taddei CR, Mukai L, Gilio AE, Racz ML, Silva L, Ejzenberg B, Okay Y. Etiologic profile of acute diarrhea in children in São Paulo. *J Pediatr (Rio de Janeiro)*, 78:31-8, 2002.

- Tamaki Y, Narimatsu H, Miyazato T, Nakasone N, Higa N, Toma C, Masaaki I. The relationship between O-antigens and pathogenic genes of diarrhea-associated *Escherichia coli*. *Jpn J Infect Dis*, 58:65-9, 2005.
- Taylor CM. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1-induced haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr Nephrol* , 23:1425–1431, 2008.
- Tennant SM, Tauschek M, Azzopardi K, Bigham A, Wood VB, Hartland EL, Weihong QI, Whittam T, Browne RMR. Characterization of atypical enteropathogenic *E. coli* strains of clinical origin. *BMC Microbiology*, 9:117, 2009.
- Thielman NM & Guerrant RL. Acute infectious diarrhea. *N Engl J Med*, 350:38-47, 2004.
- Thorpe C. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Clin Infect Dis*, 38:1298-303, 2004.
- Toledo MRF, Fontes CF, Trabulsi LR. MILi – um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. *Rev Microbiol (São Paulo)*, 13:230-5, 1982.
- Torres AG, Zhou X, Kaper JB. Adherence of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains to Epithelial Cells. *Infect. Immun.* 73.1: 18-29, 2005.
- Trabulsi LR, Keller R, Gomes TAT. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*, 8:508-13, 2002.

- Vallance BA & Finlay BB. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *PNAS*, 97:8799-806, 2000.
- Vaz TMI, Irino K, Kato MAMF, Dias AMG, Gomes TAT, Medeiros MIC, Rocha MMM, Guth BEC. Virulence properties and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil from 1976 through 1999. *J Clin Microbiol*, 42:903-5, 2004.
- Vidal M, Kruger E, Durán C, Lagos R, Levine M, Prado V, Toro C, Vidal R. Single Multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *Journal Of Clinical Microbiology*, 43: 5362–5365, 2005.
- Vieira MA, Andrade JR, Trabulsi LR, Rosa AC, Dias AM, Ramos SR, Frankel G, Gomes TAT. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry EAE and lack the EPEC adherence factor and shiga toxin DNA probe sequences. *J Infect Dis*, 183:762-72, 2001.
- Vila J, Vargas M, Casals C, Urassa H, Mshinda H, Schelleberg D, Gascon J. Antimicrobial resistance of diarrheagenic *E. coli* isolated from children under the age of 5 years from Ifakara, Tanzania. *Antimicrob Agents Chemother*, 43:3022-4, 1999.
- White DG, Zhao S, Simjee S, Wagner DD, McDermott PF. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbes Infect*, 4:405-12, 2002.

World Health Organization. *Programme for control of diarrhoeal diseases. Manual for laboratory investigations of acute enteric infections*, Geneva Switzerland, 1987.

ANEXO I

APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

Parecer n.º ETIC 047/03

Interessado: Prof. Dr. Edilberto Nogueira Mendes
Departamento de Propedêutica Complementar - FM/UFMG

DECISÃO:

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP após cumprimento das solicitações da diligência, aprovou no dia 07 de maio de 2003 o projeto de pesquisa intitulado « **Etiologia da diarreia infecciosa aguda em BH/MG e em Teresina/PI: Estudo clínico e laboratorial** » e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto,

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profª. Dra. Efigênia Ferreira e Ferreira
Vice - Presidente do COEP

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA CLÍNICA

Título: "Etiologia da diarreia infecciosa aguda em Belo Horizonte-MG e em Teresina/PI: estudo clínico e laboratorial"

Sub-projeto: Pesquisa de *Shigella* e de *Salmonella enterica* em crianças com diarreia aguda em Belo Horizonte/MG

Pesquisadores: Mireille Ângela Bernardes Sousa, Paula Prazeres Magalhães, Edilberto Nogueira Mendes, Francisco José Penna e Luciano Amedée Peret Filho.

Introdução: Antes de aceitar que seu filho ou que a criança sob sua responsabilidade participe desta pesquisa, é necessário que você leia e compreenda a explicação a seguir sobre os procedimentos propostos. Esta declaração esclarece o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos e cuidados durante o estudo. Também estabelece o direito de desistir da participação da criança no estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre os resultados da pesquisa. Se você não for honesto com o médico em relação às queixas e à história da criança, poderá prejudicar os resultados do estudo e o acompanhamento clínico da criança.

Objetivo: Investigar a prevalência de bactérias que causam diarreia em crianças de até 5 anos de idade, com diarreia aguda e sem diarreia, por meio de exames laboratoriais, em Belo Horizonte-MG e pesquisar os fatores causadores da doença e a ação de antibióticos sobre as bactérias isoladas.

Resumo: A diarreia infecciosa aguda continua sendo um importante problema de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento, atingindo pobres e ricos. A mortalidade, entretanto, é mais elevada na população mais carente. A transmissão da doença é, na grande maioria das vezes, pela ingestão de água e alimentos contaminados por fezes, razão pela qual a frequência elevada da doença está associada a condições precárias de higiene pessoal e domiciliar e de saneamento básico, entre outros. O número de germes capazes de causar diarreia é grande e aumenta a cada dia. Pessoas que sejam portadores de germes capazes de causar diarreia, mesmo que não estejam com diarreia, no momento, podem ser fonte de infecção para outros indivíduos. A causa da diarreia infecciosa é difícil de ser determinada apenas pelo exame clínico, pois o mesmo agente pode causar diarreia por mais de um mecanismo, a infecção simultânea por mais de um germe é comum nos países em desenvolvimento e as defesas do ser humano influenciam a aquisição do germe e a progressão da doença. A epidemiologia da diarreia vem se alterando ao longo do tempo, com a mudança de hábitos da população, das condições econômicas e de saneamento básico, razão pela qual a etiologia da diarreia infecciosa aguda deve ser constantemente estudada, especialmente para que a prevenção e o controle da doença possam ser melhorados.

Procedimento: A criança pode ser incluída no estudo se ela apresenta diarreia aguda ou não. Caso você concorde com a participação da criança, uma pequena porção de fezes será obtida, da criança com diarreia, com o auxílio de uma sonda fina, após a aplicação de pequena quantidade de pomada de anestésico, quando não houver evacuação espontânea no momento da colheita, e transportada imediatamente para o laboratório. No caso de criança sem diarreia, a amostra de fezes deverá ser obtida por evacuação espontânea, introduzida em frasco apropriado a ser fornecido pelo laboratório e transportada rapidamente para o laboratório. A criança continuará sendo atendida no Serviço, mesmo que você não concorde que ela seja incluída no estudo ou que desista de participar a qualquer momento. Todos os resultados de exames que estiverem prontos estarão à sua disposição a qualquer momento da pesquisa. Você ou a criança não receberão qualquer remuneração pela participação.

Riscos: Não há risco na colheita do material.

Benefícios: A participação da criança será muito importante para o conhecimento da etiologia da diarreia infecciosa aguda e poderá contribuir, no futuro, para a melhoria do controle da doença em nosso país.

Confidencialidade: Os resultados serão mantidos em sigilo até onde é permitido pela lei. O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG poderá verificá-los e ter acesso aos dados que identificam seu nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao concordar com a participação da criança, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros médicos para a Agência Financiadora, para a Instituição e para o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.

Desligamento: Você poderá afastar a criança, a qualquer momento, sem prejuízo para o acompanhamento médico da mesma. O financiador do estudo (quando houver) poderá finalizar sua participação neste estudo por falta de recursos.

Novas descobertas: Todos os novos dados desta pesquisa poderão ser fornecidos a você, quando solicitados.

Contato com o pesquisador: Pode ser feito pelo telefone (31) 3248 9775. Caso tenha alguma dúvida sobre os direitos da criança como paciente de pesquisa, você deverá ligar para o presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, no número (31) 3248 9364.

Consentimento: Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Estou autorizando, voluntariamente, a participação de meu(minha) filho(a)/da criança sob minha responsabilidade, até que eu decida o contrário.

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____

Paciente

Responsável

Nome:
Idade:
Endereço:

Nome:
RG:
Endereço:

Testemunhas

Nome:
RG:
Endereço:

Nome:
RG:
Endereço:

FICHA CLÍNICA

1. Número de registro: _____ Data: ____/____/____
2. Nome do paciente:
3. Data de nascimento:
4. Nome da mãe:
5. Endereço:
6. Telefone:
7. Renda familiar: ____ salários mínimos
8. Peso: _____ Altura: _____
9. Fornecimento de água: Copasa, em caixa d'água coberta
 Copasa, em caixa d'água comunitária
 Copasa, em torneira fora de casa
 não tratada
10. Esgoto de fezes: para rede de esgotos
 para fossa séptica
 céu aberto
 outros. Especificar: _____
11. Esgoto de água de cozinha: para rede de esgotos
 para fossa séptica
 céu aberto
 outros. Especificar: _____
12. Em uso de antimicrobianos nos últimos 15 dias? sim. Qual?
 não
13. Diarréia: sim não
14. Já teve outros episódios de diarréia anteriormente? sim Há quanto tempo?
 não
15. Início do quadro atual: ____/____/____

16. Características das fezes:

- a. volume: "normal" aumentado
- b. frequência (últimas 24 h): até 3 vezes 4 a 10 vezes mais de 10 vezes
- c. consistência: "normal" amolecida aquosa
- d. restos alimentares: sim. Qual?
 não
- e. sangue: sim não
- f. muco: sim não
- g. pus: sim não

17. Casos semelhantes

- na família
- na creche ou vizinhança
- não

18. Contato freqüente com animais domésticos? sim Qual:

não

19. Relaciona o início do quadro atual com ingestão de algum alimento?

sim Qual:

não

20. Vômitos: sim ____/dia não

21. Febre: sim não T: ____°C

22. Grau de desidratação: _____ (ausente, leve, moderado ou grave)

23. Observações:



UFMG

FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX (31) 3409.9640



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de LIZANDRA DUARTE DA ROCHA ARAÚJO nº de registro 2009662509. Às quatorze horas do dia vinte e sete de outubro de 2011, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG a Comissão Examinadora de dissertação aprovada pelo Colegiado do Programa para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "PESQUISA DOS PATOTIPOS ENTEROPATOGÊNICO, ÊTERO-HEMORRÁGICO E PRODUTOR DE TOXINA SHIGA DE Escherichia coli EM CRIANÇAS COM DIARRÉIA AGUDA E SEM DIARRÉIA EM BELO HORIZONTE", requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto - área de concentração em Ciências Aplicadas ao Aparelho Digestivo, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do trabalho final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado definitivo. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari/ Orientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Prof. Edilberto Nogueira Mendes/ Coorientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Prof. Francisco José Penna	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Profa. Luciana de Gouvêa Viana	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 27 de outubro de 2011.

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari/ Orientadora [Assinatura]

Prof. Edilberto Nogueira Mendes/ Coorientador [Assinatura]

Prof. Francisco José Penna [Assinatura]

Profa. Luciana de Gouvêa Viana [Assinatura]

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari/Coordenadora [Assinatura]

Obs. Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari
Coord. PG. em Ciências Aplicadas
à Saúde do Adulto
Faculdade de Medicina / UFMG

[Assinatura]
CONFERE COM O ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores: Teresa Cristina de Abreu Ferrari, Edilberto Nogueira Mendes, Francisco José Penna e Luciana de Gouvêa Viana, aprovou a defesa da dissertação intitulada: "PESQUISA DOS PATOTIPOS ENTEROPATOGÊNICO, ÊNTERO-HEMORRÁGICO E PRODUTOR DE TOXINA SHIGA DE Escherichia coli EM CRIANÇAS COM DIARRÉIA AGUDA E SEM DIARRÉIA EM BELO HORIZONTE", apresentada pela mestranda LIZANDRA DUARTE DA ROCHA ARAÚJO, para obtenção do título de Mestre em Saúde do Adulto, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto – área de concentração em Ciências Aplicadas ao Aparelho Digestivo, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 27 de outubro de 2011.

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari
Orientadora

Prof. Edilberto Nogueira Mendes
Coorientador

Prof. Francisco José Penna

Profa. Luciana de Gouvêa Viana