

Universidade Federal de Juiz de Fora
Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde

Patrícia Guedes Garcia

Ocorrência de *Escherichia coli* comensal e diarreiogênica na microbiota fecal de crianças com e sem diarreia aguda e seu perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

JUIZ DE FORA
2009

Patrícia Guedes Garcia

Ocorrência de *Escherichia coli* comensal e diarreiogênica na microbiota fecal de crianças com e sem diarreia aguda e seu perfil de susceptibilidade a antimicrobianos.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, área de concentração: Saúde Brasileira.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Vânia Lúcia da Silva

**JUIZ DE FORA
2009**

DESENVOLVIMENTO

LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA E GENÉTICA MOLECULAR BACTERIANA

Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Juiz de Fora

ORIENTAÇÃO

PROFESSOR DR. CLÁUDIO GALUPPO DINIZ

PROFESSORA DRA. VÂNIA LÚCIA DA SILVA

Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Juiz de Fora

COLABORAÇÃO

PROF. DRA. SANDRA HELENA CERRATO TIBIRIÇÁ

Departamento de Morfologia
Instituto de Ciências Biológicas/UFJF

PROF. DRA. IVANA DAMÁZIO MOUTINHO

Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina da UFJF

APOIO

FAPEMIG

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
Processo EDT 3329/06

Patrícia Guedes Garcia

Patrícia Guedes Garcia

Ocorrência de *Escherichia coli* comensal e diarreiogênica na microbiota fecal de crianças com e sem diarreia aguda e seu perfil de susceptibilidade a antimicrobianos.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, área de concentração: Saúde Brasileira.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Murilo Gomes Oliveira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Danielle Alves Gomes Zauli
Pesquisadora BIOCOD Biotecnologia, Brasil

Dedico este trabalho, que representa uma das maiores vitórias da minha vida, ao meu filho Pedro que é meu amor maior.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus que está sempre ao meu lado, me fortalecendo e me capacitando, a Ti, Senhor, as primícias de tudo em minha vida.

- Ao Pedro, meu filho, amigo e companheiro, que com seu amor incondicional e carinho me faz ter forças para vencer.
- À minha mãe e irmã pelo amor de todas as horas.
- Ao orientador Cláudio, que creio ter sido instrumento de Deus para me abençoar, e que conduziu este trabalho com ética, respeito, paciência e muita sabedoria.
- À orientadora Vânia, por estar sempre presente e disposta a ajudar em todas as questões, fui privilegiada de participar desta pesquisa ao lado de uma pessoa que alia conhecimento com simplicidade.
- Aos meus amigos, pelas orações, pelo apoio e pelo carinho.
- Às pediatras Sandra e Ivana, por colaborar de forma tão importante fornecendo as amostras dos pacientes.
- Aos professores, funcionários e estagiários do departamento de microbiologia, Márcio, Maria Luzia, Rosângela, Gizele, Cláudia, Leandro, Angélica, Tiago, Thiago, Mariana, Felipe, Débora e Michele.
- A Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde pela colaboração neste projeto, em especial a coordenadora do curso de farmácia, Soraida, pela compreensão e apoio.

"O homem não pode receber coisa alguma
se do céu não lhe for dada."

João 3:27

RESUMO

Diarréia aguda é um problema de saúde pública, causa importante de morbidade e mortalidade, sobretudo, em países em desenvolvimento. A etiologia das doenças diarreicas é variada e entre os patógenos bacterianos destacam-se as linhagens diarreioagênicas ou patótipos de *Escherichia coli*. Foi investigada a ocorrência de *E. coli* comensal ou diarreioagênica em 141 amostras fecais de crianças de zero até cinco anos de idade de origem comunitária em Juiz de Fora, MG. Dos espécimes, 84 foram provenientes de doadores com manifestação clínica de diarreia aguda (CD) e 57 de doadores clinicamente saudáveis, sem diarreia (SD). Após identificação e caracterização microbiana, foi determinado o seu perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. As linhagens bacterianas foram identificadas fenotípica e genotipicamente por métodos bioquímicos clássicos e moleculares, respectivamente, e a caracterização dos patótipos de interesse no trato gastrointestinal foi feita por metodologia molecular. O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foi determinado pelo método de Kirby-Bauer, segundo recomendações do CLSI (2007). Considerando-se todo o grupo amostral, 136 linhagens de *E. coli* foram recuperadas de fezes CD (36,8% diarreioagênicas) e 84 de fezes SD (30,9% diarreioagênicas). A confirmação da identificação bioquímica por metodologia molecular mostrou uma correlação de 97,3% entre as duas metodologias. *E. coli* enteroagregativa (EAEC) foi o patótipo mais frequentemente recuperado no grupo CD (16,2%) e o único isolado no grupo SD (30,9%). *E. coli* enteropatogênica (EPEC) atípica foi o segundo patótipo mais isolado no grupo CD (10,3%), seguido de *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) (7,4%) e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) (2,9%). Nenhuma linhagem de EPEC típica e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) foi recuperada. A investigação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos demonstra elevada resistência a fármacos, como ampicilina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprim, enquanto que resistência intermediária foi observada contra a ampicilina/sulbactam, cefalotina, tetraciclina e amicacina e gentamicina. Os antimicrobianos mais eficazes foram ceftazidima, ceftriaxona, imipenem e piperacilina/tazobactam, para os quais não foi verificada resistência bacteriana. A diferenciação entre os patótipos de *E. coli* é de grande importância, uma vez que estes microrganismos estão implicados em diarreias agudas em

crianças e, quase sempre, necessitarão de tratamento medicamentoso. De maneira geral, nossos resultados indicam a relevância da participação de agentes bacterianos diarreiogênicos na gênese da diarreia aguda na infância, em crianças de 0 a 5 anos. A alta resistência a antimicrobianos observada em nosso trabalho suscita uma ampla discussão sobre uso indiscriminado/indevido de antibióticos e os riscos inerentes da automedicação.

PALAVRAS CHAVES: Diarreia aguda. *E. coli*. Resistência a drogas. Microbiota fecal.

ABSTRACT

Acute diarrhea is a public health problem, important cause of morbidity and mortality, especially in developing countries. The etiology is varied and considering the bacterial pathogens, the diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes are among the most important. In this study we have investigated the occurrence of commensal or diarrheagenic *E. coli* in 141 fecal samples from children of zero to five years of age in Juiz de Fora, MG. Of the specimens, 84 were obtained from clinically injured donors with acute diarrhea (CD) and 57 from clinically healthy donors without diarrhea (SD). After microbial identification and characterization the bacterial antimicrobial susceptibility patterns were determined. The bacterial strains were phenotypically and genotypically identified by conventional biochemical methods and molecular approach, respectively. The *E. coli* pathotypes were also genetically characterized by molecular methodology. The antimicrobial susceptibility patterns were determined by the Kirby-Bauer method, according to the CLSI guidelines (2007). Considering all fecal specimens, 136 *E. coli* strains were isolated and identified (36.8%, CD) and 84 (30.9%, SD). Confirmation of identification by molecular approach showed 97,3% of correlation between the two methodologies. Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) was the most frequently recovered pathotype identified in the acute diarrhea group (16.2%) whereas the only recovered pathotype identified in the feces from healthy donors (30.9%). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) was the second most isolated pathotype group (10.3%), followed by STEC (7.4%) and ETEC (2.9%). No typical EPEC or EIEC strains were recovered. The antimicrobial susceptibility patterns shown high antimicrobial resistance rates against ampicillin, tetracycline, and sulfamethoxazole-trimethoprim. Intermediary resistance was observed against ampicillin/sulbactam, cefalotin, tetracycline, amikacin and gentamicin. The most effective antimicrobials were ceftazidime ceftriaxone, imipenem and piperacillin/tazobactam, for which no bacterial resistance was observed. The differentiation between the diarrheagenic *E. coli* pathotypes is of great importance, since they are involved in acute diarrheal diseases in children and, almost often will require antimicrobial chemotherapy. Overall, our results may indicate the importance of the bacterial agents in the etiology of diarrheic diseases in childhood, mainly

considering children of 0 to 5 years. The high antimicrobial resistance observed in our study raises a broad discussion on the indiscriminate or improper use of antimicrobials, besides the risks of self-medication.

KEYWORDS: Acute diarrhea. *E. coli*. Drug resistance. Fecal microbiota.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Aspecto característico do crescimento de colônias de enterobactérias em Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), evidenciando colônias lactose positivas (verde metálico ou rosa escuro) e lactose negativas (transparentes a rosa claro).....36

FIGURA 2 Meio IAL para identificação presuntiva de microrganismos da Família *Enterobacteriaceae*.....37

FIGURA 3 Aspecto morfotintorial de esfregaço de cultura microbiana corado pelo método de Gram evidenciando as características morfológicas de linhagens presuntivamente identificadas como *Escherichia coli*. Aumento: 1000X.....37

FIGURA 4 Distribuição por idade do grupo de crianças cujas fezes foram amostradas neste estudo, após assinatura do termo de consentimento pelos responsáveis.....43

FIGURA 5 Relação entre faixa etária e distribuição de *Escherichia coli* nos grupos de crianças com e sem manifestação clínica de diarreia, isolados de amostras fecais de crianças de 0-5 anos em Juiz de Fora, MG.....44

FIGURA 6 Eletroforegrama representativo da identificação específica (RNA Ribossomal 16S) de *E. coli* por PCR das linhagens caracterizadas presuntivamente por métodos bioquímico-fisiológicos. Fragmento esperado: 660 bp. Padrão de peso molecular: 1 Kb DNA ladder.....45

FIGURA 7 Eletroforegrama representativo da identificação dos patotipos *Escherichia coli* por PCR Multiplex entre os microrganismos isolados e identificados.

A – Primeira reação (917/326bp, EPEC típica; 917bp EPEC atípica; 630bp, EAEC).
B – Segunda reação (180/255pb, STEC; 190/450bp, ETEC). Padrão de peso molecular: 100bp DNA ladder.....46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Oligoiniciadores utilizados neste estudo.....	40
TABELA 2 Características da população amostrada.....	42
TABELA 3 Distribuição percentual das linhagens de <i>Escherichia coli</i> isoladas de crianças com e sem manifestação de doença diarréica.....	45
TABELA 4 Distribuição (%) dos patótipos de <i>Escherichia coli</i> isolados de crianças com e sem manifestação de doença diarréica em relação à sua faixa etária.....	47
TABELA 5 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de espécimes fecais de crianças de 0-5 anos, com diarréia (n = 68) e sem diarréia (n= 43) em Juiz de Fora, MG.....	48
TABELA 6 Distribuição dos fenótipos de resistência a um ou mais antimicrobianos entre as amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de crianças sem manifestação clínica de diarréia na cidade de Juiz de Fora, MG.....	50
TABELA 7 Distribuição dos fenótipos de resistência a um ou mais antimicrobianos entre as amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de crianças com manifestação clínica de diarréia (n = 68) na cidade de Juiz de Fora, MG.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: *aggregative adherence*

A/E: *attaching and effacing*

ATCC: *American Type Culture Collection*

bfpA: gene que codifica para proteína A do BFP em EPEC

BFP: fimbrias formadoras de feixes

CD: com diarreia

CVD432: plasmídeo típico de *E. coli* enteroagregativa

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DAEC: *Escherichia coli* difusamente aderente

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTP: deoxinucleosídeo trifosfato

EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativa

EAF: fator de aderência de EPEC

EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica

ehxA: gene que codifica para enterohemolisina

EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva

eae: gene que codifica intimina

elt: gene que codifica enterotoxina termolábil

EMB: eosina azul de metileno

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica

etl: gene que codifica enterotoxina termolábil

HlyA: gene que codifica para alfa hemolisina produzida por *Escherichia coli*

INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IAL: Instituto Adolfo Lutz

ipa: *invasion plasmid antigens*

ipaH: gene que codifica para mecanismos enteroinvasivos

irp2: *yersiniabactin biosynthesis* gene

LEE: *locus of enterocyte effacement*

LT: toxina termolábil

LPS: lipopolisacarídeos

PCR: reação de polimerase em cadeia

pet: *plasmid encoded toxins*

RNA: ácido ribonucléico

RNAr: ácido ribonucléico ribossômico

rpm: rotações por minuto

saa. Gene que codifica para adesina auto-aglutinante

shf: *cryptic open reading frame*

SD: sem diarreia

ST: toxina termoestável

Stx: gene que codifica para toxina shiga

STEC: *Escherichia coli* produtora de toxina shiga

TBE: Tampão Tris Borato EDTA

TGI: trato gastrointestinal

TSA: teste de sensibilidade a antimicrobianos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Manifestações clínicas das infecções do trato gastrintestinal de etiologia bacteriana.....	21
2.2 Microbiota associada aos seres humanos e outros animais.....	22
2.3 Bastonetes Gram negativos da família <i>Enterobacteriaceae</i>	24
2.3.1 Gênero <i>Escherichia</i>	25
2.3.1.1 <u>EPEC</u>	26
2.3.1.2 <u>ETEC</u>	27
2.3.1.3 <u>STEC</u>	28
2.3.1.4 <u>EAEC</u>	30
2.3.1.5 <u>EIEC</u>	30
2.4 Antimicrobianos e resistência bacteriana.....	31
2.5 Considerações sobre as metodologias de estudo bacteriano.....	32
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivos Gerais.....	34
3.2 Objetivos Específicos.....	34
4 PACIENTES E MÉTODOS	35
4.1 Espécimes clínicos.....	35
4.2 Isolamento e identificação bioquímica das linhagens bacterianas a partir de espécimes fecais humanos.....	36
4.3 Extração de DNA genômico, confirmação da identificação da espécie <i>Escherichia coli</i> e detecção dos patotipos de <i>E. coli</i>	38
4.4 Avaliação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas... ..	41
5 RESULTADOS	42
5.1 Identificação de <i>E. coli</i> e caracterização dos patotipos.....	42
5.2 Avaliação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas.....	46
6 DISCUSSÃO	52

6.1 Doença diarréica infantil.....	52
6.2 Identificação de linhagens comensais e enteropatogênicas de <i>E. coli</i>	53
6.3 Pesquisa de <i>Escherichia coli</i> diarreagênica.....	56
6.3.1 <u>EPEC</u>	57
6.3.2 <u>EAEC</u>	58
6.3.3 <u>ETEC</u>	60
6.3.4 <u>STEC</u>	61
6.3.5 <u>EIEC</u>	63
6.4 Padrão de susceptibilidade a drogas antimicrobianas.....	64
6.5 Considerações finais.....	66
7 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	70
ANEXOS	89

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As doenças do trato gastrointestinal têm uma distribuição global, afetando milhões de indivíduos em todo mundo. A sua etiologia é variada e inclui organismos de grande relevância na medicina humana, como parasitas, vírus e bactérias, dentre outros agentes. Nos países em desenvolvimento, estas doenças figuram como uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade em indivíduos de todas as faixas etárias e especialmente em crianças de pouca idade, ao considerar-se a etiologia bacteriana. A maioria dos patógenos é encontrada em todo mundo, entretanto, tais doenças podem ser adquiridas por viajantes e importadas para os seus países de origem, sobretudo considerando-se os processos de globalização. Neste sentido, observa-se a necessidade do mapeamento epidemiológico das áreas de ocorrência, bem como a definição dos agentes etiológicos envolvidos.

Muitos casos de doenças do trato gastrointestinal não são diagnosticados por carência de solicitação médica de coprocultura, uma vez que este procedimento não faz parte da rotina clínica, isto pode ser justificado pelo fato das manifestações serem brandas e auto-limitadas, em que os pacientes não procuram atendimento médico, ou porque existe uma sobrecarga na saúde pública que dificulta a utilização dos recursos médicos e laboratoriais disponíveis. Além disso, existe uma carência de dados científicos sobre a ocorrência e a epidemiologia destas doenças, o que pode interferir com as políticas de gerenciamento de recursos humanos e de infraestrutura.

Manifestações clínicas no trato gastrointestinal de etiologia bacteriana, como doenças diarreicas e doenças inflamatórias agudas figuram como um problema para milhões de seres humanos no mundo inteiro. Em países em desenvolvimento, essas doenças são uma das duas principais causas de morte infantil e contribuem para a severidade de deficiências relacionadas à desnutrição. Apesar dos avanços da microbiologia clínica, o diagnóstico e a epidemiologia dessas doenças ainda é um grande problema e permanece como uma importante meta para o desenvolvimento de políticas de saúde pública.

É reconhecida a importância das enterobactérias na etiologia das infecções do trato gastrointestinal de seres humanos e de outros animais. Entre estes

microrganismos, destacam-se os bastonetes Gram negativo entéricos da família *Enterobacteriaceae*, principalmente a espécie *Escherichia coli* e seus patótipos, que podem estar associadas a diversas manifestações clínicas do trato gastrintestinal.

Considerando-se a variabilidade genética dos microrganismos, a resistência às drogas tem se tornado um problema grave dos pontos de vista ecológico e clínico. A cada dia, surgem relatos da crescente resistência de bactérias isoladas tanto de indivíduos sadios ou apresentando quadros clínicos diversos. A contenção do fenômeno da resistência às drogas figura como um dos grandes desafios da ciência no século XXI, e vários são os apelos dos Órgãos de Saúde Internacionais, que preconizam estudos regionais sobre os perfis de susceptibilidade bacteriana aos antimicrobianos.

Assim, dando sequência à linha de pesquisa “Epidemiologia das doenças infecto-parasitárias do trato gastrintestinal”, em colaboração com a Secretaria de Saúde, Saneamento e Desenvolvimento Ambiental de Juiz de Fora, MG, pretende-se contribuir para o conhecimento dos patótipos de *E. coli* associados à diarreia aguda infantil e seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos. Os dados obtidos neste estudo poderão servir como base ou de maneira complementar a ações voltadas para educação sanitária, além de estímulo para uma reflexão sobre a crescente resistência a drogas e o uso racional de antimicrobianos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Manifestações clínicas das infecções do trato gastrointestinal de etiologia bacteriana

A diarreia é uma das causas principais de morte em crianças menores de cinco anos nos países em desenvolvimento, respondendo por, aproximadamente dois milhões de mortes por ano no mundo (BRYCE et al., 2005; MENDEZ-ARANCIBIA et al., 2008). É uma doença infecciosa que pode ser resultado de infecções sucessivas múltiplas, infecção não resolvida ou secundária a problemas de má-absorção ou ainda a uma síndrome gastrointestinal. Embora muitos vírus, bactérias e parasitas possam produzir diarreia persistente, *Giardia* sp, *Cryptosporidium* e patótipos de *Escherichia coli* estão entre os agentes mais importantes (OCHOA et al., 2004).

A doença diarreica ocorre quando aumenta a proporção de água contida nas fezes, e pode ser classificada em aguda ou persistente. A diarreia aguda é definida como um processo sindrômico de duração igual ou inferior a 14 dias, de etiologia presumivelmente infecciosa (viral, bacteriana ou parasitária) que provoca má absorção de água e eletrólitos, aumento do número de evacuações (três ou mais em um período de 24 horas) e aumento do volume do fluido fecal. O início da diarreia geralmente é súbito com duração curta, e a grande maioria resolve-se em menos de três a cinco dias. A diarreia persistente representa um episódio de início abrupto com duração superior a 14 dias (MITRA et al., 1991; TEKA et al., 1996; ANDRADE et al., 1999; NAKANO et al., 2006).

Muitos casos de doença diarreica não são diagnosticados, seja porque são brandos e auto-limitados, em que o paciente não procura atendimento médico, ou porque, sobretudo nos países em desenvolvimento, os recursos médicos ou laboratoriais não estão disponíveis satisfatoriamente (KOSEK et al., 2003; QADRI et al., 2005)

Segundo dados da literatura, a diarreia é a segunda causa mais importante de morte no mundo. Apesar das diversas técnicas microbiológicas disponíveis, aproximadamente metade dos casos de diarreia permanecem sem definição da etiologia, o que dificulta a implantação de políticas e estratégias de mapeamento e controle das áreas endêmicas de ocorrência destes patógenos (DURMAZ et al., 2005).

Além das manifestações de doença bacteriana no trato gastrointestinal, há processos inflamatórios intestinais de grande relevância na medicina humana, como doença de Crohn e colites ulcerativas, estes processos patológicos podem ser diferenciadas, do ponto de vista clínico, pela aparência endoscópica e histologia (BASSET et al., 2004). Segundo a literatura, há de se considerar, também, o envolvimento de processos ou produtos bacterianos na etiologia de câncer de colo retal em seres humanos, como uma manifestação clínica no trato gastrointestinal associada a estes microrganismos (TOPRAK et al., 2006).

Manifestações clínicas no trato gastrointestinal de etiologia bacteriana, como doenças diarreicas e doenças inflamatórias agudas permanecem um problema para milhões de seres humanos no mundo inteiro (DURMAZ et al., 2005). Em países em desenvolvimento essas doenças contribuem para a severidade de deficiências relacionadas à desnutrição (PATHELA et al., 2005). Apesar dos avanços da microbiologia clínica, o diagnóstico e a epidemiologia dessas doenças ainda é um grande problema e permanece como uma importante meta para o desenvolvimento de políticas de saúde pública (PATHELA et al., 2005; SHELTON et al., 2006).

2.2 Microbiota associada aos seres humanos e outros animais

Os microrganismos encontrados nos diversos sítios anatômicos do corpo humano e de outros animais saudáveis podem ser dispostos em dois grupos: microbiota residente e microbiota transitória. A microbiota residente é composta por certos tipos microbianos relativamente fixos, encontrados com regularidade numa determinada área, em uma determinada condição fisiológica, com diversificada habilidade metabólica, que inclui o grau de sensibilidade ao oxigênio e outros fatores, que

permitem tanto sua colonização em sítios específicos como a sua coexistência (SUMMANEM et al., 1993). A microbiota transitória é constituída, primariamente, de microrganismos não patogênicos ou potencialmente patogênicos, encontrados em superfícies externas e internas durante algumas horas, dias ou mesmo semanas. Alguns componentes da microbiota transitória tem pouca importância, desde que a microbiota residente esteja em equilíbrio, mas, havendo alteração nesse equilíbrio, tanto os microrganismos transitórios quanto os residentes podem proliferar-se e causar doença (ROSEBURY, 1962; ELHAG et al., 1986; VOLLAARD & CLASENER, 1994).

Estes microrganismos quando em contato com seus hospedeiros, em sítios anatômicos específicos, como, por exemplo, os intestinos, estão submetidos, permanentemente, a interferências inerentes à fisiologia do hospedeiro, mas, também, a uma variedade de fatores estressantes, como a limitação da disponibilidade e a diversificação de nutrientes, drogas antimicrobianas, agentes químicos e seus resíduos, que interferem nas interações microbianas, no pH e no potencial de oxido-redução (Eh) do meio, que passa a atuar como fator crítico para a seleção de bactérias (SALYERS, 1984).

Em termos populacionais, é válido supor que a sobrevivência bacteriana nos diversos sítios anatômicos dos seus hospedeiros esteja relacionada à sua capacidade de adaptação, incluindo a disseminação ou aquisição de genes como os que codificam, por exemplo, a produção de toxinas, ou resistência a antimicrobianos, isto garante um reservatório de patógenos putativos de hospedeiros animais, visto que qualquer agente ou condição que possa alterar os padrões bioquímicos, fisiológicos e genéticos de indivíduos de uma população poderia alterar os padrões de virulência dessa população (WITTE, 2000; LORIAN & GEMMELL, 1994).

Define-se virulência ou patogenicidade como a capacidade de uma bactéria agredir um hospedeiro vivo, na maioria das vezes, em situação de infecção. Fator de virulência é o nome dado a um componente, produto bacteriano ou estratégia que contribua para a expressão da agressão (SALYERS & WHITT, 1994).

Os fatores de virulência podem ser classificados em duas categorias não excludentes: os que promovem a colonização e invasão bacteriana e aqueles que causam danos ao hospedeiro. No primeiro caso, citam-se cápsula, fimbrias e adesinas; entre fatores de virulência que causam danos ao hospedeiro consideram-

se o antígeno LPS (endotoxina), exotoxinas e enzimas hidrolíticas (SALYERS & WHITT, 1994).

2.3 Bastonetes Gram negativos da família *Enterobacteriaceae*

É reconhecida a importância das bactérias anaeróbias facultativas na etiologia das infecções humanas do trato gastrointestinal e de outros animais, dentre outras bactérias e grupos microbianos (KAPER et al., 2004; BARRETO et al., 2006). Destes microrganismos, representantes das espécies *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* e *Shigella sp.* são de grande importância clínica (VARGAS et al., 1999; ARANDA et al., 2004; ORLANDI et al., 2006; BRANDAL et al., 2007).

As bactérias aeróbias anaeróbias facultativas são caracterizadas por sua habilidade de apresentar atividade de metabolismo energético na presença ou na ausência de oxigênio. Estes microrganismos podem, em condições nutricionais e ambientais favoráveis, exibir metabolismo fermentativo, o que lhes permite uma grande versatilidade na colonização e coexistência com outros microrganismos e com o seu hospedeiro ou, ainda, sua sobrevivência no ambiente (JARLOV, 1999; SCANVIC et al., 2001).

A família *Enterobacteriaceae* constitui o maior e mais heterogêneo grupo de bastonetes Gram negativo clinicamente importantes e isolados com mais frequência de amostras clínicas (KAPER et al., 2004). Segundo a literatura atual, mais de 40 gêneros e 150 espécies e subespécies foram descritos. Estes gêneros foram classificados de acordo com propriedades bioquímicas, antigênicas e características moleculares. Apesar da complexidade da família, menos de 20 espécies são responsáveis por mais de 95 % das infecções (VIDAL et al., 2005).

As enterobactérias são microrganismos ubíquos, encontrados na água, no solo e na vegetação, e compõem a microbiota anfibiótica do trato gastrointestinal de seres humanos e outros animais e, por esta razão, estão associados a diversas doenças humanas neste sítio (SHELTON et al., 2006). Espécies dos gêneros *Shigella* e *Salmonella* são consideradas patógenos primários, enquanto que outras

como *E. coli*, dado o seu caráter anfibiótico, podem associar-se a doenças oportunistas (SMITH et al., 2007).

Infecções por enterobactérias podem originar-se a partir de reservatórios animais, como, por exemplo, por *Salmonella*, de um portador assintomático humano, por exemplo, por *Shigella* e *Salmonella typhi* ou da disseminação endógena de microrganismos em um paciente susceptível, por exemplo, *E. coli* (VIDAL et al., 2005).

2.3.1 Gênero *Escherichia*

O gênero *Escherichia* compreende cinco espécies, das quais a *Escherichia coli* é a mais comum e clinicamente a mais importante. Este microrganismo está associado a diversas doenças, e entre elas, manifestações clínicas no trato gastrointestinal (PRÈRE & FAYET, 2005). A habilidade destes microrganismos na produção de doenças está associada a sua diversidade antigênica. Muitos antígenos foram descritos e são usados para classificar as linhagens para fins epidemiológicos (SHELTON et al., 2006). Este é um dos patógenos bacterianos mais versáteis. Algumas linhagens são membros importantes da microbiota intestinal em seres humanos e animais, enquanto outras possuem fatores de virulência que as permite provocar infecções no trato gastrointestinal ou em outros locais do organismo (KAHLMETER et al., 2003; STURMER et al., 2004; SMITH et al., 2007). As linhagens que causam doença diarreica apresentam vários mecanismos patogênicos distintos, e diferem com relação às suas características epidemiológicas (KAPER et al., 2004; ERB et al., 2007, RASKO et al., 2008).

Entre os fatores de virulência das *E.coli* destacam-se principalmente, elementos estruturais (LPS, cápsula), aqueles associados à adesão (adesinas), relacionados à invasão (exotoxinas), além de enterotoxinas. Entre as exotoxinas produzidas por estes microrganismos incluem-se a toxina Shiga (STX-1 e STX-2), toxinas termoestáveis (STA e STB) e toxinas termolábeis (LT-I e LT-II). Além destas, citam-se as hemolisinas (HlyA) importantes para captação de ferro necessário ao crescimento *in vivo* destes microrganismos (VIDAL et al., 2005).

Um grande número de *E. coli* está presente no trato gastrointestinal humano. Estas bactérias são comumente causadoras de sepse, meningites neonatais, infecções de trato urinário e gastroenterites. A maioria das infecções é endógena (PRÈRE & FAYET, 2005). Até o momento, tem sido proposto seis grupos patogênicos de *E. coli* associados às gastroenterites em seres humanos e outros animais: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (SONG et al., 2005, VIDAL et al., 2005; SHELTON et al., 2006).

2.3.1.1 EPEC

E. coli enteropatogênica (EPEC) foi a primeira associada à doença diarréica e permanece como causa importante da doença em recém-nascidos, sobretudo em países em desenvolvimento. A doença não é comum em crianças mais velhas e em adultos, provavelmente devido a sua imunidade protetora. A prevalência de EPEC está relacionada a diferenças na população de estudo, na faixa etária, e a critérios e métodos utilizados no diagnóstico (OCHOA et al., 2008). As EPECs produzem fimbrias formadoras de feixes (Bfp), intimina (uma adesina) e seu receptor, uma proteína translocada denominada Tir. Estes fatores de virulência permitem a ligação da bactéria às células epiteliais do intestino delgado, levando a destruição das microvilosidades, esta destruição causa má-absorção resultando em diarreia aquosa (KAPER et al., 2004; VIDAL et al., 2005; RASKO et al., 2008). Os genes responsáveis por este processo se localizam em uma ilha de patogenicidade, com mais de 40 genes associados à adesão e destruição da superfície mucosa do hospedeiro (ARANDA et al., 2004; SHELTON et al., 2006).

O mecanismo central de patogenicidade de EPEC é a lesão A/E, que se caracteriza por destruição das microvilosidades, íntima aderência da bactéria ao epitélio intestinal, formação de um pedestal e agregação por polimerização de actina e outros elementos do citoesqueleto celular. Determinantes genéticos para produção de lesão A/E estão localizados no locus LEE. A intimina é uma proteína codificada

pelo gene *eae* que é responsável pela íntima aderência entre a bactéria e a membrana do enterócito (TRABULSI et al., 2002).

Muitas linhagens de EPEC apresentam uma capacidade de aderência nas células do epitélio intestinal, formando microcolônias compactadas que pode ser visualizadas depois da bactéria ter entrado em contato com a célula, este fenômeno está associado com a presença do fator de aderência (EAF). O plasmídeo EAF também carrega os genes *bfpA* que codificam para fimbrias formadoras de feixes (BFP), promovendo a estabilização das bactérias ao epitélio intestinal (TRABULSI et al., 2002; KAPER et al., 2004; VIDAL et al., 2005; RASKO et al., 2008). O plasmídeo EAF não é essencial para lesão A/E. De acordo com a presença ou ausência do plasmídeo EAF e conseqüente expressão do gene *bfpA*, as linhagens de EPEC podem ser caracterizadas como típicas ou atípicas respectivamente.(TRABULSI et al.,2002).

2.3.1.2 ETEC

A doença causada por *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) é mais comum em países em desenvolvimento (aproximadamente 650 milhões de casos por ano). São observadas infecções em crianças pequenas em países em desenvolvimento ou em pessoas que viajam para estas áreas. O inóculo microbiano necessário para o desenvolvimento da doença é alto, portanto, as infecções são adquiridas através do consumo de alimentos e água contaminados, não ocorrendo disseminação pessoa-pessoa (VIDAL et al., 2005; JOHNSON et al., 2009).

A aderência da ETEC às células do intestino é mediada por proteínas e fatores de colonização espécie-específicos, que se ligam aos receptores na membrana plasmática das células do intestino delgado, induzindo a perda de água e eletrólitos através da atividade de enterotoxinas. Estes microrganismos produzem duas classes de enterotoxinas, termolábeis (LT-I e LT-II) que são codificadas pelo operon *elt* e termoestáveis (ST-A e ST-B) codificadas por genes localizados no operon *est* (NATARO & KAPER, 1998; NAGY & FEKETE, 2005; TURNER et al., 2006; SHELTON et al., 2006).

A toxina LT-I é funcional e estruturalmente semelhante à toxina colérica e está associada à doença humana. O efeito da interação desta toxina com o epitélio do intestino delgado promove aumento dos níveis de AMPc que provoca alteração na absorção de sódio e cloreto levando a manifestações de diarreia aquosa (CHENG et al., 2006). Além disso, a presença da toxina estimula também a secreção de prostaglandinas e produção de citocinas inflamatórias, que resultam na maior perda de líquidos. A ST-A está associada à doença humana e sua ação resulta em um aumento nos níveis de monofosfato de guanosina cíclico e a subsequente secreção de líquidos. LT-II e ST-B não estão associadas a doenças em humanos (ARANDA et al., 2004; VIDAL et al., 2005; ALLEN et al., 2006).

A diarreia secretória causada por ETEC se desenvolve após um período de incubação de um a dois dias e persiste por três a quatro dias em média. Os sintomas são semelhantes aos da cólera, porém mais leves (CHENG et al., 2006). Não são observadas alterações histológicas e nem inflamação da mucosa intestinal. Não é possível distinguir se a doença é causada pela toxina termolábil ou termoestável (ARANDA et al., 2004; SHELTON et al., 2006).

2.3.1.3 STEC

As linhagens de *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC), representam um grupo de *E. coli* diarreiogênica caracterizado pela expressão de Stx, que codifica para *stx1* e *stx2*, englobam uma variedade de microrganismos que inicialmente eram destacados pela produção de toxina Shiga. Mais recentemente, outros marcadores de virulência tem sido associados a estas bactérias (OLIVEIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008). Dependendo do seu padrão de virulência, foi sugerido um subgrupo destes microrganismos também chamado de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), que são conhecidas pela freqüente associação com formas mais graves de manifestações clínicas (ARANDA et al., 2004). As linhagens de EHEC são caracterizadas pela expressão do gene *eae* que caracteriza a lesão A/E e pela presença do gene *stx* (NATARO et al., 1998; TRABULSI et al., 2002).

A ingestão de menos de 100 bactérias pode causar doença. A gravidade destas doenças varia de uma diarreia leve a uma colite hemorrágica com dor abdominal severa e diarreia sanguinolenta, com pouca ou nenhuma febre (SHELTON et al., 2006). Apesar da diversidade sorológica, acredita-se que a maioria dos casos clínicos em humanos esteja relacionada com o sorotipo O157: H7 que foi identificado como patógeno humano em 1982 (BANATVALA et al., 2001; SONG et al., 2005; CAPRIOLI et al., 2005; GILMOUR et al., 2006). Embora, O157:H7 seja considerado o sorotipo mais importante de STEC em muitos países industrializados, centenas de distintos sorotipos tem sido isolados de doenças em humanos em diferentes áreas geográficas, incluindo o Brasil (GUTH et al., 2002; IRINO et al., 2002; VAZ et al., 2004; IRINO et al., 2007)

A STEC representa um importante patógeno emergente que pode ser transmitido por alimentos, principalmente por carne bovina. Animais domésticos, bovinos e outros mamíferos tem sido reportados como reservatórios naturais de STEC em todo mundo (CONEDERA et al., 2004). Estudo recente, desenvolvido em Minas Gerais, com amostras fecais de búfalos, demonstrou alta prevalência de STEC nas fezes destes animais (OLIVEIRA et al., 2007).

O quadro infeccioso causado por STEC envolve diarreia não sanguinolenta com dor abdominal podendo apresentar vômito. Algumas pessoas, entretanto, apresentam sintomas que podem evoluir para diarreia sanguinolenta com dor abdominal intensa. A regressão dos sintomas ocorre tipicamente após quatro a dez dias, porém, a síndrome hemolítico-urêmica é uma complicação particularmente em crianças pequenas e está associada à produção da toxina *stx-2* (VIDAL et al., 2005). Esta síndrome (transtorno caracterizado por insuficiência renal aguda, trombocitopenia e anemia hemolítica microangiopática) é uma complicação que pode ocorrer em 5 a 10 % de crianças infectadas com menos de dez anos de idade. A doença é adquirida através do consumo de alimentos (principalmente carnes mal-passadas, leite ou sucos não pasteurizados, vegetais e frutas) e água contaminados (SONG et al., 2005; VIDAL et al., 2005; DUMKE et al., 2006; SHELTON et al., 2006), causada por STEC O157:H7, porém casos de não O157 tem sido reportados (IRINO et al., 2002; VAZ et al., 2004; SOUZA et al., 2007).

Estas linhagens bacterianas expressam uma toxina Shiga (STX-1, STX-2 ou ambas). STX-1 é semelhante à toxina Shiga produzida por *Shigella dysenteriae*,

enquanto que a STX-2 apresenta uma homologia de 60%. Ambas são adquiridas através de bacteriófagos lisogênicos (ARANDA et al., 2004, SONG et al., 2005). Além da associação da STX-2 à síndrome hemolítico-urêmica, as toxinas Shiga também estimulam a expressão de citocinas inflamatórias, que, entre outros efeitos, estimulam a expressão do glicolípido alvo da toxina na célula do hospedeiro (VIDAL et al., 2005; GILMOUR et al., 2006; SHELTON et al., 2006).

2.3.1.4 EAEC

Linhagens de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) tem sido identificadas como patógeno emergente causador de diarreia aquosa persistente em crianças, com desidratação de recém-nascidos em países em desenvolvimento e pessoas que viajam para estas áreas. A persistência destas bactérias está associada à diarreia crônica e atraso no desenvolvimento infantil, e são caracterizadas pela aderência agregativa (AA) auto-aglutinação em uma disposição semelhante a *pilhas de tijolos* (VIDAL et al., 2005; MOHAMED et al., 2007). Este processo é mediado por fímbrias formadoras de feixes (AAF I e AAF II), que são codificadas por genes plasmidiais (*aggR*). Estes microrganismos depois de aderidos à superfície do epitélio estimulam a secreção de muco e agregam-se a um biofilme que recobre o epitélio do intestino delgado (SCHEMBRI et al., 2003; ARANDA et al., 2004; MENDEZ-ARACIBIA et al., 2008). Fatores de virulência carregados pelos genes *aggR*, *aap*, *aatA* (gene que transporta a proteína CVD432) são importantes para aderência da bactéria a mucosa intestinal e formação do biofilme. Após adesão ao epitélio intestinal linhagens de EAEC podem secretar enterotoxinas e citotoxina codificadas pelos genes que incluem *pet*, *irp2*, *shf*, além de outros que também estão envolvidos na patogênese de EAEC (SHEIKH et al., 2001; MOHAMED et al., 2007).

2.3.1.5 EIEC

Linhagens de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) são menos comuns. Estas linhagens apresentam similaridades à *Shigella* devido a propriedades fenotípicas e

patogênicas que estão associadas a alguns poucos sorotipos. Utilizando os genes associados aos plasmídeos (genes *plnV*), como a sequência de *ipaH*, as linhagens de EIEC invadem as células do intestino grosso, por endocitose, no interior das células, provocam lise do vacúolo endocítico, multiplicam-se e disseminam-se para outras células adjacentes (NATARO & KAPER, 1998; ARANDA et al., 2004; VIDAL et al., 2005; VIEIRA et al., 2007). Um pequeno número de pacientes pode apresentar sintomas clínicos que progridem para a forma disentérica da doença associada à febre, cólicas abdominais e leucócitos nas fezes. Este processo de destruição de células epiteliais com infiltração inflamatória pode, por sua vez, progredir para ulceração no cólon (SONG et al., 2005).

2.4 Antimicrobianos e resistência bacteriana

Um aspecto importante da biologia dos microrganismos, principalmente das bactérias que habitam e coexistem no trato gastrointestinal, como os facultativos da família *Enterobacteriaceae*; e não diretamente ligados à produção de doenças de natureza infecciosa, mas ligado à sua persistência, é a crescente resistência a drogas. Este crescente fenômeno, tido com um dos grandes desafios do século XXI para ciência e para a medicina (sua cotenção), observado neste e em outros grupos microbianos apresenta algumas conseqüências já estabelecidas para a relação bactéria-hospedeiro (LORIAN & GEMMELL, 1994; DINIZ et al., 2000; DINIZ et al., 2004).

À medida que as drogas antimicrobianas são introduzidas no ambiente, os microrganismos respondem, tornando-se resistentes. Em regra, os mecanismos de resistência adquiridos resultam de alterações na fisiologia celular e na estrutura microbiana devido a alterações no padrão genético normal ou regulação da expressão de algumas habilidades já presentes no seu genoma (WITTE, 2000). Várias evidências mostram que as drogas antimicrobianas podem interferir com a expressão de determinantes de virulência microbianos (DINIZ et al., 2003; DINIZ et al., 2004).

Agentes antimicrobianos são utilizados no tratamento de infecções bacterianas no mundo todo, nos últimos anos sua utilização tem crescido notavelmente, tanto na medicina humana quanto na veterinária e como consequência a este uso indiscriminado a resistência tem surgido como um problema de preocupação mundial (TENOVER & HUGHES, 1996; DUNNE et al., 2000; DEMAN et al., 2000; MOREDO et al., 2007), além de outros fatores como o uso de antibióticos em alimentos de animais (SINGER et al., 2003), condições higiênicas precárias e regiões superpovoadas (LESTER et al., 1990; BARTOLONI et al., 2004)

O problema de resistência as drogas antimicrobianas não está restrito a bactérias patogênicas, também envolve bactérias da microbiota que podem se tornar um reservatório principal de resistência de algumas espécies bacterianas. *E. coli* é uma bactéria comensal presente no intestino dos homens e animais, está presente na uretra anterior e é o principal agente responsável pelas infecções urinárias (KAHLMETER, 2003). *E.coli* adquire resistência com facilidade e é comumente encontrada em diferentes espécies de animais (von BAUM & MARRE, 2005).

A resistência aos antimicrobianos pode aparecer em amostras clínicas previamente sensíveis em decorrência da transferência de plasmídeos, conhecidos como fatores R ou plasmídeos R. As bactérias entéricas Gram negativo possuem comumente um único plasmídeo R grande, que codifica para a resistência a vários antibióticos. Algumas linhagens de *E. coli* resistentes às cefalosporinas, possuem β -lactamases induzíveis que conferem resistência cruzada à muitos antibióticos beta-lactâmicos (ALANIS, 2005).

2.5 Considerações sobre as metodologias de estudo bacteriano

Considerando-se a metodologia de estudo e investigação em microbiologia, percebe-se que a identificação convencional dos patógenos do trato gastrintestinal, a partir de amostras fecais, por cultura seletiva e características bioquímicas, é complexa e dispendiosa. Desta maneira, métodos moleculares têm sido desenvolvidos para detecção rápida destes microrganismos, principalmente em

espécimes clínicos fecais, cuja diversidade bacteriana é alta (CHIU et al., 2004; DURMAZ et al., 2005; SHELTON et al., 2006).

Estes métodos, na maioria das vezes utilizados em investigações epidemiológicas em todo o mundo, são baseados na detecção de genes relacionados a componentes específicos da virulência destes microrganismos associados à adesão, invasão e produção de enterotoxinas, dentre outros, com a utilização de técnicas como a da reação em cadeia da polimerase (CHIU et al., 2004; DURMAZ et al., 2005; VIDAL et al., 2005).

Dada à importância de estudos científicos de investigação epidemiológica de prevalência e ocorrência de surtos, epidemias e mesmo de mapeamento de reservatórios microbianos que possam atuar como fonte potencial para disseminação de novos casos em populações susceptíveis, o uso de métodos moleculares é, muitas vezes, associado aos métodos convencionais de isolamento e identificação bacteriana baseados em cultura para confirmação e validação dos resultados (VARGAS et al., 1999; CHIU et al., 2004; SONG et al., 2005; SHELTON et al., 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a ocorrência e distribuição de linhagens de *Escherichia coli* comensais e diarreiogências na microbiota fecal de crianças apresentando ou não manifestação clínica de diarreia aguda em Juiz de Fora e seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar, por provas bioquímico-fisiológicas e por biologia molecular, linhagens bacterianas de *Escherichia coli* de espécimes fecais obtidos de crianças com e sem manifestação clínica de doença diarreica em Juiz de Fora, MG;
- Comparar a identificação das linhagens bacterianas de *Escherichia coli* por método bioquímico-fisiológico e por método molecular;
- Identificar linhagens patogênicas pela detecção de genes associados aos fatores de virulência nas amostras de *Escherichia coli* obtidas de espécimes fecais de crianças com e sem manifestação clínica de doença diarreica;
- Determinar o perfil de susceptibilidade a drogas de interesse clínico-microbiológico das linhagens bacterianas de *Escherichia coli* isoladas e identificadas.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Espécimes clínicos:

Foram avaliadas 141 amostras fecais provenientes de crianças apresentando (n=84) ou não (n=57) doença diarréica de 0 a 5 anos de idade, as amostras diarréicas foram fornecidas por consultórios médicos pediátricos e as amostras sem diarréia de creches e escolas da cidade de Juiz de Fora, MG, durante o período de maio de 2007 a dezembro de 2008 e encaminhadas ao Laboratório de Fisiologia Bacteriana e Biologia Molecular do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, vinculadas ao projeto “*Investigação epidemiológica de patógenos virais e bacterianos associados a manifestações clínicas no trato gastrintestinal em crianças e adultos na Zona da Mata Mineira*”. As amostras foram codificadas para preservar o anonimato dos doadores cujos responsáveis apresentaram consentimento pela leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo B) no ato da coleta. Além disso, foi aplicado um questionário para coleta de dados epidemiológicos pertinentes à pesquisa (Anexo C). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da UFJF (parecer CEP/UFJF 281/2006 – Anexo A).

Os critérios de exclusão deste trabalho foram crianças na faixa etária superior a 5 anos de idade, crianças de 0 a 5 anos que haviam realizado tratamento com antimicrobianos ou que tenha sido submetida à internação nos últimos 30 dias.

As fezes, *in natura*, foram coletadas em frascos descartáveis esterilizados contendo solução salina glicerinada tamponada pré-reduzida (NaCl 0,25%, Glicerina 10%, L-cisteína 0,1%, ágar 1%) e encaminhadas ao Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do ICB/UFJF.

4.2 Isolamento e identificação bioquímica das linhagens bacterianas a partir dos espécimes fecais humanos:

Para o isolamento e identificação das linhagens de *Escherichia coli*, foi utilizado o meio de cultura Eosina Azul de Metileno (EMB). Após diluição seriada das fezes até 10^{-6} e semeadura no meio EMB, as placas foram incubadas em aerobiose por 24-48hs, a $35,5^{\circ}\text{C}$. Colônias sugestivas (pelo menos 2 macroscopicamente semelhantes) lactose positivas ou lactose negativas, foram submetidas à identificação presuntiva por métodos bioquímico-fisiológicos convencionais, após obtenção de culturas puras (Figura 1).

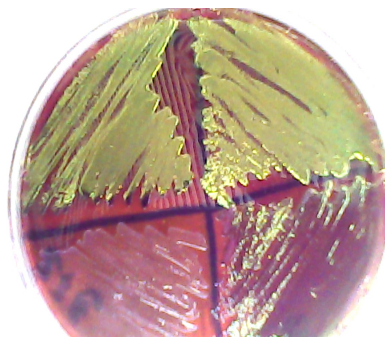


FIGURA 1 - Aspecto característico do crescimento de colônias de enterobactérias em ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), evidenciando colônias lactose positivas (verde metálico ou rosa escuro) e lactose negativas (transparentes a rosa claro).

A triagem das colônias foi realizada utilizando o meio de Rugai modificado por Pessoa e Silva (IAL) (Figura 2). Este meio é utilizado para identificar as principais espécies de enterobactérias, e fornece oito provas bioquímicas: indol, L-triptofano, sacarose, glicose, glicose com produção de gás, uréia, produção de H_2S e lisina, além da prova da motilidade (PESSOA & SILVA, 1974; OPLUSTIL et al., 2004). Quando necessário, foi utilizado o teste do citrato, como prova bioquímica complementar (HOLDEMAN et al., 1977).

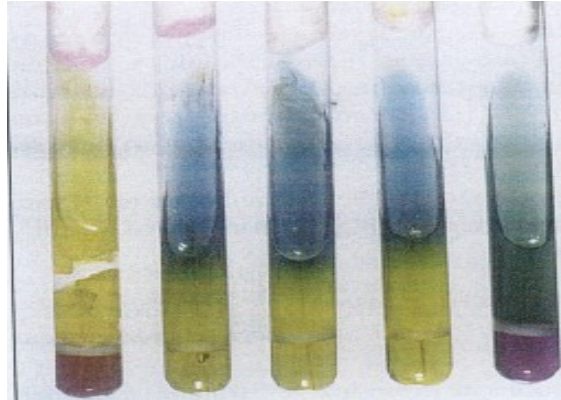


FIGURA 2: Meio IAL para identificação presuntiva de microrganismos da Família *Enterobacteriaceae*.

As colônias bacterianas isoladas foram submetidas à avaliação morfotintorial através de esfregaços corados pelo Método de Gram, evidenciando-se a característica típica de bastonetes Gram negativo (Figura 3).

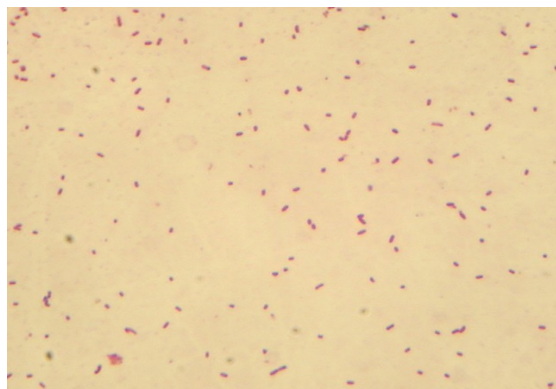


FIGURA 3 - Aspecto morfotintorial de esfregaço de cultura microbiana corado pelo método de Gram evidenciando as características morfológicas de linhagens presuntivamente identificadas como *Escherichia coli*. Aumento: 1000X

As colônias identificadas presuntivamente no meio IAL como *E. coli* foram criopreservadas em meio de congelamento, acrescido de glicerol a 10% e armazenadas em freezer a -20°C , para posterior realização da identificação dos patótipos entéricos, por biologia molecular.

4.3 Extração de DNA genômico, confirmação da identificação da espécie *E. coli* e detecção dos patótipos de *E. coli*:

A extração do DNA genômico das amostras bacterianas isoladas foi realizada de acordo com metodologia já estabelecida (ARANDA et al., 2004; CHOTÁR et al., 2006), que consiste na fervura em banho-maria, durante 15 minutos, a partir de 1ml de suspensão das células bacterianas em água ultra pura. Os tubos foram centrifugados por 10 min a 14.000 rpm em centrífuga de mesa e o sobrenadante foi coletado e estocado em freezer a -20°C , para posteriormente ser utilizado como DNA molde em reações em cadeia da polimerase (PCR).

A identificação molecular de *E. coli* foi realizada a partir da amplificação dos genes codificadores para o RNA ribossomal 16S, utilizando os seguintes oligoiniciadores: ECOLI 1 (5'- GCTTGACACTGAACATTGAG-3') e ECOLI 2 (5'- GCACTTATCTCTCTTCCGCATT-3'), descritos por Chotár e colaboradores, 2006. As reações foram feitas em um volume final de 25 μL , contendo 25 μM dos iniciadores ECOLI 1 e ECOLI 2, 2 μL do DNA molde e 12,5 μL de PCR Master Mix® (Promega Corporation, Madison, WI, USA), contendo Taq DNA polimerase, dNTPs, MgCl_2 e tampões em uma concentração ótima para eficiente amplificação do DNA. As condições de amplificação da reação foram: desnaturação inicial a 96°C por 5min, seguida de 30 ciclos de 96°C por 1min, 55°C por 1min, 72°C , por 2 min, e extensão final de 72°C por 8min. Como controle positivo das reações de PCR, foi utilizado a amostra de referência *E. coli* ATCC 25922. As reações foram realizadas em duplicata, em termociclador automatizado (Techne® TC-412 Thermal Cycler, Southam Warwickshire, UK).

Para pesquisa dos patótipos entéricos de *E. coli* foram realizados ensaios de PCR Multiplex. Os oligoiniciadores utilizados, o tamanho dos fragmentos gerados e as concentrações utilizadas estão listados na Tabela 1, segundo metodologia já estabelecida na literatura (ARANDA et al., 2004).

O primeiro ensaio discriminou as linhagens de EPEC e EAEC, baseando-se na pesquisa dos genes *eae*, *bfpA* e no produto do par de iniciadores CVD432. As reações foram feitas em um volume final de 25 μL , contendo os oligoiniciadores

eae1, *eae2*; BFP1, BFP2; e EAEC1, EAEC2, 5µL do DNA molde e 12,5µL de PCR Master Mix® (Promega Corporation, Madison, WI, USA), contendo Taq DNA polimerase, dNTPs, MgCl₂ e tampões em uma concentração ótima para eficiente amplificação do DNA. As condições de amplificação da reação foram: desnaturação inicial de 50°C, 2 min; 95°C, 5 min, seguido de 40 ciclos de 95°C, 40 s; 58°C, 1 min; 72°C, 2 min e extensão final de 72°C, 7 min. As reações de PCR foram realizadas em duplicata, em termociclador automatizado (Techne® TC-412 Thermal Cycler).

O segundo ensaio discriminou as linhagens ETEC, STEC e EIEC/*Shigella*. As reações foram feitas em um volume final de 25µL, contendo os oligoiniciadores LTf, LTr; STf, STr; IpaH1, IpaH2; Stx1f, Stx1r; e Stx2f, Stx2r, 5µL do DNA molde e 12,5µL de PCR Master Mix® (Promega Corporation, Madison, WI, USA), contendo Taq DNA polimerase, dNTPs, MgCl₂ e tampões em uma concentração ótima para eficiente amplificação do DNA. As condições de amplificação da reação foram: desnaturação inicial de 50°C, 2 min; 95°C, 5 min; seguido de 40 ciclos de 95°C, 45 s; 50°C, 1 min; 72°C, 1 min e extensão final de 72°C, 7 min. As reações de PCR foram realizadas em duplicata, em termociclador automatizado (Techne® TC-412 Thermal Cycler).

Como controle positivo das reações de PCR, foi utilizado a amostra de referência *E. coli* ATCC 25922, além de amostras de referência dos patótipos de *E. coli*: EPEC CDC O86:H35; EHEC CDC EDL-933 e EIEC CDC EDL-1284. Os patótipos de *E. coli* foram obtidos do INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde), da Fundação Osvaldo Cruz – Rio de Janeiro (FIOCRUZ/RJ).

TABELA 1 - Oligoiniciadores utilizados neste estudo

Nome	Oligoiniciadores (5` para 3`)	Gene	Tamanho do fragmento (pb)	Oligoiniciadores concentração (pmol)
eae 1 eae 2	CTGAACGGCGATTACGCGAA CCAGACGATACGATCCAG	<i>eae</i>	917	10
BFP1 BFP2	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAAACCTGGTA	<i>bfpA</i>	326	10
EAEC1 EAEC2	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	CVD432	630	5
LTf LTr	GGCGACAGATTATACCGTGC CGGTCTCTATATTCCCTGTT	LT gene	450	5
STF STr	ATTTTTMTTCTGTATTRTCTT CACCCGGTACARGCAGGATT	ST gene	190	6.47
lpaH1 lpaH2	G TTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	<i>lpaH</i>	600	10
Stx1f Stx1r	ATAAATCGCCATTTCGTTGACTAC AGAACGCCCACTGAGATCATC	<i>stx1</i>	180	3.88
Stx2f Stx2r	G GCACTGTCTGAAACTGCTCC TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	<i>stx2</i>	255	2.5

Os amplicons obtidos em cada reação foram visualizados em gel de agarose 1,5% ou 2% em TBE 1X, após eletroforese em voltagem constante de 120V, por aproximadamente 1h e 30 min. Os géis foram analisados em transluminador de luz ultravioleta (GE Healthcare, United Kingdom), após tratamento com brometo de etídio (Promega Corporation). Após documentação, foram avaliados os perfis de amplificação gênica, de acordo com o tamanho esperado dos fragmentos para cada grupo de reações. Como padrão de peso molecular, foi utilizado o marcador de 100bp ou 1Kb DNA ladder (Life Technologies Inc., Gathersburg, MD, EUA).

4.4 Avaliação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas

Foi determinado o perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas pelo método de disco-difusão, segundo recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2007), utilizando-se discos impregnados com a droga (Laborclin Produtos para Laboratório, Paraná, Brasil). Foram utilizadas as seguintes drogas: amicacina, ampicilina, ampicilina-sulbactam, cefalotina, ceftazidima, ceftriaxona, levofloxacina, gentamicina, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprina, imipenem, piperacilina-tazobactam.

As linhagens bacterianas foram inoculadas em ágar TSA e incubadas a 37°C, por 24 horas em estufa bacteriológica. Após crescimento bacteriano, com auxílio de uma alça de platina, foram obtidas suspensões bacterianas em solução salina estéril (NaCl 0,9%), com turbidez ajustada a 0,5 na escala McFarland ($\sim 10^8$ UFC/ml). Com o auxílio de um *swab* estéril, foi realizado inóculo por esgotamento na superfície de uma placa de ágar Mueller-Hinton (HiMedia Laboratories, Mumbai, Índia) de forma a obter um crescimento confluyente. Os discos foram depositados sobre o meio e a leitura dos halos de inibição foi realizada após 18 horas de incubação a 35°C, determinando-se o diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano e comparando à tabela de referência. Para controle de qualidade, foi incluída a amostra de referência *E. coli* ATCC 25922.

5 RESULTADOS

5.1 Identificação de *E. coli* e caracterização dos patótipos

Foram incluídas, nesta investigação, 141 amostras fecais de crianças de 0 até 5 anos de idade, apresentando ou não manifestações clínicas de doença diarreica, provenientes da comunidade, em Juiz de Fora/MG. Os espécimes fecais foram recebidos e processados imediatamente, no período de maio de 2007 até dezembro de 2008, distribuídas aleatoriamente durante as diferentes estações do ano. As características da população estudada encontram-se na TABELA 2.

TABELA 2 - Características da população amostrada.

Grupo de estudo	Com diarreia		Sem diarreia		Total	
	n	%	n	%	N	%
Sexo masculino	45	53,6	36	63,1	81	57,4
Sexo feminino	39	46,4	21	36,9	60	42,6
Idade média (meses)	24,7 meses		25,8 meses		25,3 meses	

Um total de 56,2% das crianças apresentando manifestação clínica de diarreia e 56,6% das crianças do grupo controle encontrava-se na faixa etária de até 24 meses (FIGURA 4). Aproximadamente 52% das amostras foram obtidas nos meses chuvosos de dezembro a maio, entre elas, 50% de crianças com manifestação clínica de diarreia e 55% de crianças sem manifestação clínica de diarreia (grupo controle). Em relação ao saneamento básico, 100% das famílias dispunham de água tratada em seus domicílios e existência de fossa séptica ou rede de esgotos.

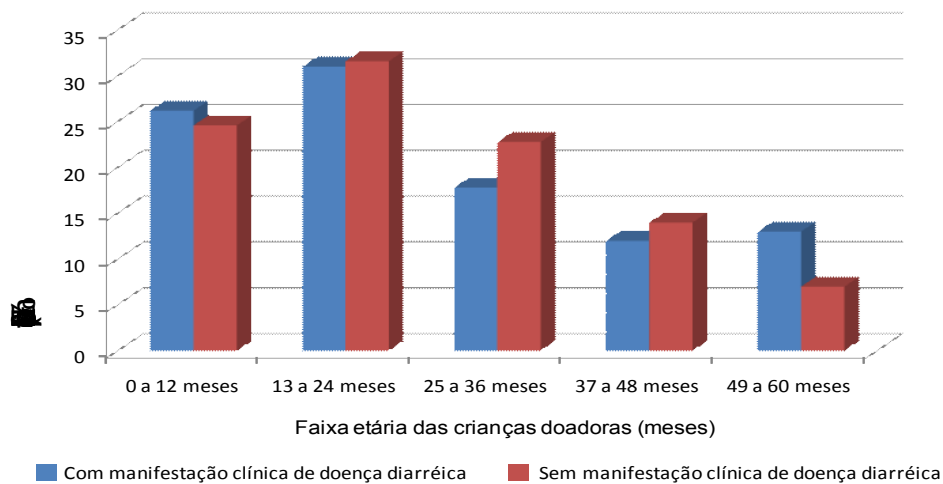


FIGURA 4 – Distribuição por idade do grupo de crianças cujas fezes foram amostradas neste estudo, após assinatura do termo de consentimento pelos responsáveis.

Representantes bacterianos da espécie *Escherichia coli* foram detectados em 68 (80,9%) espécimes fecais provenientes de crianças apresentando diarreia aguda, enquanto que estes microrganismos foram detectados em 42 (73,7%) das amostras provenientes de crianças sem manifestação clínica de diarreia (grupo controle). Foram excluídas do estudo todas as linhagens bacterianas não identificadas como *E. coli*. Apesar da detecção bacteriana em espécimes fecais de crianças em todas as faixas etárias avaliadas, observou-se frequência de recuperação aumentada (40 e 46%) na faixa etária entre 13 a 24 meses, nos dois grupos amostrados (FIGURA 5).

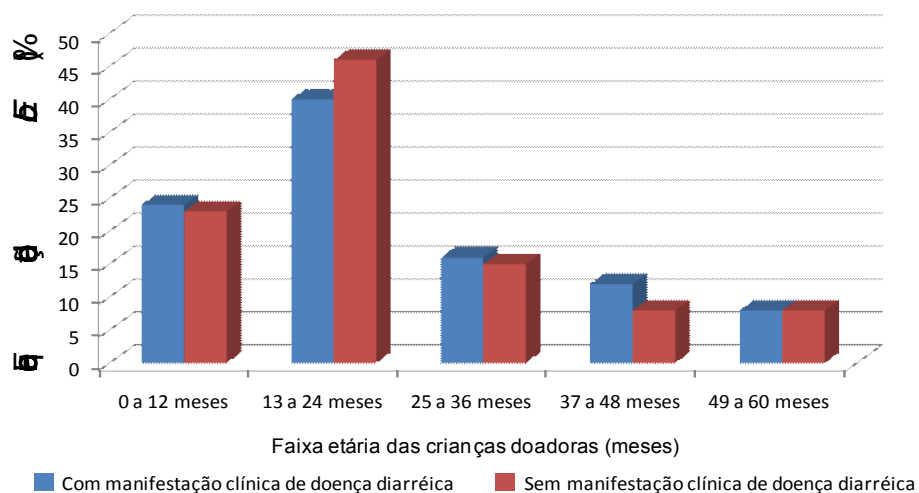


FIGURA 5: Relação entre faixa etária e distribuição de *Escherichia coli* nos grupos de crianças com e sem manifestação clínica de diarreia, isolados de amostras fecais de crianças de 0-5 anos em Juiz de Fora, MG

Considerando-se todo o grupo amostral, foram isoladas e identificadas presuntivamente 226 linhagens bacterianas, a confirmação da identificação bioquímica por metodologia molecular mostrou que o segmento de DNA codificador da região de RNAr 16S de *E. coli* foi amplificado em 220 linhagens (FIGURA 6), 136 recuperadas de fezes diarréicas e 84 de fezes de crianças sem manifestações clínicas de diarréia. Assim, considerando-se a metodologia molecular como mais sensível e acurada, foi observada uma correlação de 97,3% entre as duas metodologias.

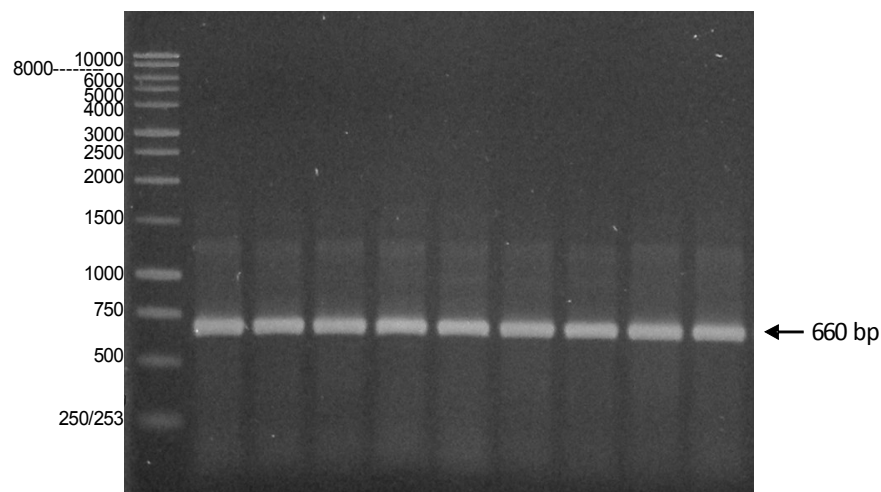


FIGURA 6: Eletroforegrama representativo da identificação específica (RNA Ribossomal 16S) de *E. coli* por PCR das linhagens caracterizadas presuntivamente por métodos bioquímico-fisiológicos. Fragmento esperado: 660 bp. Padrão de peso molecular: 1 Kb DNA ladder.

Da pesquisa de marcadores genéticos de virulência bacteriana associados às linhagens diarreagênicas ou patótipos de *E. coli*, foi verificada a ocorrência destes microrganismos em 36,8% dos espécimes fecais provenientes de crianças apresentando manifestação clínica de diarréia (grupo CD). Entre as amostras fecais das crianças do grupo controle (SD), observou-se a ocorrência de linhagens diarreagênicas em 30,9% dos espécimes fecais. Na análise dos experimentos de identificação dos patótipos foram considerados os seguintes genótipos, de acordo com os pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados: *E. coli* enteroagregativa (EAEC), linhagens CVD432⁺ (16,2% no grupo CD e 30,9% no grupo SD); *E. coli*

enteropatogênica (EPEC), linhagens *eae*⁺ *bfpA*⁻ (10,3% no grupo CD); *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), linhagens *stx1*⁻ *stx2*⁺ ou *stx1*⁺ *stx2*⁻ (7,4% no grupo CD); *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), linhagens *elt est*⁺ (2,9% no grupo CD) (TABELA 3, FIGURA 7).

Tabela 3 - Distribuição percentual das linhagens de *Escherichia coli* isoladas de crianças com e sem manifestação de doença diarreica.

Linhagem bacteriana	CD % (n=136)	SD (n=84)
<i>E. coli</i> não patogênica	63,2 (n=86)	69,1 (n=58)
<i>E. coli</i> enteroagregativa	16,2 (n=22)	30,9 (n=26)
<i>E. coli</i> enteropatogênica	10,3 (n=14)	-
<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga	7,4 (n=10)	-
<i>E. coli</i> enterotoxigênica	2,9 (n=04)	-

CD - Espécimes fecais de crianças com manifestação clínica de doença diarreica;
SD - Espécimes fecais de crianças sem manifestação clínica de doença diarreica

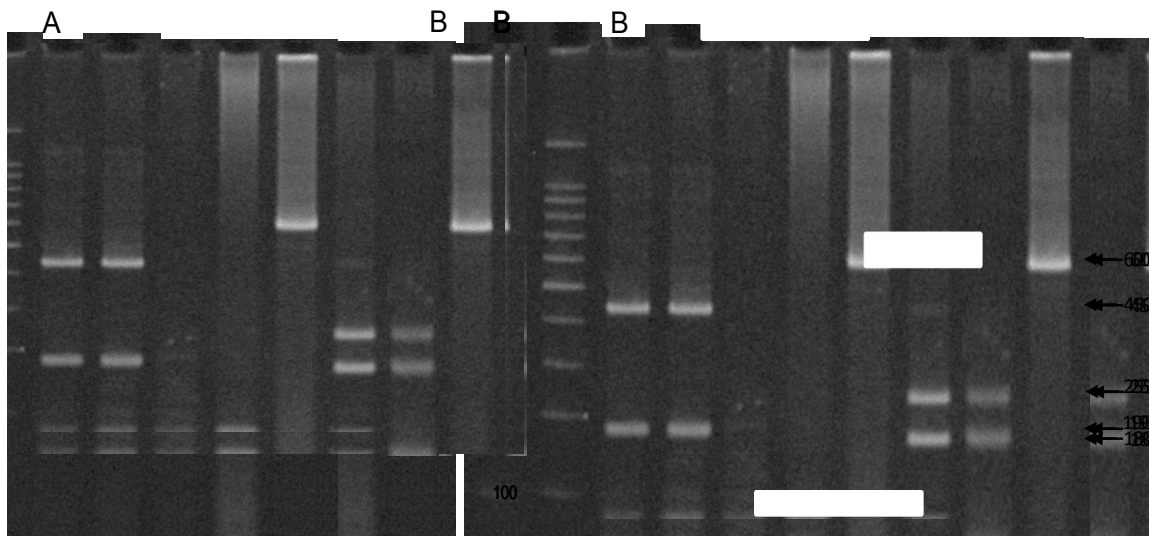


FIGURA 7- Eletroforegrama representativo da identificação dos patótipos *Escherichia coli* por PCR Multiplex entre os microrganismos isolados e identificados. A – Primeira reação (917/326bp, EPEC típica; 917bp EPEC atípica; 630bp, EAEC). B – Segunda reação (180/255pb, STEC; 190/450bp, ETEC). Padrão de peso molecular: 100bp DNA ladder.

Entre os patótipos detectados em espécimes fecais provenientes de crianças apresentando manifestação clínica de doença diarreica aguda, sendo o patótipo

EAEC foi o mais freqüente. Linhagens de *E. coli* enteroinvasivas (EIEC) não foram identificadas. O patotipo EAEC não foi observado na faixa etária de 25 a 36 meses, considerando-se espécimes fecais provenientes de crianças apresentando manifestação clínica de doença diarréica aguda. ETEC só foi observada na faixa etária de 24 a 36 meses, EPEC foi encontrada na faixa etária de zero a 36 meses e STEC foi igualmente distribuída no grupo amostrado. Considerando a ocorrência de linhagens de *E. coli* diarreagênicas nos espécimes fecais das crianças sem manifestação clínica da doença diarréica (grupo controle), EAEC foi o único patotipo encontrado, distribuído em todas as faixas etárias, com maior freqüência entre 13 e 24 meses (TABELA 4).

TABELA 4 - Distribuição (%) dos patotipos de *Escherichia coli* isolados de crianças com e sem manifestação de doença diarréica em relação à sua faixa etária.

Patotipo de <i>E. coli</i>	0 a 12 meses		13 a 24 meses		25 a 36 meses		37 a 48 meses		49 a 60 meses	
	CD	SD	CD	SD	CD	SD	CD	SD	CD	SD
EAEC	18,2	23,1	54,5	46,1	-	15,4	18,2	7,7	9,1	7,7
EPEC	42,9	-	42,9	-	14,2	-	-	-	-	-
STEC	20	-	20	-	20	-	20	-	20	-
ETEC	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-

CD - Espécimes fecais de crianças com manifestação clínica de doença diarréica;
SD - Espécimes fecais de crianças sem manifestação clínica de doença diarréica

5.2 Avaliação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas

A avaliação do perfil de susceptibilidade das linhagens isoladas e identificadas, representativas da população bacteriana amostrada em todos os espécimes fecais mostrou que, considerando-se fezes diarréicas, 39,7% foram resistentes à tetraciclina, 30,9% à ampicilina e 8,8% à associação ampicilina/sulbactam, 30,9% ao sulfametoxazol/trimetropin, 5,9% a cefalotina e 3% ao levofloxacin. Resistência intermediária foi observada contra a ampicilina/sulbactam (5,9%), cefalotina (4,4%), tetraciclina (3%) e amicacina, ampicilina e gentamicina (1,5%). Os antimicrobianos mais eficazes foram

ceftazidima, ceftriaxona, imipenem e piperacilina/tazobactan, para os quais não foi verificada resistência bacteriana.

Das linhagens representativas de *E. coli* isoladas de crianças sem manifestação clínica de diarreia 34,9% mostraram-se resistentes a tetraciclina, 30,2% a ampicilina e 2,3% à associação ampicilina/sulbactam, 25,6% ao sulfametoxazol/trimetropin, 4,6% a cefalotina e levofloxacina. Resistência intermediária foi observada contra cefalotina (9,3%) e ampicilina, ampicilina/sulbactam e tetraciclina (2,3%). Os antimicrobianos mais eficazes foram amicacina, ceftazidima, ceftriaxona, gentamicina, imipenem e piperacilina/tazobactan, para os quais não foi verificada resistência bacteriana (TABELA 5).

TABELA 5 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de amostras de *Escherichia coli* isoladas de espécimes fecais de crianças de 0-5 anos, com diarreia (n = 68) e sem diarreia (n= 43) em Juiz de Fora, MG.

Drogas testadas	Com diarreia			Sem diarreia		
	R(%)	I (%)	S(%)	R(%)	I(%)	S(%)
Amicacina	-	1,5	98,5	-	-	100
Ampicilina	30,9	1,5	67,6	30,2	2,3	67,5
Ampicilina/Sulbactan	8,8	5,9	85,3	2,3	2,3	95,4
Cefalotina	5,9	4,4	89,7	4,6	9,3	86,1
Ceftazidima	-	-	100	-	-	100
Ceftriaxona	-	-	100	-	-	100
Levofloxacina	3	-	97	4,6	-	95,4
Gentamicina	-	1,5	98,5	-	-	100
Tetraciclina	39,7	3	57,3	34,9	2,3	62,8
Sulfametoxazol/trimetropin	30,9	-	69,1	25,6	-	74,4
Imipenem	-	-	100	-	-	100
Piperacilina/Tazobactan	-	-	100	-	-	100

Avaliando-se apenas as linhagens de *E. coli* diarreiogênicas isoladas representativas da população bacteriana total amostrada, observou-se grande heterogeneidade nos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos:

- EAEC: (i) 63,6% das linhagens recuperadas de espécimes fecais diarréicos mostraram-se resistentes a ampicilina, 45,5% à combinação sulfametoxazol/trimetropim e 36,4% à tetraciclina e à combinação ampicilina/sulbactam. Resistência intermediária foi observada para o antimicrobiano cefalotina e à combinação ampicilina/sulbactam (9,1%). Não foi observada resistência bacteriana para os antimicrobianos amicacina, ceftazidima, ceftriaxona, levofloxacin, gentamicina, imipenem e a combinação piperacilina/tazobactam. (ii) com relação aos isolados de EAEC de crianças do grupo controle (sem diarréia), 38,5% das linhagens mostraram-se resistentes a tetraciclina, 23,1% a ampicilina e á combinação sulfametoxazol/trimetropin e 15,5% a levofloxacin. Resistência intermediária foi observada para a tetraciclina, ampicilina e a combinação ampicilina/sulbactam (7,7%). Os antimicrobianos mais eficazes foram amicacina, ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefalotina, ceftazidima, ceftriaxona, gentamicina, imipenem e piperacilina/tazobactan, para os quais não foi verificada resistência bacteriana.
- EPEC: 42,8% mostraram-se resistentes a tetraciclina e 28,6% à combinação sulfametoxazol/trimetropin. Resistência intermediária foi observada para os antimicrobianos amicacina, ampicilina e cefalotina (14,3%). Não foi observada resistência bacteriana para os antimicrobianos ampicilina/sulbactam, ceftazidima, ceftriaxona, levofloxacin, gentamicina, imipenem e piperacilina/tazobactan, para os quais não foi verificada resistência bacteriana.
- STEC: 40% mostraram-se resistentes à tetraciclina e à combinação sulfametoxazol/trimetropin, 20% mostraram-se resistentes a ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefalotina e levofloxacin. Resistência intermediária foi observada contra a gentamicina (20%). Os antimicrobianos mais eficazes foram amicacina, ceftazidima, ceftriaxona, imipenem e piperacilina/tazobactan, para os quais não foi verificada resistência bacteriana.
- ETEC: 50% mostraram-se resistentes a tetraciclina e à combinação sulfametoxazol/trimetropin. Os antimicrobianos mais eficazes foram amicacina, ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefalotina, ceftazidima, ceftriaxona, levofloxacin, gentamicina, imipenem e piperacilina/tazobactan, para os quais não foi verificada resistência bacteriana. Não foi observada resistência intermediária a nenhum antimicrobiano nestre grupo bacteriano.

Das linhagens de *E. coli* isoladas de crianças sem manifestação clínica de diarreia, 50% foram susceptíveis a todas as drogas testadas, enquanto que 23,2% foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. Resistência simultânea a dois antimicrobianos foi observada em 6,8% dos microrganismos, sendo também observado resistência a três (3,4%), quatro (13,2%) e cinco drogas (3,4%). Entre os patótipos de EAEC isolados de crianças sem manifestação clínica de diarreia, 38,4% foram susceptíveis a todas as drogas testadas, enquanto que 23,1% foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. Resistência simultânea a dois antimicrobianos foi observada em 23,1% dos microrganismos, sendo também observado resistência a três (7,7%) e quatro drogas (7,7%) (TABELA 6).

TABELA 6 - Distribuição dos fenótipos de resistência a um ou mais antimicrobianos entre as amostras de *Escherichia coli* isoladas de crianças sem manifestação clínica de diarreia na cidade de Juiz de Fora, MG.

Linhagem bacteriana	Resistência	Susceptibilidade a todas as drogas
EAEC (n=13)	AMP (n=1, 7,7%) TET (n=2, 15,4%) TET/STX (n=2, 15,4%) AMP/LEV (n=1, 7,7%) AMP/AMS/TET (n=1, 7,7%) AMP/TET/STX/LEV (n=1, 7,7%)	n=5, 38,4%
<i>E. coli</i> não patogênica (n= 30)	AMP (n=3, 10%) TET (n=4, 13,2%) TET/STX (n=1, 3,4%) AMP/STX (n=1, 3,4%) AMP/CEF/STX (n=1, 3,4%) AMP/CEF/TET/STX (n=4, 13,2%) AMP/AMS/CEF/TET/STX (n=1, 3,4%)	n=15, 50%

AMP (ampicilina); TET (tetraciclina); STX (sulfametoxazol/trimetropin); AMS (ampicilina-sulbactam); CFL (cefalotina); GEN (gentamicina); LEV (levofloxacin)

Das linhagens de *E. coli* não patogênicas isoladas de crianças com manifestação clínica de diarreia, 37,2% foram susceptíveis a todas as drogas testadas, enquanto que 37,3% foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. Resistência simultânea a dois antimicrobianos foi observada em 4,6% dos

microrganismos, sendo também observado resistência a três (9,3%), quatro (7,0%), cinco (2,3%) e seis drogas (2,3%).

Entre os patótipos de EAEC isolados de crianças com manifestação clínica de diarreia, 18,1% foram susceptíveis a todas as drogas testadas, enquanto que 9,1% foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. Resistência simultânea a dois antimicrobianos foi observada em 27,3% dos microrganismos, sendo também observado resistência a três drogas (36,4%).

Entre os patótipos de EPEC isolados de crianças com manifestação clínica de diarreia, 28,6% foram susceptíveis a todas as drogas testadas, enquanto que 42,9% foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. Resistência simultânea a quatro antimicrobianos foi observada em 14,3% dos microrganismos.

Entre os patótipos de STEC isolados de crianças com manifestação clínica de diarreia, 60% foram susceptíveis a todas as drogas testadas. Resistência simultânea a dois antimicrobianos foi observada em 20% dos microrganismos, sendo também observado resistência a sete drogas (20%).

Das linhagens de ETEC isolados de crianças com manifestação clínica de diarreia, 50% foram susceptíveis a todas as drogas testadas, enquanto que 50% foram resistentes a duas drogas testadas (TABELA 7).

TABELA 7 - Distribuição dos fenótipos de resistência a um ou mais antimicrobianos entre as amostras de *Escherichia coli* isoladas de crianças com manifestação clínica de diarreia (n = 68) na cidade de Juiz de Fora, MG.

Linagem bacteriana	Resistência	Susceptibilidade a todas as drogas
EAEC (n=11)	AMP (n=1, 9,1%) TET (n=1, 9,1%) TET/STX (n=1, 9,1%) AMP/AMS (n=1, 9,1%) AMP/STX (n=1, 9,1%) AMP/AMS/TET (n=1, 9,1%) AMP/AMS/STX (n=1, 9,1%) AMP/CFL/STX (n=1, 9,1%) AMP/TET/STX (n=1, 9,1%)	n=2, 18,1%
EPEC (n=7)	AMI (n=1, 14,3%) TET (n=2, 28,5%) STX (n=1, 14,3%) AMP/CFL/TET/STX (n=1, 14,3%)	n=2, 28,6%
STEC (n=5)	TET/STX (n=1, 20%) TET/STX/AMP/AMS/CFL/GEN/LEV (n=1, 20%)	n=3, 60%
ETEC (n=2)	TET/STX (n=1, 50%)	n=1, 50%
<i>E.coli</i> não patogênica (n= 43)	AMP (n=3, 6,9%) TET (n=11, 25,7%) STX (n=2, 4,7%) TET/STX (n=1, 2,3%) TET/AMP (n=1, 2,3%) AMP/TET/STX (n=2, 4,7%) AMP/AMS/CEF (n=1, 2,3%) AMP/AMS/STX (n=1, 2,3%) AMP/TET/STX/CFL (n=1, 2,3%) AMP/AMS/STX/TET (n=2, 4,7%) AMP/AMS/STX/TET/CFL (n=1, 2,3%) AMP/AMS/STX/TET/CFL/LEV (n=1, 2,3%)	n=16, 37,2%

AMP (ampicilina); TET (tetraciclina); STX (sulfametoxazol/trimetropin); AMS (ampicilina-sulbactam); CFL (cefalotina); GEN (gentamicina); LEV (levofloxacina)

6 DISCUSSÃO

6.1 Doença diarréica infantil.

A doença diarréica é considerada problema de saúde mundial, especialmente em países em desenvolvimento, onde é responsável por cerca de 2,5 milhões de mortes infantis por ano, com uma taxa de mortalidade de 4,9 para 1000 crianças e uma incidência de 3,2 episódios por crianças, abaixo de cinco anos, por ano (KOSEK et al., 2003, PULSENET USA, 2004). A morbidade por diarréia é um indicador utilizado na avaliação do nível de saúde de uma população e varia de acordo com as diferentes regiões, localidades e grupos populacionais. Essas variações regionais estão intimamente relacionadas com a desigualdade de vida de seus habitantes referentes à renda familiar, serviços públicos essenciais e a assistência a saúde e a educação. A diarréia está associada à patógenos entéricos, que incluem vírus, bactérias e parasitas. Rotavírus e as *Escherichia coli* enteropatogênicas são consideradas os agentes etiológicos mais comuns, e causam doenças diarréicas em países em desenvolvimento (DAVIDSON et al., 2002; NGUYEN et al., 2005; JAFARI et al., 2008; PATRZALEK , 2008, KIM et al., 2008).

Além das condições higiene sanitárias associadas à transmissão e persistência da doença diarréica em populações susceptíveis, após o nascimento, microrganismos podem ser adquiridos de fontes ambientais, contato oral ou transferência materna através da pele, que podem ser transferidos às crianças por vários processos, como aleitamento materno (aproximadamente 10^9 células microbianas por litro de leite em mães saudáveis), beijo, carinho, etc. Além disso, as crianças estão expostas a outros microrganismos, que ganham acesso ao trato gastrointestinal pela alimentação (THOMPSON-CHAGOYÁN et al., 2007)

Em nosso estudo, avaliou-se a microbiota fecal de crianças entre 0 e 5 anos de idade com apresentação de sintomas clínicos de doenças diarréica e crianças na mesma faixa etária sem manifestações clínicas da doença na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, considerando-se a ocorrência de representantes das linhagens

diarreio gênicas de *E. coli*. A obtenção das amostras fecais foi distribuída homogeneamente durante todo o ano, nos meses secos e chuvosos.

De acordo com a literatura, a maioria dos casos de diarreia associados às bactérias ocorre nos meses quentes e chuvosos, provavelmente porque a temperatura mais elevada favorece a multiplicação bacteriana no ambiente e a disseminação do agente etiológico é favorecida pela chuva, contaminando águas e alimentos (PODEWILS et al., 2004; QADRI et al., 2005). Em relação às condições sócio-econômicas das famílias das crianças com diarreia e sem diarreia, a renda familiar não foi avaliada, porém as condições sanitárias foram favoráveis em todas as moradias, com saneamento básico satisfatório, água tratada e sistema de esgoto fechado.

6.2 Identificação de linhagens comensais e enteropatogênicas de *E. coli*

O trato gastrintestinal humano alberga uma grande variedade de bactérias, mais de 700 espécies, sendo o total de células microbianas neste sítio anatômico superior ao número de células no corpo humano (TURRONI et al., 2008). A grande maioria destas bactérias é importante para saúde humana produzindo e degradando nutrientes e substâncias nocivas ao hospedeiro, prevenindo a colonização por microrganismos patogênicos e participando na modulação do sistema imunológico (THOMPSON-CHAGOYÁN et al., 2007; BALAMURUGAN et al., 2008).

O ecossistema intestinal pode ser definido como um órgão microbiano dentro do organismo do hospedeiro que atua em uma associação dinâmica e intensa dependente de fatores microbianos, do hospedeiro e da dieta. O estudo deste complexo ecossistema tem sido baseado em métodos microbiológicos clássicos que envolvem cultivo microbiano em meios de cultura específicos e técnicas bioquímicas e fisiológicas de identificação. Entretanto estas técnicas não permitem a recuperação de todos os grupos microbianos (BOTTARI et al., 2006).

Os métodos clássicos de identificação realizados inicialmente neste estudo, como o isolamento em meio seletivo e técnicas de coloração de Gram, são tradicionalmente bem estabelecidos nos manuais de bacteriologia clínica para

isolamento e identificação de representantes da família *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia coli*. O diagnóstico direto baseado no isolamento e cultivo microbiano permite o uso dos isolados em investigações posteriores com grande importância clínico-científica como a determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e estudos epidemiológicos (VARGAS et al., 2005)

Alguns sistemas comerciais automatizados e semi-automatizados permitem fazer a identificação das diferentes espécies de enterobactérias utilizando numerosas provas bioquímicas. De acordo com o Manual de Microbiologia Clínica para Controle de Infecção em Serviços de Saúde, publicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004), os sistemas mais frequentemente utilizados são: API, Vitek e Microscan. Estes métodos são caros e não são fundamentais para o diagnóstico dos grupos bacterianos e para uma orientação terapêutica adequada. Como alternativa aos métodos microbiológicos clássicos para identificação microbiana, testes de identificação rápida têm sido utilizados. Estes métodos são baseados em testes sorológicos ou de biologia molecular (ZHANG & WEINTRAUB, 1997).

O desenvolvimento de métodos moleculares tem permitido alternativas para investigação de comunidades microbianas, como a microbiota intestinal humana e de outros animais, sem a necessidade de cultivo microbiológico. Assim, novas técnicas tem sido propostas para diagnóstico de microrganismos entéricos e reclassificação de grupos microbianos previamente identificados em espécies e gêneros já estabelecidos (FURRIE, 2006).

Entre as técnicas moleculares independentes de cultivo microbiológico para detecção e identificação bacteriana destacam-se métodos relacionados ao desenvolvimento de sondas e oligonucleotídeos iniciadores homólogos a regiões de DNA que codificam RNA ribossômico microbiano ou genes codificadores para os fatores de virulência (PCR, técnicas convencionais de hibridização, FISH, microarranjos de DNA), estudo de comunidades pela associação de técnicas de PCR e eletroforese com gradientes de desnaturação (DGGE) ou temperatura (TGGE), estudos envolvendo PCR em tempo real quantitativo ou qualitativo e metagenômica (TURRONI et al., 2008).

Neste estudo, a confirmação da identificação bioquímica das linhagens bacterianas isoladas foi realizada por metodologia molecular baseada na

amplificação de segmento de DNA codificador da região do RNAr 16S de *E. coli*. Assim, considerando-se a metodologia molecular como mais sensível e acurada, foi observada uma correlação de 97,3% entre as duas metodologias. Uma alta correlação entre os testes bioquímicos e moleculares foi demonstrada por estudos realizados por Aguila e colaboradores (2006), que encontraram 94% de correlação entre as duas metodologias. Segundo estes autores, a metodologia molecular, apesar de ser mais sensível e rápida, é mais onerosa e não permite a recuperação microbiana, considerando-se os microrganismos viáveis ou não, nos processos infecciosos. Por outro lado, a identificação bioquímica de bactérias clinicamente isoladas de processos infecciosos constitui uma ferramenta fundamental para obtenção de dados epidemiológicos e possibilita realização de antibiogramas para monitoramento dos níveis de susceptibilidade aos antimicrobianos. Segundo a literatura, estes métodos permitem do ponto de vista clínico, diagnóstico simples com impacto na terapêutica (VARGAS et al., 2005).

Além disso, a pesquisa de genes relacionados aos fatores de virulência bacterianos mostrou-se eficiente para caracterização de diferentes patótipos de *E. coli* na população amostrada. Considerando-se os custos da metodologia molecular, como já mencionado, apesar da disponibilização de técnicas já padronizadas para caracterização molecular destes microrganismos (ARANDA et al., 2004), do ponto de vista clínico e de rotina microbiológica para fins de diagnóstico a detecção de patótipos de *E. coli* é, ainda, realizada por métodos imunológicos. Estes métodos incluem a observação de determinantes antigênicos por técnicas de aglutinação em látex, que são validadas clinicamente (AGUILA et al., 2006). Entretanto, segundo os autores que propõe metodologias moleculares, estes testes permitem uma discriminação mais sensível destes microrganismos do que as técnicas imunológicas (ARANDA et al., 2004; AGUILA et al., 2006).

Considerando-se a importância das doenças diarreicas na infância e que a etiologia de 20 a 50% das manifestações clínicas continua ainda sem diagnóstico, o conhecimento da população de microrganismos específicos do ecossistema intestinal poderia ajudar na compreensão da dinâmica microbiana na agressão (NGUYEN, 2005).

6.3 Pesquisa de *Escherichia coli* diarreioagênica

Algumas linhagens de *E. coli* são consideradas patógenos entéricos, e são conhecidas como diarreioagênicas. Estas bactérias são definidas pela presença de um ou mais fatores de virulência. Estes patótipos são divididos em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigenica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* com aderência difusa (DAEC) (KAPER et al., 2004). Também conhecidos como patótipos de *E. coli*, estes microrganismos têm sido implicados na etiologia da diarreia aguda em crianças, além de diarreia dos viajantes, enterocolites, infecções do trato gastrointestinal tanto em países em desenvolvimento quanto em países industrializados, especialmente nos últimos anos (NATARO et al., 1998; ROBINS-BROWNE et al., 2004; COHEN et al., 2005; QADRI et al., 2005).

Embora seja reconhecido o potencial agressor destas linhagens de *E. coli*, a pesquisa destas bactérias diarreioagênicas não é habitualmente realizada em laboratórios clínicos. Desta forma, a incidência destes patógenos em crianças menores de dois anos e a sua importância como causadores de diarreia na comunidade é desconhecida, particularmente em áreas endêmicas (LOPEZ-SAUCEDO et al., 2003; LONG et al., 2006).

Neste estudo, ao avaliar-se a distribuição dos patótipos de *E. coli* isoladas de amostras fecais de crianças com diarreia aguda, observou-se que 24% destas linhagens foram isoladas de crianças com até 1 ano de idade e 40% isoladas de crianças até 2 anos de idade. Nossos resultados corroboram os dados da literatura, demonstrando que há a participação destes microrganismos na microbiota fecal de crianças menores de 2 anos de idade apresentando sinais e sintomas clínicos de doença diarreica (TOPOVOVSKI et al., 1999; LOPEZ-SAUCEDO et al., 2003; ESTRADA-GARCIA et al., 2009; ALBERT et al., 2009).

Entretanto, apesar de a frequência de detecção de *E. coli* diarreioagência ter sido maior nos espécimes fecais provenientes de pacientes com manifestação clínica de diarreia aguda, observou-se a sua ocorrência também, na microbiota fecal das crianças que fizeram parte do grupo sem sinais e sintomas clínicos de diarreia

aguda. Nas amostras fecais destas crianças, foi detectada *E. coli* enteroagregativa, assim como nos espécimes fecais das crianças com manifestação clínica de diarreia.

6.3.1 EPEC

Os organismos mais comumente reportados como *E. coli* diarreiogênica no Brasil, em crianças de pouca idade, são linhagens de EPEC (Fagundes-Neto et al., 1996; Medeiros et al., 2001). Estes microrganismos tem sido considerados importantes patógenos relacionados à diarreia em crianças menores de dois anos de idade em países em desenvolvimento (PRERE et al., 2006; ARAÚJO et al., 2007).

Por muito tempo, o diagnóstico de EPEC foi baseado na identificação dos sorotipos O:H. Entretanto, durante as últimas duas décadas, a patogenidade foi melhor esclarecida, resultando em mudança nos métodos de diagnóstico de sorogrupos para métodos fenotípicos e genotípicos. EPEC está classificada dentro de duas sub-categorias: EPEC típica e EPEC atípica. Enquanto EPEC típica é um importante patógeno, a importância de EPEC atípica é desconhecida, despertando grande interesse na comunidade científica (AFSET et al., 2004; GOMES et al., 2004; FRANZOLIN et al., 2005; ARAUJO et al., 2007).

A classificação das amostras de EPEC como típicas e atípicas está relacionada à presença do plasmídeo EAF, que carrega o gene *bfpA*. Amostras *bfpA* positivas são denominadas EPEC típicas, e são importantes patógenos causadores de diarreia em crianças menores de dois anos, em países em desenvolvimento (NATARO & KAPER, 1998; TRABULSI et al., 2002; ARAÚJO et al., 2007; ESTRADA-GARCIA et al., 2009).

Em estudos epidemiológicos conduzidos no Brasil, as linhagens de EPEC atípicas excederam em número as linhagens de EPEC típica como agentes associados à diarreia em crianças (DULGUER et al., 2003; GOMES et al., 2004; RÉGUA-MANGIA et al., 2004; FRANZOLIN et al., 2005; ARAUJO, et al., 2007). Pesquisas desenvolvidas em vários países mostraram que linhagens de EPEC atípica tem se tornado mais frequente causa de diarreia que EPEC típica

(TRABULSI et al., 2002; COLLARES, 2005; FRANZOLIN et al., 2005) e também pode estar relacionada com diarreia persistente (HILL et al.; 1991; AFSET et al., 2003; NGUYEN et al., 2006). Esta diminuição da prevalência de EPEC típica e aumento de EPEC atípica como causa de diarreia pode estar relacionada à melhoria das condições de saneamento básico em nosso país (FRANZOLIN et al., 2005), e também é justificada pelo fato de EPEC típica ser quase exclusivamente detectada em seres humanos, e as amostras de EPEC atípicas serem detectadas também em animais domésticos (TRABULSI et al., 2002; NAKAZATO et al., 2004; de PAULA & MARIN, 2008).

Neste estudo, foi observado que 100% das linhagens identificadas como EPEC atípicas foram isoladas apenas de crianças com diarreia, representando 10,3% dos isolados de *E. coli* diarreiogênica, sendo o segundo patótipo mais isolado depois de EAEC. Como relatado anteriormente, as condições sanitárias das famílias doadoras de material fecal foram favoráveis em todas as moradias, com saneamento básico satisfatório, água tratada e sistema de esgoto fechado.

Araujo e colaboradores, em 2007, em estudo para pesquisa de patógenos em amostras de fezes de crianças abaixo de 5 anos com diarreia e sem diarreia, observaram 25% de EPEC, sendo 2% de EPEC típica e 23% de EPEC atípica, mostrando o grande aumento das linhagens atípicas em relação as linhagens típicas. Bueris e colaboradores (2007), na Bahia, encontraram resultado semelhante, reportando ocorrência de EPEC atípica (10%) em pacientes com diarreia.

6.3.2 EAEC

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é considerada um patógeno emergente no Brasil e em outros países em desenvolvimento, associado à diarreia aguda em crianças e adultos (DUTTA et al., 1999; OKEKE & NATARO, 2001; VALENTINER-BRANTH et al., 2003; HUANG et al., 2004; HARRINGTON et al., 2006; HUANG et al., 2006; WEINTRAUB, 2007). Porém, segundo alguns autores, EAEC é encontrada também na microbiota fecal em crianças sem a manifestação

clínica da doença (GASCÓN et al., 2000; SCALETSKY et al., 2002; SCHEMBRI, et al., 2003; HUANG et al., 2004; RAPPELI et al., 2005; HIEN et al., 2008).

Em nosso estudo encontramos um índice alto de EAEC (16,2%) associada à microbiota fecal de crianças com manifestação clínica de diarreia aguda. Além disso, estes microrganismos também foram detectados em 30,9% dos espécimes fecais provenientes das crianças do grupo controle, este resultado pode ser justificado pela capacidade que estas linhagens apresentam de formar biofilme na superfície do epitélio intestinal (MOHAMED et al., 2007). Outros estudos realizados no Brasil relatam EAEC como o patótipo de *E. coli* mais freqüente em crianças com diarreia e também nos grupos controles. Scaletsky e colaboradores (2001), em pesquisa com 237 crianças com diarreia e 231 sem diarreia, atendidas em um hospital público de Natal e São Luiz, observaram infecção por EAEC em 16,9% e 16,4% das crianças com e sem diarreia, respectivamente. Franzolin e colaboradores (2005) relataram o isolamento de EAEC a partir de fezes de 4,2% das 119 crianças com diarreia estudadas. Outros autores (ARAUJO et al., 2007) encontraram EAEC como isolado mais significativo em crianças sem manifestação clínica de diarreia (11%) enquanto que no grupo de crianças com diarreia atendidas em serviços pediátricos públicos de São Paulo, a prevalência foi de 7,4%. Na Bahia, Bueris e colaboradores (2007) relataram EAEC como patótipo mais isolado com 11,1% e 8,6% em pacientes com diarreia e grupo controle, respectivamente.

Os mecanismos de patogenicidade das infecções causadas por EAEC não estão completamente esclarecidos, e sugere-se a necessidade de estudos científicos para uma melhor caracterização destes microrganismos (HARRINGTON et al., 2006; HUANG et al., 2006). De maneira geral, parece existir uma heterogeneidade significativa de fatores de virulência entre as linhagens de EAEC já isoladas, e o papel específico destes fatores de virulência na patogênese da diarreia causada por EAEC está sendo investigado (NATARO et al., 1995; MIQDADY et al., 2002; ZAMBONI et al., 2004; WAKIMOTO et al., 2004; RUTTNER et al., 2006; HARRINGTON et al., 2006).

Alguns estudos, entretanto, indicam que algumas linhagens de EAEC induzem a secreção de muco pela mucosa intestinal, formando um biofilme bactéria-muco, que pode explicar a habilidade de persistência da EAEC no organismo, colonizando ou causando diarreia. Além da produção de biofilme, acredita-se que

algumas linhagens de EAEC possam produzir efeitos citotóxicos na mucosa intestinal através da indução de enterotoxinas e citotoxinas (COSTERTON et al., 1999; SHEIKH et al., 2001; WAKIMOTO et al., 2004; WEINTRAUB, 2007; MOHAMED et al., 2007; MENDEZ-ARANCIBIA et al., 2008).

6.3.3 ETEC

E. coli enterotoxigênica é um patógeno associado a diarreia e representa um grande responsável por mortalidade e morbidade entre crianças e viajantes, respectivamente, em países em desenvolvimento e na América Latina, África e Ásia (QADRI et al., 2005). A patogênese de ETEC está relacionada à colonização das células do intestino delgado por meio da produção de filamentos de adesinas conhecidos como fatores de colonização e, em segundo estágio, pela produção de um dos dois tipos de enterotoxinas, a toxina termo-estável (ST) e/ou a toxina termo-lábil (LT) (NATARO et al., 1998; SANCHEZ & HOLMGREN, 2005; ROCKABRAND et al., 2006). Um dos aspectos mais complexos da patogênese de ETEC está na presença de uma variedade de antígenos notáveis. Pelo menos 150 sorotipos O:H foram identificados entre as linhagens de ETEC isoladas de amostras humanas. A heterogeneidade fenotípica de ETEC é bem ilustrada pela presença de mais de 20 fatores de colonização e a produção de LT, ST ou ambas enterotoxinas (PACHECO et al., 2001; QADRI et al., 2005).

ETEC é um importante patógeno relacionado à diarreia em crianças menores de dois anos de idade em países em desenvolvimento, causando cerca de dois a três episódios de diarreia por ano nestas crianças, resultando numa estimativa de mais de 700.000 mortes por ano (DAVIDSON et al., 2002).

No presente estudo, estes microrganismos foram o quarto grupo entre os patótipos de *E. coli* mais frequentemente isolados (LT-/ST+ 2,9%), sendo recuperado de quatro linhagens isoladas de pacientes menores de dois anos de idade e com diarreia e nenhuma linhagem foi recuperada em paciente controle. Resultado semelhante foi encontrado por Orlandi e colaboradores em 2001, no Acre, que descreveram a ETEC como o quarto patógeno mais freqüente em crianças com

diarréia (LT+/ST+ 3,1%), e o patógeno não foi encontrado no grupo de indivíduos sem diarréia. Vários estudos realizados no Brasil, nas últimas décadas, têm relatado frequência relativamente alta para este patógeno. Gomes e colaboradores (1991) estudaram 500 crianças com diarréia e 500 crianças sem diarréia, menores de um ano, atendidas em hospital municipal da periferia da cidade de São Paulo, e identificaram 6,6% (LT+ 2,8%, ST+3% e LT+/ST+, 0,8%) e 1,8% (LT+ 1,4% e ST+ 0,4%) respectivamente. Toporovski e colaboradores (1999), em estudo em São Paulo com crianças menores de 3 anos encontrou 4% de ETEC nas crianças com diarréia (LT+ 3% e ST+ 1%) e 3% (LT+) no grupo controle. Em estudos mais recentes, Orlandi e colaboradores (2006) identificaram ETEC como o quarto patógeno mais isolado em 21 (4,5%) amostras das 470 amostras diarréicas avaliadas. Araujo e colaboradores (2007) descreveram ETEC como terceiro patógeno mais isolado das amostras de crianças com diarréia.

6.3.4 STEC

É um grupo de *E. coli* diarreiogênica caracterizado pela expressão de STx, codificada pelos genes *stx1* e *stx2*, uma exotoxina que é liberada durante a lise da célula. A toxina Shiga bloqueia a síntese protéica, agindo especificamente na subunidade 60S do ribossomo. A toxina desempenha papel central na patogênese da síndrome hemolítica urêmica (SHU), induzindo lesão do epitélio, inclusive renal, e alteração da função plaquetária. Esta síndrome está associada preferencialmente a produção de *Stx2*, que demonstrou ser capaz de destruir células endoteliais glomerulares. A lesão das células endoteliais leva à ativação plaquetária e deposição de trombina, o que resulta em diminuição da filtração glomerular e insuficiência renal aguda. As toxinas de Shiga também estimulam a expressão de citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral e interleucina 6 (FERNANDEZ & SANSONETTI, 2003; THORPE, 2004; RIVAS et al., 2008).

EHEC é considerado um subtipo de STEC que se caracteriza pela expressão de toxina Shiga e pela produção de lesão A/E em células epiteliais (NATARO & KAPER, 1998; KARCH, 2001). Embora neste estudo não tenha sido realizada a

sorotipagem destes microrganismos, segundo a literatura, o sorotipo O157: H7 está relacionado com intoxicações alimentares causadas pela ingestão de carnes de animais, uma vez que pode ser encontrado com frequência em fezes de ruminantes (gado, ovelhas) e não ruminantes (cavalos, cachorros, coelhos e porcos) (MEICHTRI et al., 2004). Frequentemente pode ser isolado de fezes de pessoas com diarreia e responsável pelo desenvolvimento da SHU, atingido grande número de crianças, com alto grau de morbidade (BANATVALA et al., 2001; RIVAS et al., 2008).

Em nosso estudo STEC foi o terceiro patótipo de *E. coli* mais isolado (7,4%), identificando-se os genótipos $stx1^+stx2^-$ ou $stx1^-stx2^+$. Vários estudos realizados no Brasil e em outros países, com amostras fecais de crianças com menos de 5 anos de idade, mostraram resultados semelhantes ao encontrado no nosso estudo, onde STEC é isolada com menor frequência que EAEC e EPEC. Entretanto a ocorrência encontrada em nosso estudo ainda é alta, se comparado a outros estudos brasileiros considerando-se diferentes regiões geográficas, cujos valores de ocorrência relatados variam de 0,5 a 1,5% (ORLANDI et al., 2006; BUERIS et al., 2007; ARAUJO et al., 2007). Por outro lado, em casos de intoxicação alimentar estes microrganismos podem estar associados, como relatado por Rivas e colaboradores, em 2008. Estes autores sugerem STEC como principal causa de diarreia associada à intoxicação alimentar com carne de animais em 52% dos casos de crianças associadas ao episódio.

Apesar de neste trabalho, terem sido avaliados apenas os genótipos $stx1$, $stx2$ alguns autores sugerem a caracterização genotípica baseada na detecção dos genes *ehxA*, *iha*, *saa*. Além disso, esses autores sugerem que as linhagens que carregam o gene $stx2$ estão comumente associadas a doenças mais severas (OLIVEIRA et al., 2008). Assim, 4 linhagens entre as 10 identificadas como STEC neste estudo, apresentaram o genótipo $stx1^-stx2^+$. Entretanto, no nosso estudo não foram verificadas outras etiologias possíveis e nosso objetivo não incluiu a determinação do agente etiológico principal nos casos de diarreia aguda, mas sim, da ocorrência destes microrganismos.

6.3.5 EIEC

Diarréia causada por *E. coli* enteroinvasiva é conhecida por causar sintomas semelhantes à shigelose em adultos e crianças. Apesar de ser reconhecida como um patógeno humano, poucas pesquisas foram realizadas para identificar fatores de risco individuais para infecção. Outros patógenos como EPEC, STEC e ETEC, além de *Shigella*, tem despertado maior atenção dos pesquisadores (VIEIRA et al., 2007).

A falta de atenção epidemiológica para EIEC está relacionada à baixa incidência deste patógeno como causador de diarréia em relação às outras linhagens de *E. coli* diarreiogênicas, sendo que em grande parte dos estudos, os pesquisadores não relatam a ocorrência destes microrganismos (QUEIROZ et al., 1985; NUNES, 1997; YOUSSEF et al., 2000; SCALETSKY et al., 2001). Entretanto, Gomes e colaboradores (1991), em São Paulo, identificaram EIEC em 7 (1,4%) crianças com diarréia e em 3 (0,6%) do grupo controle clinicamente saudáveis. Orlandi e colaboradores (2001) relataram identificação de EIEC, por métodos imunológicos, em 0,8% das amostras fecais obtidas de crianças com diarréia em Rondônia.

Raros estudos mostram índices altos para presença de EIEC como causa de diarréia. Em 1989, foram isoladas 15 amostras positivas para EIEC em 221 casos de diarréia em crianças num hospital de Beijing (KAIN et al., 1991). Além disso, em 1985 ocorreram 17 casos de diarréia por EIEC entre 410 crianças internadas num hospital de Bangkok (TAYLOR et al., 1988) e entre 1982 e 1986 outros 17 casos ocorreram entre 912 crianças com diarréia no Chile (FAUNDEZ et al., 1988). Em estudo no Equador, entre 2003 e 2005, foi relatado um alto índice de EIEC (21 casos em 236 pacientes com diarréia aguda), porém os números também foram altos considerando-se a sua ocorrência entre os indivíduos saudáveis naquela localidade (21 casos em 679 indivíduos). No total, de 915 amostras fecais avaliadas, 42 foram positivas para EIEC (VIEIRA et al., 2007).

A ausência de EIEC em nosso estudo reflete os relatos da literatura, que tem mostrado ser este patotipo o menos incidente entre as *E. coli* diarreiogênicas.

6.4 Padrão de susceptibilidade a drogas antimicrobianas

Os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos *in vitro* são valiosos para a seleção do agente quimioterapêutico ativo contra o organismo infectante. Um esforço extensivo tem sido realizado no intuito de padronizar os métodos utilizados para os testes e melhorar o valor preditivo clínico dos resultados. Os testes *in vitro* são uma medida do efeito do antibiótico contra o organismo sob condições específicas. A seleção do antibiótico e a resposta do paciente são influenciadas por uma variedade de fatores inter-relacionados, incluindo as propriedades farmacocinéticas do antimicrobiano, a toxicidade da droga, a doença clínica e o estado clínico geral do paciente (NYS et al., 2004)

O uso indiscriminado e inapropriado de drogas antimicrobianas é a principal causa dos níveis alarmantes e crescentes de resistência bacteriana. A transferência horizontal de genes de resistência, especialmente favorecida em ambientes cuja microbiota é rica e diversificada, é um poderoso mecanismo de manutenção do fenômeno. Há necessidade de monitoramento constante do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas, pois as alterações são rápidas e variam ao longo do tempo e entre diferentes locais, o que tem grandes implicações para a terapia empírica, principalmente considerando-se doenças infecciosas para as quais o diagnóstico microbiológico rotineiro não é aplicado (ALANIS, 2005).

Escherichia coli tem sido considerada, das enterobactérias isoladas de amostras clínicas, como um dos principais microrganismos multirresistentes a drogas, apresentando resistência a duas ou mais diferentes classes de antimicrobianos (ANUPURBA & SEN, 2005; BASSETTI et al., 2006; YANG et al., 2009).

De maneira geral, avaliando-se todas as linhagens de *E. coli* isoladas e identificadas neste estudo, comensais ou enteropatogênicas, o comportamento das linhagens isoladas da microbiota fecal de crianças saudáveis foi semelhante àquele observado para as linhagens isoladas de crianças com manifestação clínica de doença diarréica. Estes resultados permitem sugerir que os perfis de susceptibilidade a antimicrobianos observados são representativos das linhagens de *E. coli* de origem do TGI de crianças da comunidade avaliada.

Considerando-se os beta-lactâmicos avaliados, em nosso estudo foram observados altos níveis de resistência à ampicilina (30,9%), enquanto que baixos níveis de resistência foram observados para associação ampicilina/sulbactam (8,8%). Esta diferença nos perfis de susceptibilidade à ampicilina quando associada ao inibidor de beta-lactamase, permite sugerir a produção das penicilinases como mecanismo de resistência predominante nestes microrganismos. De maneira geral, representantes da família *Enterobacteriaceae* produzem baixos níveis destas enzimas (QIN et al., 2009). Além disso, foi observada baixa resistência à cefalotina, cefalosporina de espectro comparável às penicilinas (ALBERT et al., 2009).

Embora baixa resistência intermediária (< 6%) tenha sido observada para ampicilina, ampicilina/sulbactam e cefalotina, os beta-lactâmicos mais eficazes foram ceftazidima, ceftriaxona, imipenem e piperacilina/tazobactam. Estes resultados podem indicar que as linhagens de *E. coli* isoladas não foram produtoras de beta lactamases de espectro estendido, uma vez que a resistência às cefalosporinas de terceira geração não foi observada (GOYAL et al., 2009). Os resultados encontrados, entretanto, referem-se a linhagens de *E. coli* provavelmente de origem comunitária o que pode explicar os baixos níveis de resistência para estas drogas (ERB et al., 2007; DROPA et al., 2009).

Entre os antimicrobianos que agem interferindo a síntese protéica, altos níveis de resistência foram observados neste estudo para tetraciclina. Ainda, resistência intermediária foi observada para tetraciclina, amicacina e gentamicina, entretanto, destes antimicrobianos, a gentamicina foi o mais eficaz. Estudos científicos têm demonstrado altas taxas de resistência à tetraciclina para linhagens de *E. coli* entéricas, provavelmente relacionado ao uso indiscriminado destes antimicrobianos (NYS et al., 2004; AL-GALLAS et al., 2007; RODOLPHO & MARIN, 2007; USEIN et al., 2009; ALBERT et al., 2009). No nosso estudo, para os aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) foram observados baixos níveis de resistência intermediária, o que concorda com dados da literatura que sugerem boa atividade destes antimicrobianos contra os bastonetes Gram negativos entéricos. Além disso, estas drogas são consideradas antimicrobianos de uso hospitalar, não sendo, normalmente esperado resistência por linhagens bacterianas de provável origem comunitária (DIPERSIO & DOWZICKY, 2007; ALBERT et al., 2009; USEIN et al., 2009).

Os níveis de resistência observados para a associação sulfametoxazol-trimetoprim (cerca de 30%) refletem os resultados encontrados em vários estudos realizados por outros autores, que demonstraram altas taxas de resistência em relação a *E. coli* de origem entérica contra este fármaco (NGUYEN et al., 2005; USEIN et al., 2009). Uma explicação para este fato poderia ser devido ao seu uso amplo no tratamento de doenças associadas a bactérias Gram negativas, principalmente em crianças com até dois anos de idade com diarreia infecciosa aguda (MOTA et al., 2003).

Em relação às quinolonas, neste estudo baixos níveis de resistência foram observados contra a levofloxacina. A literatura tem reportado taxas variadas de resistência tanto a levofloxacina quanto a ciprofloxacina, o que pode ser explicado pela elevada prescrição destes fármacos, em alguns países, como tratamento para infecções entéricas por bactérias Gram negativas (SCHROEDER et al., 2002; YANG et al., 2009).

6.5 Considerações finais

Considerando-se que a doença diarreica e seus riscos são de conhecimento amplo, percebe-se a necessidade da divulgação de informações sobre epidemiologia e necessidade de acompanhamento médico. Neste contexto, a notificação é de extrema importância, bem como o diagnóstico clínico-laboratorial para determinação da etiologia da doença, a fim de se determinar uma estratégia terapêutica adequada. Além disso, o surgimento de formas graves extra-intestinais e disseminadas de doenças bacterianas de origem no trato gastrointestinal torna-se preocupante à medida que os profissionais da saúde não estão adequadamente preparados para o diagnóstico, intervenção e notificação precoces.

Métodos clássicos de identificação dos patógenos intestinais, como testes bioquímicos e imunológicos, são disponíveis para diagnóstico das diarreias infecciosas e tem demonstrado sensibilidade comprovada com métodos moleculares, porém os laboratórios clínicos, geralmente, utilizam apenas provas

bioquímicas para identificar espécie de *E. coli* e não realizam a pesquisa de todos patotipos pela sorotipagem, por ser este método mais dispendioso.

A diferenciação entre os patotipos de *E. coli* é de grande importância, uma vez que estes microrganismos estão implicados em diarreias agudas em crianças e, quase sempre, necessitarão de tratamento medicamentoso. Entre os patotipos, nota-se o crescente aumento de EAEC isolada das amostras fecais tanto de pacientes apresentando manifestação clínica de diarreia como em crianças saudáveis, além de EPEC atípica, que também tem demonstrado importância epidemiológica.

A investigação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos demonstra elevada resistência a fármacos como ampicilina, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprim, que pode ser explicado pela elevada indicação empírica destes fármacos na prática médica.

De maneira geral, nossos resultados indicam a relevância da participação de agentes bacterianos diarreiogênicos na gênese da diarreia aguda na infância, em crianças de 0 a 5 anos. Os dados gerados neste estudo reforçam a importância da necessidade de notificação da doença diarreica, bem como a consolidação dos programas de prevenção. Os dados levantados em nosso estudo servem de alerta para a necessidade do fortalecimento da vigilância sanitária como fiscalização e controle das diarreias bacterianas agudas. A alta resistência a antimicrobianos observada em nosso trabalho suscita uma ampla discussão sobre uso indiscriminado/indevido de antibióticos e os riscos inerentes da automedicação.

7 CONCLUSÕES

- Bactérias da espécie *Escherichia coli* comensais e enteropatogênicas são frequentes na microbiota fecal de crianças com e sem manifestação clínica de diarreia aguda.
- A metodologia molecular se mostrou mais sensível na identificação específica, comparada às técnicas bioquímicas convencionais utilizadas nos laboratórios clínicos.
- A metodologia molecular se mostrou eficiente para identificação de patótipos de *E. coli* isolados de amostras fecais de crianças com e sem manifestação clínica de diarreia, sendo mais prevalentes nas amostras fecais de crianças apresentando manifestação clínica de diarreia.
- Entre as linhagens diarreio gênicas, *E. coli* enteroagregativa (EAEC) foi o patótipo mais prevalente na população amostrada.
- A observação de linhagens de *E. coli* diarreio gênicas, como a EAEC, nas fezes de crianças saudáveis indica a circulação comunitária destes microrganismos em indivíduos que podem atuar como reservatórios assintomáticos, no momento da coleta;
- As amostras bacterianas representativas de *E. coli* diarreio gênicas ou não que circulam na nossa região mostraram-se resistentes aos antimicrobianos mais frequentemente utilizados na prática clínica;
- Os altos níveis de resistência e resistência intermediária aos antimicrobianos suscitam reflexões sobre o uso indiscriminado destas substâncias, especialmente considerando-se isolados de crianças com idade média de 2 anos de idade.
- Cefalosporinas de terceira geração, carbapenêmicos e associações de drogas beta-lactâmicas e inibidores de beta-lactamase como piperacilina/tazo-

bactam, permanecem, ainda, como alternativas terapêuticas, para tratamento de infecções envolvendo *E. coli* nestes indivíduos.

REFERÊNCIAS

AFSET, J. E.; BERGH, K.; BEVANGER, L. HIGH prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. **J Med Microbiol.**, v.52, p.1015-1019, 2003.

AFSET, J.E.; BEVANGER, L.; ROMUNDSTAD, P.; BERGH, K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhea. **J Med Microbiol.**, v.53, p.1137-1144, 2004.

AGUILA, A.; VALDES-DAPENA, M.; RAMIREZ, M.; FERNANDEZ, C.; BRAVO, L. Estudio de correlación entre cepas de *Escherichia coli* sorbosa negativa y su capacidad de producir enterotoxinas. **Rev Cub Med Trop.**, v. 58, p. 56-62, 2006.

ALANIS, A.J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? **Arch Med Res.**, v.36, p.679-705, 2005.

ALLEN, K.P.; RANDOLPH, M.M.; FLECKENSTEIN, J.M. Importance of heat-labile enterotoxin in colonization of the adult mouse small intestine by human enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Infect. Immun.**, v.74, p.869-875, 2006.

ALBERT, M.J.; ROTIMI, V.O.; DHAR, R.; SILPIKURIAN, S.; PACSA, A.S.; MOLLA, A.M.; SZUCS, G. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* are not a significant cause of diarrhoea in hospitalized children in Kuwait. **BMC Microbiology**, v.9, 2009.

AL-GALLAS, N.; BAHRI, O.; BOURATBEEN, A.; HAASEN, A.; BEN AISSA, R. 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 Hyg.**, v.77, p.571-582, 2007.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY - Antimicrobial Resistance an Ecological Perspective. Report From the American Academy of Microbiology. **American Society for Microbiology**, Washington, D.C., 2000.

ANDRADE, J.A.; OLIVEIRA, J.O.; FAGUNDES-NETO, U. Lethality in hospitalized infants, v.45, p.121-127, 1999.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Manual de Microbiologia Clínica para Controle de Infecção em Serviços de Saúde**, 2004

ANUPURBA, S.; SEM, MR. Antimicrobial resistance profile of bacterial isolates from intensive care unit: **Changing trends. J Commun Dis.**, v.37, p.58-65, 2005.

ARANDA, K.R.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I.C. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 5849-5853, 2004.

ARAUJO, J.M.; TABARELLI, G.F.; ARANDA, K.R.S.; FABBRICOTTI, S.H.; FAGUNDES-NETO, U.; MENDES, C.M.F. AND SCALETSKY, I.C.A. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian Children. **J.Clin.Microbiol.**, v.45, p.3396-3399, 2007.

BALAMURUGAN, R.; JANARDHAN, H.P.; GEORGE, S.; CHITTARANJAN, S.P.; RAMAKRISHNA, B.S. Bacterial succession in the colon during childhood and adolescence: molecular studies in a southern indian village. **Am J Clin Nutr.**, v. 88, p.1643-1647., 2008

BANATVALA, N.; GRIFFIN, P.M.; GREENE, K.D.; BARRETT, T.J.; BIBB, W.F.; GREEN, J.H. The United States national prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. **J Infect Dis.**, v.183, p. 1063-1070, 2001.

BARTOLONI, A.; BARTALESI, F.; MANTELLA, A.; DELL'AMICO, E.; ROSELI, M.; STROHMEYER, M.; BARAHONA, H.G.; BARRON, V.P.; PARADISI, F.; ROSSOLINI, G.M. High prevalence of acquired antimicrobial resistance unrelated to heavy antimicrobial consumption. **J Infect Dis.**, v.189, p.1291-1294, 2004.

BASSET, C.; HOLTON, J.; BAZEOS, A.; VAIRA, D.; BLOOM, S. Are *Helicobacter* Species and Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* Involved in Inflammatory Bowel Disease? **Digestive Dis. Sciences**, v.49, n.9, p. 1425–1432, 2004.

BASSETTI, M.; CRUCIANI, M.; RIGHI, E. Antimicrobial use and resistance among Gram-negative bacilli in an Italian intensive care unit (ICU). **J Chemother.**, v. 18, p. 261-267, 2006.

BARRETO, M.L.; MILROY, C.A.; STRINA, A.; PRADO, M.S.; LEITE, J.P.; RAMOS, E.A.; RIBEIRO, H.; ALCANTARA-NEVES, N.M.; TEIXEIRA, M.D.; RODRIGUES, L.C.; RUF, H.; GUERREIRO, H.; TRABULSI, L.R. Community-based monitoring of diarrhea in urban Brazilian children: incidence and associated pathogens. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v.100, p.234-242, 2006.

BOTTARI, B.; ERCOLINI, D.; GATTI, M.; NEVIANI, E. Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 73, p. 485-494, 2006.

BRANDAL, L.T.; LINNDSTEDT, B.A.; LENA, A.; STAVNES, T.V.; LASSEN, J.; KAPPERUD, G. Octaplex PCR and fluorescence-based capillary electrophoresis for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **J Microbiol Methods**, v.68, p.331-342, 2007.

BRYCE, J.; BOSCHI-PINTO, C.; SHIBUYA, K.; BLACK, R.E. WHO Child Health Epidemiology Reference Group. WHO estimates of the causes of death in children, **Lancet**. v 365, p.1147-1152, 2005.

BUERIS, V.; SIRCILI, M.P.; TADDEI, C.R.; SANTOS, M.F.; FRANZOLIN, M.R.; MARTINEZ, M.B.; FERRER, S.R.; BARRETO, M.L.; TRABULSI, L.R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.102, p.839-844, 2007.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGERE, H.; OSWALD, E. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Vet. Res.**, v.36, p.289-311, 2005.

CHENG, D.; SUN, H.; XU, J. AND GAO, S. PCR detection of virulence factor genes in *Escherichia coli* isolates from weaned piglets with edema disease and/or diarrhea in China. **Veterinary Microbiol.**, v.115, p.320-328, 2006.

CHIU, C.H.; SU, L.H. AND CHU, C. *Salmonella enterica* Serotype Choleraesuis: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Disease, and Treatment. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.17, n.2, p.311-322, 2004.

CHOTÁR, M.; VIDOVÁ, B.; GODÁNY, A. Development of specific and rapid detection of bacterial pathogens in dairy products by PCR. **Folia Microbiol (Praha)**, v.51, p. 639-646, 2006.

CLSI . CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE . Performace Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. CISI document M 100-S17. Pensylvania: **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 2007

COHEN, M.B.; NATARO, J.P.; BERNSTEIN, D.I.; HAWKINS, J.; ROBERTS, N.; STAAT, M.A. Prevalence os diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: a prospective controlled study. **J. Pediatr.**, v.146, p.54-61, 2005.

COLLARES, G.B. Pesquisa de *Escherichia coli* enteropatogênica em crianças com diarréia aguda em Belo Horizonte/MG, Departamento de microbiologia/ICB/UFMG, 2005. (**Dissertação de mestrado**).

CONEDERA, G.; DALVIT, P.; MARTINI, M.; GALIERO, G.; GRAMALIA, M.; GODOFREDO, E.; LOFFREDO, G.; MORABITO, S.; OTTAVIANI, D.; PATERLINI, F.; PEZZOTTI, G.; PISANU, M.; SEMPRINI, P.; CAPRIOLLI, A. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. **Int J Food Microbiol.**, v.96, p.67-73, 2004.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v.284, p.1318-1322, 1999.

DAVIDSON, G.; BARNES, G.; BASS, D.; COHEN, M.; FASANO, A.; FONTAINE, O.; GUANDALINI, S. Infectious diarrhea in children: working group report of the First World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v.35, p.143-150, 2002.

DEMAN, P.; VERHOENVEN, B.A.N.; VERBURGH, H.A.; VOS M.C.; VAN DEN ANKER, J.N. An antibiotic policy to prevent emergence of resistant bacilli. **Lancet**, v.355, p.973-978.

de PAULA, C.J.S.; MARIN, J.M. Isolation os extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from diarrheic dogs and their antimicrobial resistance profile. **Braz J Microbiol.**, v.39, p.498-500, 2008.

DINIZ, C.G.; ARANTES, R.M.; CARA, D.C.; LIMA, F.L.; NICOLI, J.R.; CARVALHO, M.A.; FARIAS, L.M. Enhanced pathogenicity of susceptible strains of the *Bacteroides fragilis* group subjected to low doses of metronidazole. **Microbes Infect.**, v.5, n.1, p.19-26, 2003.

DINIZ, C.G.; CARA, D.C.; NICOLI, J.R.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M. A. R. Effect of metronidazole on the pathogenicity of resistant *Bacteroides* strains in gnotobiotic mice. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 44, p. 2419-2423, 2000.

DINIZ, C.G.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.A.R; ROCHA, E.R.; SMITH, C.J. Differential gene expression in a *Bacteroides fragilis* metronidazole-resistant mutant. **Journal Antimicrob. Chemother.**, v.54, p.100-108, 2004.

DIPERSIO, J.R.; DOWZICKY, M.J. Regional variations in multidrug resistance among *Enterobacteriaceae* in the USA and comparative activity of tigecycline, a new glycylicycline antimicrobial: **International Journal of Antimicrobial Agents**, V. 29, P. 518-527, 2007.

DROPA, M.; BALSALOBRE, L.C.; LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E.M.; MURAKAMI, T.; CASSETTARI, V.C.; FRANCO, F.; GUIDA, S.M.; BALABAKIS, A.J.; PASSADORE, L.F.; SANTOS, S.R.; MATTE, G.R.; MATTE, M.H. Extended-spectrum beta-lactamase among *Enterobacteriaceae* isolated in a public hospital in Brazil. **Rev Inst Med Trop.**, S. Paulo, v.51, p.203-209, 2009.

DULGUER, M.V.; FABBRICOTTI, S.H.; BANDO, S.Y.; MOREIRA-FILHO, C.A.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, C.A. 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.**, v.188, p.1685-1694, 2003.

DUMKE, R.; SCHRÖTER-BOBSIN, U.; JACOBS, E.; RÖSKE, I. Detection of phages carrying the Shiga toxin 1 and 2 genes in waste water and river water samples. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.42, p.48-53, 2006.

DURMAZ, B.; DALGALAR, M.; DURMAZ, R. Prevalence of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in patients with diarrhea: A controlled study. **Anaerobe**, v.11, p.318-321, 2005.

DUNNE, E.F.; FEY, P.D.; KLUDT, P.; MOSTASHARI, F.; SHILLAM, P.; WICKLUND, J.; MILLER, C.; HOLLAND, B.; STAMEY, K.; BARRET, T.J.; RASHEED, L.K. Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant *Salmonella* infections associated with AmpC β -lactamase. **JAMA**, v.284, p.3151-3156, 2000.

DUTTA, S.; PAL, S.; CHAKRABARTI, S.; DUTTA, P.; MANNA, B. Use of PCR to identify enteroaggregative *Escherichia coli* as an important cause of diarrhoea among children living in Calcutta, India. **J Med Microbiol**, v.48, p.1011-1016, 1999.

ELHAG , K.M.; ALWAN, M.H.; AL-ADNANI, M.S.; SHERIF, R.A. *Bacteroides fragilis* is a silent pathogen in acute appendicitis. **J. Med. Microbiol.**, v.21, p.245-249, 1986.
ERB, A.; STURMER, T.; MARRE, R.; BRENNER, H. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal and methodological variations. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v.26, p.83-90, 2007.

ESTRADA-GARCÍA, T.; LOPEZ-SAUCEDO, C.; THOMPSON-BONILLA, R.; ABONCE, M.; LOPEZ-HERNANDEZ, D.; SANTOS, J.I.; ROSADO, J.L. Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. **J. Clin. Microb.**, v.47, p.93-98, 2009.

FAGUNDES-NETO, U.; SCHIMITZ, L.G., SCALETSKY, I. Acute diarrhea due to enteropathogenic *Escherichia coli*: epidemiological and clinical features in Brasília, Brazil. **Int. J. Infect. Dis.** v.1, p.65-69. 1996.

FAUNDEZ, G.; FIGUEROA, G.; TRONCOSO, M.; CABELLO, F.C. Characterization of invasive *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea in Chile. **J Clin Microbiol.**, v. 26, p.928-932, 1988.

FERNANDEZ, M.I.; SANSONETTI, P.J. Effector molecules of *Shigella* pathogenesis and host responses. In: Hecht GA (Ed.). *Microbial Pathogenesis and the Intestinal Epithelial Cell*. Washington: **ASM Press**, cap.25, p.455-479, 2003.

FRANZOLIN, M.R.; ALVES, R.C.; KELLER, R.; GOMES, T.A.T.; BEUTIN, L.; BARRETO, M.L.; MILROY, C.; STRINA, A.; RIBEIRO, H.; TRABULSI L.R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.100, p.359-363, 2005.

FURRIE, E. A molecular revolution in the study of intestinal microflora. **Gut.**, v. 55, p. 141-143, 2006.

GADEWAR, S.; FASANO, A. Current concepts in the evaluation, diagnosis and management of acute infectious diarrhea. **Curr Opin Pharmacol.**, v.5, p. 559-565, 2005.

GASCÓN, J.; VARGAS, M.; SCHELLENBERG, D.; URASSA, H.; CASALS, C.; KAHIGWA, E.; APONTE, J.J.; MSINDA, H.; VILA, J. Diarrhea in children under 5 years of age from Ifakara, Tanzania: a case-control study. **J Clin Microbiol**, v.38, p.4459-4462, 2000.

GILMOUR, M.W.; TRACZ, D.M.; ANDRYSIAK, A.K.; CLARK, C.G.; TYSON, S.; SEVERINI, A.; LAI-KING, N. Use of the *espZ* gene encoded in the locus of enterocyte effacement for molecular typing of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, n.2, p.449-458, 2006.

GOMES, T.A.T.; IRINO, K.; GIRÃO, D.M.; GIRÃO, V.B.C.; GUTH, B.E.C.; VAZ, T.M.I.; MOREIRA, F.C.; CHINARELLI, S.H.; VIEIRA, M.A.M. Emerging enteropathogens *Escherichia coli* strains. **Emerg. Infect. Dis.**, v.10, p.1851-1855, 2004.

GOMES, T.A.T.; ROSSI, V.; MCDONALD, K.L.; RAMOS, S.R.T.S.; TRABULSI, R.L.; VIEIRA, M.A.M.; GUTH, B.E.C.; CNADEIAS, J.A.N.; IVEY, C.; TOLEDO, M.R.F.; BLAKE, P.A. Enteropathogens associated with acute diarrheae disease in urban infants in S. Paulo, Brasil. **J Infect Dis.**, v.164, p. 331-337, 1991.

GOYAL, A.; PRASAD, K.N.; GUPTA, S.; GHOSHAL, U.; AYYAGARI, A. Extended spectrum β -lactamase in *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumonia* & associated risk factors. **Ind J Med.**, v.129, p.695-700, 2009.

GUTH, B.E.C.; SOUZA, R.L.; VAZ, T.M.I.; IRINO, K. First shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil. **Emerg Infect Dis.**, v.8, p.535-536.

HARRINGTON, S.M.; DUDLEY, E.G.; NATARO, J.P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol Lett.**, v.254, p.12-18, 2006.

HIEN, B.T.T.; SCHEUTZ, F.; DAC CAM, P.; SERICHANTALERGS, O.; HUONG, T.T.; THU, T.M.; DALSGAARD, A. Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains isolated from children in a hospital case-control study in Hanoi, Vietnam. **J Clin Microbiol.**, v.46, p.996-1004, 2008.

HILL, S.M.; PHILIPS, A.D.; WALKER-SMITH, J.A. Enteropathogenic *Escherichia coli* and life-threatening chronic diarrhea. **Gut**, v.32, p.154-158, 1991.

HOLDEMAN, L.V.; CATTO, E.P. AND MOORE, W.E. **Anaerobic laboratory manual**. 4th ed., Blacsburg - The Virginia Polytechnic Institute and State University Anaerobe Laboratory, 1977.

HUANG, D.B.; OKHUYSEN, P.C.; ZHI-DONG JIANG, M.D.; DUPONT, H.L. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. **Am J Gastroenterol**, v.99, p.383-389, 2004.

HUANG, D.B.; MOHANTY, A.; DUPONT, H.L.; OKHUYSEN, P.C.; CHIANG, T. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Med Microbiol**, v.55, p.1303-1311, 2006.

IRINO, K.; VAZ, T.M.I.; KATO, M.A.M.F.; NAVES, Z.V.F.; LARA, R.R.; MARCO, M.E.C.; ROCHA, M.M.M.; MOREIRA, T.P.; GOMES, T.A.T.; VIEIRA, M.A.M.; GUTH, B.E.C. O157:H7 shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerg Infect Dis.**, v.8, p. 446-447, 2002.

IRINO, K.; VAZ, T.M.I.; MEDEIROS, M.I.C.; KATO, M.A.M.F.; GOMES, T.A.T.; VIEIRA, M.A.M.; GUTH, B.E.C. Serotype diversity as drawback in the surveillance of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Brazil. **J Med Microbiol.**,v.56, p.565-567, 2007.

JAFARI, F.; GARCIA-GIL, L.J.; SALMANZADEH-AHRABI, S.; SHOKRZADEH, L.; ASLANI, M.M.; POURHOSEINGHOLI, M.A.; DERAKHSHAN, F.; ZALI, M.R. Diagnosis and prevalence of enteropathogenic bacteria in children less than 5 years of age with acute diarrhea in Tehran children's hospitals. **J. Infect. Dis.**. 2008.

JARLOV, J. O. Phenotypic characteristics of coagulase-negative *staphylococci*: typing and antibiotic susceptibility. **APMIS Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.**, v.107, suppl. 91, p.1-42, 1999.

JOHNSON, A.M.; KAUSHIK, R.S.; FRANCIS, D.H.; FLECKENSTEIN, J.M.; HARDWIDGE, P.R. Heat-Labile enterotoxin promotes *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial cells. **J. Antimicrob.**, v.191, p.178-186, 2009.

KAIN, K.C.; BARTELUK, R.L.; KELLY, M.T.; HE, X.; DE HUA, G, GE, Y.A.; PROCTOR, E.M.; BYRNE, S.; STIVER, H.G. Etiology of childhood diarrhea in Beijing, China. **J Clin Microbiol.**, v. 29, p.90-95, 1991.

KAHLMETER, G. Na international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project. **J Antimicrob Chemother**, v.51, p.69-76, 2003.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol**, v.2, p.123-140, 2004.

KARCH, H. The role of virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol**, v.2, p.123-140, 2004.

KIM, C.H.; SUK, K.T.; KIM, J.W. A case of sepsis and acute renal failure associated with *Salmonella* enterocolitis. Korean **J. Gastroenterol.**, v.52, p.110-114, 2008.

KOSEK, M.; BERN, C.; GUERRANT R.L. The global burden os diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. Bull. **W.H.O.**, v.81, p.197-204, 2003.

LESTER, S.C.; DEL PILAR PLA, M.; WANG, F.; PEREZ SCHAEEL, I.; JIANG, H.; O'BRIEN, T.F. The carriage of *Escherichia coli* resistant to antimicrobial agents by healthy children in Boston, in Caracas, Venezuela, and in Qin Pu, China. **N Engl J Med.**, v.323, p. 285-289, 1990.

LONG, K.Z.; SANTOS, J.I.; ROSADO, J.L.; LOPEZ-SAUCEDO, C.; THOMPSON-BONILA, R.; ABONCE, M.; DUPONT, H.L.; HERTZAMARK, E.; ESTRADA-GARCÍA, T. Impact of vitamin A on selected gastrointestinal pathogen infections and associated diarrheal episodes among children in México City, México. **J. Infect. Dis.**, v.194, p.1217-1225, 2006.

LOPEZ-SAUCEDO, C.; CERNA, J.F.; VOLLEGAS-SEPULVEDA, N.; THOMPSON, R.; VELAZQUEZ, F.R.; TORRES, J.; TARR, P.I.; ESTRADA-GARCÍA, T. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with aiarrheagenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v.9, p.127-131, 2003.

LORIAN, V.; GEMMELL, C.G. Effect of low antibiotic concentrations on bacteria: effects on ultrastructure, virulence, and susceptibility to immunodefenses. In *Antibiotics in Laboratory Medicine* (Lorian, V., Ed.) Williams & Wilkins, **Baltimore**, p.493-549, 1994.

MEDEIROS, M.I.; NEME, S.N.; SILVA, P.; CAPUANO, D.M.; ERRERA, M.C.; FERNANDES, S.A.; VALLE, G.R.; ÁVILLA, F.A. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto-SP, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v.43, p.21-24. 2001.

MEICHTRI, L.; MILIWEBSKY, E.; GIOFFRE, A.; CHINEN, I.; BASCHKIER, A.; CHILLEMI, G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef from

Argentina: prevalence and virulence properties. **Int J Food Microbiol.**, v.96, p. 189-198, 2004.

MENDEZ-ARANCIBIA, E.; VARGAS, M.; SOTO, S.; RUIZ, J.; KAHIGWA, E.; SCHELLENBERG, D.; URASSA, H.; GASCÓN, J.; VILA, J. Prevalence of different virulence factors and biofilm production in enteroaggregative *Escherichia coli* isolates causing diarrhea in children in Ifakara (Tanzania). **Am J Trp Med Hyg.**, v.78, n.6, p.985-989. 2008.

MIQDAY, M.S.; JIANG, Z.D.; NATARO, J.P.; DUPONT, H.L. Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* with formalin-preserved HEp-2 cells. **J Clin Microbiol.**, v.40, p.3066-3067, 2002.

MITRA, A.K.; KHAN, M.R.; ALAM, A.N. Complications and outcome of disease in patients admitted to the intensive care unit of diarrhoeal diseases hospital in Bangladesh. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.85, p.685-687, 1991.

MOHAMED, J.A.; HUANG, D.B.; JIANG, Z.D.; DUPONT, H.L.; NATARO, J.P.; BELKIND-GERSON, J.; OKHUYSEN, P.C. Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. **J Clin Microbiol.**, v.45, p.121-126, 2007.

MOREDO, F.A.; VIGO, G.B.; CAPPUCCIO, J.A.; PINEYRO, P.; Perfumo, C.J.; Giacoboni, G.I. Resistencia a los antimicrobianos de aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de credos de la Republica Argentina. **Rev Arg Microbiol.**, v.39, p.227-229, 2007.

MOTA, J.A.C.; NORTON, R.C.; PENNA, F.J. Doença diarréica aguda. In: Simão e Silva, A.C.; NORTON, R.C.; MOTA, J.A.C., PENA, F.J. **Manual de Urgências em Pediatria**. Rio de Janeiro: MEDSI editora médica científica Ltda, cap.19, p.217-222, 2003.

NAGY, B.; FEKETE P.Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **Int. J. Med. Microbiol.**, v.295, p.443-454, 2005.

NAKANO, V.; GOMES, D.A.; ARANTES, R.M.E.; NICOLI, J.R.; AVILA-CAMPOS, M.J. Evaluation of the pathogenicity of the *Bacteroides fragilis* toxin gene subtypes in gnotobiotic mice. **Current Microbiol.**, v.53, p.113-117, 2006.

NATARO, J.P.; YIKANG, D.; COOKSON, S.; CRAVIOTO, A.; SAVARINO, S.J.; GUERS, L.D.; LEVINE, M.M.; TACKET, C.O. Heterogeneity of enteroaggregative

Escherichia coli virulence demonstrated in volunteers. **J Infect Dis.**, v.171, p.465-468, 1995.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol. Rev.** v.11, p.42-201.1998.

NATARO, J.P. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. **Curr Opin Gastroenterol.**, V.21, p.4-8, 2005.

NAKAZATO, G.; GYLES, C.; ZIEBELL, K.; KELLER, R.; TRABULSI, L.R.; GOMES, T.A.T.; IRINO, K.; SILVEIRA, W.D.; CASTRO, A.F.P. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Vet Microbiol**, v.101, p.269-277, 2004.

NGUYEN, T.V.; LE, P.V.; LE, C.H.; WEINTRAUB, A. Antibiotic resistance in diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* Straits isolated from children in Hanoi, Vietnam. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, p.816-818, 2005.

NGUYEN, R.N.; TAYLOR, L.S.; TAUSCHEK, M.; ROBINS-BROWNE, R.M. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. **Emerg Infect Dis**, v.12, p.597-603, 2006.

NYS, S.; OKEKE, I.N.; KARIUKI, S.; DINANT, G.J.; DRIESSEN, C.; STOBBERINGH, E.E. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* from healthy volunteers from eight developing countries. **J. Antimicrob. Chem.**, v54, p. 952-955, 2004.

NUNES, M.R.C.M. Diarréia infecciosa endêmica em Teresina: conhecer para melhor combater. Teresina, Faculdade de Educação/UFPI, 1997, (**Dissertação de mestrado**).

OCHOA TJ.; SALAZAR-LINDO E.; CLEARY TG. Evolution of children with persistent infectious diarrhea. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.** v.16, p.259-263, 2004.

OCHOA TJ.; BARLETTA F.; CONTRERAS C.; MERCADO E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v.102,n.09, p. 852-856, 2008.

OLIVEIRA, M.G.; BRITO, J.R.F.; CARVALHO, R.R.; GUTH, B.E.C.; GOMES, T.A.T.; VIEIRA, M.A.M.; KATO, M.A.M.F.; RAMOS, I.I.; VAZ, T.M.I.; IRINO, K. Water

buffaloes (*Bubalus bubalis*) identified as an important reservoir of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Brazil. **App Envir Microbiol.**, v. 73, p. 5945-5948, 2007.

OLIVEIRA, M.G.; BRITO, J.R.F.; GOMES, T.A.T.; GUTH, B.E.C.; VIEIRA, M.A.M.; NAVES, Z.V.F.; VAZ, T.M.I.; IRINO, K. Diversity of virulence profiles shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. **Int J Food Microbiol.**, v. 127, p. 139-146, 2008.

OPLUSTIL, C.P.; ZOCCOLI, Z.M.; TOBOUTI, N.R. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica, 2^a. Ed, Sarvier, São Paulo, SP, 2004.

OKEKE, I.N.; NATARO, J.P. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Lancet Infect Dis.**, v.1, p.304-313, 2001.

ORLANDI, P.P.; SILVA, T.; MAGALHÃES, G.F.; ALVES, F.; CUNHA, R.P.A.; DURLACHER, R.; PEREIRA DA SILVA, L.H. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants of poor urban areas of Porto Velho, Rondônia: a preliminary study. **Mem inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, p. 621-625, 2001.

ORLANDI, P.P.; MAGALHÃES, G.F.; MATOS, N.B.; SILVA, T.; PENATTI, M.; NOGUEIRA, P.A.; SILVA, L.H.P. Etiology of diarrheal infection in children of Porto Velho (Rondônia, West Amazon region, Brazil). **Braz J Med Biol Res.**, v.39. p.507-517, 2006.

PACHECO, A.B.; FERREIRA, L.C.; PICHEL, M.G.; ALMEIDA, D.F.; BINSZTEIN, N.; VIBOUD, G.I. Beyond serotypes and virulence-associated factors: detection of genetic diversity among O153:H45 CFA/I heat-stable enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **J Clin Microbiol.**, v.39, p.4500-4505, 2001.

PATHELA, P.; HASAN, K.Z.; ROY, E.; ALAM, K.; HUQ, F.; SIDDIQUE, A.K.; SACK, R. B. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* – Associated Diarrhea in Children 0–2 Years of Age in Rural Bangladesh. **J Infect Dis.**, v.191, p.1245-1252, 2005.

PATRZALEK, M. The cases of rotaviral diarrhea from Kielce and Kielce district, hospitalized in Kielce Voivodeship Children Hospital in 2002-2006, **Przegl Epidemiol.**, v.62, p.557-563. 2008.

PESSOA, G.V.A.; SILVA, E.A. Milieu pour l'identification presomptive rapide des enterobacterias, des *Aeromonas* e des vibrions. **Annales de Microbiologie Paris**, v. 125a, p. 341-347, 1974.

PRÈRE, M.F.; FAYET, O. A new genetic test for the rapid identification of shiga-toxines producing (STEC), enteropathogenic (EPEC) *E. coli* isolates from children. **Pathologie Biologie**, n.53, p.466-469, 2005.

PRERE, M.F.; BACRIE, S.C.; BARON, O.; FAYET, O. Bacterial etiology of diarrhoea in young children: high prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) not belonging to the classical EPEC serogroups. **Pathol Biol**, v.54, p.600-602, 2006.

PODEWILS, L.J.; MINTZ, E.D.; NATARO, J.P.; PARASHAR, U.D. Acute infectious diarrhea among children in developing countries. **Semi Pediatr Infec Dis.**, v.15, p.155-168, 2004.

PULSENET. One day (24-28h) standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Salmonella sonnei* by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). CDC, **National Center for Infectious Disease**, Atlanta, GA, 2004.

QADRI, F.; SVENNERHOLM, A.M.; FARUQUE,.; SACK, R.B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.18, p.465-483, 2005.

QIN, X.; ZERR, D.M.; WEISSMAN, S.J.; ENGLUND, J.A.; DENNO, D.M.; KLEIN, E.J.; TARR, P.I.; KWONG, J. STAPP, J.R.; TULLOCH, L.G.; GALANAKIS, E. Prevalence and mechanisms of broad-spectrum β - lactam resistance in *Enterobacteriaceae*: a children's hospital experience. **Antim. Ag. Chem.**, v.52, p. 3909-3914, 2008.

QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N.; CISALPINO, E.O.; PERES, J.N.; PENNA, F.J. Frequência de *Escherichia coli* enteropatogênica em crianças com diarreia aguda e em controles, em Belo Horizonte. **Rev Microbiol**, v.16, p.95-100, 1985.

RAPPELI, P.; FOLGOSA, E.; SOLINAS, M.L.; COSTA, J.L.; PISANU, C.; SIDAT, M.; MELO, J.; CAPPUCINELLI, P. COLOMBO, M.M. Pathogenic enteric *Escherichia coli* in children with and without diarrhea in Maputo, Mozambique. **FEMS Immun Med Microbiol.**, v.43, p.67-72, 2005.

RASCO, D.A.; ROSOVITZ, M.J.; GARRY, S.A.; MYERS, E.F.; MONGODIN, W.; FLORIAN-FRICKE, W.; GAJER, P.; CRABTREE, J.; SEBAIHIA, M.; THOMSON, N.R.; CHAUDHURI, R.; HENDERSON, I.R.; SPERANDIO, V.; RAVEL, J. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *Escherichia coli* commensal and pathogenic isolates. **Journal of Bacteriology**, v.190, p.6881-6893, 2008.

REGUA-MANGIA, A.H.; GOMES, T.A.T.; VIEIRA, M.A.M.; ANDRADE, J.R.C.; IRINO, K.; TEIXEIRA, L.M. Frequency and characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhea in Rio de Janeiro, Brazil. **J Infect.**, v.48, p.161-167, 2004.

ROSEBURY, T. *Microorganisms Indigenous to Man*. The Maple Press Company, York, PA, EUA, p.435, 1962.

RIVAS, M.; SOSA-ESTANI, S.; RANGEL, J.; CALETTI, M.G.; VALLES, P.; ROLDAN, C.D.; BALBI, L.; MOLLAR, M.C.M.; AMOEDO, D.; MILIWEBSKY, E.; CHINEN, I.; HOEKSTRA, R.M.; MEAD, P.; GRIFFIN, P.M. Risk factors for sporadic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in children, Argentina. **Emerg Inf Dis.**, v.14, p.763-769, 2008.

ROBINS-BROWNE, R.M.; BORDUN, A.M.; TAUSCHEK, M.; BENNETT-WOOD, V.R.; RUSSELL, J.; OPPEDISANO, F.; LISTER, N.A.; BETTELHEIM, K.A.; FAIRLEY, C.K.; SINCLAIR, M.I.; HELLARD, M.E. *Escherichia coli* and community acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. **Emerg Infect. Dis.**, v.10, p.1797-1805, 2004.

ROCKABRAND, D.M.; SHAHEEN, H.I.; KHALIL, S.B.; PERUSKI JR, L.F.; ROZMAJZL, P.J.; SAVARINO, S.J.; MONTEVILLE, M.R.; FRENCK, R.W.; SVENNERHOIM, A.M.; PUTNAM, S.D.; SANDERS, J.W. Enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factor types collected from 1997-2002 in US military personnel during operation Bright Star in Northern Egypt. **Diag Microbiol Infect Dis.**, v.55, p.9-12, 2006.

RODOLPHO, D.; MARIN, J.M. isolation of shiga toxigenic *Escherichia coli* from butcheries in Taquaritinga city, states of São Paulo, Brazil. **Braz J Microbiol.**, v.38, p.599-602, 2007.

RUTTLE, M.E.; YAZON, C.S.; CUITIÑO, M.J.; RENNA, N.F.; PIZARRO, M.A.; ORTIZ, A.M. Evaluation of multiplex PCR method to detect enteroaggregative *Escherichia coli*. **Biocell** (Mendoza), v.30, n.2, p.301-308, 2006.

SALYERS, A.A. AND WHITT, D.D. Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach. Washington D.C. **ASM Press**, p.418, 1994.

SALYERS, A.A. *Bacteroides* of the human lower intestinal tract. **Ann. Rev. Microb.**, v.38, p.293-313, 1984

SANCHEZ, J.; HOLMGREN, J. Virulence factors, pathogenesis and vaccine protection in cholera and ETEC diarrhea. **Curr Opin Immunol.**, v.17, p.388-398, 2005.

SCALETSKY, I.C.A. ; FABBRICOTTI, S.H. ; SILVA, S.O.C. ; MORAIS, M.B. ; FAGUNDES-NETO, U. Hep-2-aherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, São Paulo, Brazil. **Emerg Infect Dis.**, v.8, p.855-858, 2002.

SCALETSKY, I.C.A. ; FABBRICOTTI, S.H. ; CARVALHO, R.L.B. ; NUNES, C.R. ; MARANHÃO, H.S. ; MORAIS, M.B. ; FAGUNDES-NETO, U. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northesast Brazil : a case-control study. **J Clin Microbiol.**, v.40, p. 645-648, 2001.

SCANVIC, A.; DENIC, F.; GAILLON, S.; GIRY, P.; ANDREMONT, A.; LUCET, J. Duration of colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after hospital discharge and risk factors for prolonged carriage. **Clin Infect Dis.**, 32: 489-495, 2001.

SCHEMBRI, M.A.; KJAERGARRD, K.; KLEMM, P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. **Mol Microbiol.**, v.48, p.253-267, 2003.

SCROEDER, C.M.; MENG, J.; ZHAO, S. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O26, O103, O111, O128, e O145 from animals and humans. **Emerg Inf Dis.**, v.8, p.1409-1411, 2002.

SHEIKH, J.; HICKS, S.; DALL'SAGNOL, M.; PHILLIPS, A.D.; NATARO, J.P. Roles for fis and yafk in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol Microbiol.**, v.41, p.983-997, 2001.

SHELTON, D.R.; KARNS, J.S.; HIGGINS, J.A.; VAN KESSEL, J.A.S.; PERDUE, M.L.; BELT, K.T.; RUSSELL-ANELLI, J.; DEBROY, C. Impactof microbial diversity on rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in surfacewaters. **FEMS Microbiol Lett.**, v.261, p. 95–101, 2006.

SINGER, R.S.; FINCH, R.; WEGENER, H.C.; BYWATER, R.; WALTERS, J.; LIPSITCH, M. Antibiotic resistance-the interplay between antibiotic use in animals and human beings. **Lancet Infect Dis.**, v.3, p.47-51, 2003.

SMITH, J.L.; FRATAMICO, P.M.; GUNTHER, N.W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathog Dis.**, v.4, p.134-163, 2007.

SONG, T.; TOMA, C.; NAKASONE, N. AND IWANAGA, M. Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method. **FEMS Microbiol Lett.**, v.243, p.259–263, 2005.

SOUZA, R.L.; NISHIMURA, L.S.; GUTH, B.E.C. Uncommon shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes o165:HNM as cause de hemolytic uremic syndrome in São Paulo, Brazil. **Diagnostic Microbiol Infect Dis.**, v.59, p.223-225, 2007.

STURMER, T.; ERB, A.; MARRE, R.; BRENNER, H. Prevalence and determinants of colonisation with antibiotic-resistance *Escherichia coli* in unselected patients attending general practitioners in Germany. **Pharmacoepidemiol Drug Saf**, v.13, p.303-308, 2004.

SUMMANEN, P.; BARON, E.J.; CITRON, D.M.; STRON, C.A.; WEXLER,H.M.; FINEGOLD, S.M. *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*. Star Publishing Company, **Belmont**, California, p.230, 1993.

TAYLOR DN, ECHEVERRIA P, SETHABUTR O, PITARANGSI C, LEKSOMBOON U, BLACKLOW NR, ROWE B, GROSS R, CROSS J. Clinical and microbiologic features of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infections detected by DNA hybridization. **J Clin Microbiol.**, v. 26, p.1362-1366. 1988.

TENOVER, F.C.; HUGHES, J.M. The challenges of emerging infectious diseases. Development and spread of multiply-resistant bacterial pathogens. **JAMA**, v.275, p.300-304, 1996.

TEKA, T.; FARUQUE, A.S.G.; FUCHS, G.J. Risk factors for deaths in under-age-five, v.85. p.1070-1075, 1996.

THOMPSON-CHAGOYÁN, O.C.; MALDONADO, J.; GIL, A. Colonization and Impacto f disease and Other Factor son Intestinal Microbiota. **Dig. Dis. Sci.**, v.52, p.2069-2077, 2007.

THORPE, C. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. **Clin Infect Dis**, v.38, p.1298-1303, 2004.

TOPOROVSKI, M.S.; MIMICA, I.M.; CHIEFFI, P.P.; PASCHOALOTTI, M.A.; DIAS, A.M.G.; SILVA, C.B. Diarréia aguda em crianças menores de 3 anos de idade: recuperação de enteropatógenos nas amostras fecais de pacientes comparada à de grupo controle. **L Pediatr** (Rio de Janeiro), v.75, p.97-104, 1999,

TOPRAK, N.U.; YAGCI, A.; GULLUOGLU, B.M.; AKIN, M.L.; DEMIRKALEM, P.; CELENK, T.; SOYLETIR, G. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. **Clin Microbiol Infect.**, v.12, p.782–786, 2006.

TRABULSI, L.R.; KELLER, R.; GOMES T.A.T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis.**, v.8, p.508-513, 2002.

TURNER, S.M.; SCOTT-TUCKER, A.; COOPER, L.M.; HENDERSON, I.R. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett.**, v.263, p.10-20, 2006.

TURRONI, F.; RIBBERA, A.; FORONI, E.; van SINDEREN, D.; VENTURA, M. Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functionality. **Ant Van Leeuwenhoek.**, v. 94, p. 35-50, 2008.

USEIN, C.R.; TATU-CHITOIU, D.; CIONTEA, S.; CONDEI, M.; DAMIAN, M. *Escherichia coli* pathotypes associated with diarrhea in Romanian children than 5 years of age. **J Infect Dis.**, v.62, p.289-293, 2009.

VALENTINER-BRANTH, P.; STEINSLAND, H.; FISCHER, T.K.; PERCH, M.; SCHEUTZ, F.; DIAS, F.; AABY, P.; MOLBAK, K.; SOMMERFELT, H. Cohort study of guinean children: Incidence, pathogenicity, conferred protection, and attributable risk of Enteropathogens during de first 2 years of life. **J Clin Microbiol.**, v.41, n.9, p.4238-4242, 2003.

VARGAS, L.J.; VILA, A.; LANZA, A.; BONVEHI, P.; NAZAR, J.; MIKIETUK, A.; LABAT, R.; SMAYEVSKY, J. Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y studios de sensibilidad antimicrobiana. **Acta Bioq Clin Lat.**, v.39, p.19-25, 2005.

VARGAS, M.; GASCON, J.; JIMENEZ DE ANTA, M. T. AND VILA, J. Prevalence of *Shigella* Enterotoxins 1 and 2 among *Shigella* Strains Isolated from Patients with Traveler's Diarrhea. **J Clin Microbiol.**, v.37, n.11, p.3608-3611, 1999.

VAZ, T.M.L.; IRINO, K.; KATO, M.A.M.F.; DIAS, A.M.G.; GOMES, T.A.T.; MEDEIROS, M.I.C. GUTH, B.E.C. Virulence properties and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **J Clin Microbiol.**, v.42, p. 902-905, 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. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, n.10, p.5362–5365, 2005.

VIEIRA, N.; BATES, S.J.; SOLBERG, O.D.; PONCE, K.; HOWSMON, R.; CEVALLOS, W.; TRUEBA, G.; RILEY, L.; EISENBERG, J.N.S. High prevalence of enteroinvasive *Escherichia coli* isolated in a remote region of Northern Coastal Ecuador. **Am J Trop Med Hyg**, v.76, p.528-533, 2007.

von BAUM, H.; MARRE, R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. **Int J Med Microbiol**, v.295, p.503-511, 2005.

VOLLAARD, E.J.; CLASENER, H.A.L. Colonization resistance. **Antim Ag Chem.**, v.38, p. 409-414, 1994.

YANG, C.M.; LIN, M.F.; LIN, C.H.; HUANG, Y.T.; HSU, C.T.; LIOU, M.L. Characterization of antimicrobial resistance patterns and integrons in human fecal *Escherichia coli* in Taiwan. **J Infect Dis.**, v.62, p.177-181, 2009.

YOUSSEF M, SHURMAN A, BOUGNOUX M, RAWASHDEH M, BRETAGNE S, STROCKBINE N. Bacterial, viral and parasitic enteric pathogens associated with acute diarrhea in hospitalized children from northern Jordan. **FEMS Immunol Med Microbiol.** , v.28, p. 257-263, 2000.

ZAMBONI, A.; FABBRICOTTI, S.H.; FAGUNDES-NETO, U.; SCARLETSKY, I.C.A. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. **J Clin Microbiol.**, v.42, n.3, p.1058-1063, 2004.

ZHANG, G.; WEINTRAUB, A. Identification of *Bacteroides fragilis* by co-agglutination, using a specific monoclonal antibody. **Anaerobe**, v. 3, p. 295-300, 1997.

Wakimoto, N.; Nichi, J.; Sheik, J.; Nataro, J.P.; Sarantuya, J.; Iwashita, M.; Manago, K.; Tozuda, K.; Yoshinaga, M.; Kawano, Y. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am J Trp Med Hyg**, v.71, p.687-690, 2004.

WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **J Med Microbiol.**, v.56, p.4-8, 2007.

WITTE, W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.14, p.321-325, 2000.

ANEXOS

ANEXO A: Parecer do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF
36036-900 JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

Parecer nº 281/2006

Protocolo CEP-UFJF: 903.209/2006 **FR:** 109707 **CAAE:** 0137.0.180.000-06

Projeto de Pesquisa: "INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE PATÓGENOS VIRAIS E BACTERIANOS ASSOCIADOS A MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NO TRATO GASTROINTESTINAL EM CRIANÇAS E ADULTOS NA ZONA DA MATA MINEIRA"

Pesquisador responsável: MARIA LUIZA DA ROSA E SILVA

Pesquisadores participantes: INA PIRES DE CARVALHO, CLÁUDIO GALUPPO DINIZ, SANDRA HELENA CERRATO TIBIRIÇÁ, JOSÉ PAULO GAGLIARDI LEITE, MARIA AUXILIADORA ROQUE DE CARVALHO, LUIZ DE MACEDO FARIAS, VÂNIA LÍCIA DA SILVA, MÔNICA COUTO GUEDES SEJANIS DA ROCHA, GILMARA SOARES DA SILVA

Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora – Instituto de Ciências Biológicas

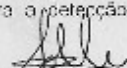
Sumário/comentários

O CEP analisou o Protocolo 903.209/2006, Grupo III e considerou que:

- O projeto encontra-se muito bem justificado, de acordo com objeto proposto para ser investigado e a revisão bibliográfica demonstrada. O valor científico da proposta é extremamente relevante no que diz respeito à importância da realização de estudos epidemiológicos que avaliem a variação de vírus encontrados em doenças do trato gastrointestinal, para que se possam estabelecer critérios, rotinas e tratamentos mais direcionados. De acordo com os pesquisadores, no Brasil, tais doenças são uma das mais frequentes na infância, sendo uma importante causa de procura por atendimento clínico. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a doença diarreica é a primeira ou a segunda maior causa de óbitos e estímulos apontam a ocorrência de cerca de um milhão de mortes anuais entre crianças com menos de cinco anos. Os pesquisadores descrevem vários tipos de vírus relacionados com as doenças gastrointestinais (os rotavírus, os vírus Norwalk, os astrovírus e os adenovírus, além das doenças causadas por ação bacteriana, principalmente pelos microrganismos anaeróbios do grupo *Bacteroides fragilis* e os anaeróbios facultativos do grupo dos bastonetes Gram negativos entéricas da família *Enterobacteriaceae* como *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* e *Shigella sp.* Os pesquisadores também justificam que a identificação convencional destes patógenos a partir de amostras fecais por cultura seletiva e características bioquímicas é complexa e dispendiosa; e que métodos moleculares têm sido desenvolvidos para detecção rápida destes microrganismos.

- Os objetivos gerais deste estudo são: (1) contribuir para a geração de dados epidemiológicos sobre a ocorrência de reservatórios naturais e etiologia de agentes virais e bacterianos envolvidos em manifestações clínicas de doenças do trato gastrointestinal no município de Juiz de Fora, na Zona da Mata Mineira e (2) Contribuir para formação de recursos humanos especializados (alunos de graduação e pós-graduação). Os objetivos específicos são: (1) detectar a presença de rotavírus e adenovírus nos espécimes fecais obtidos; (2) avaliar a incidência e a sazonalidade das rotaviroses; (3) caracterização fenotípica (por EGPA) e genotípica (por RT-PCR) das amostras de rotavírus detectadas; (4) detectar a presença de astrovírus e vírus Norwalk nos espécimes fecais obtidos; (5) isolar e identificar linhagens bacterianas dos gêneros *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* e *Shigella sp.*; (6) avaliar a ocorrência de linhagens de *B. fragilis* enterotoxigênicas e (7) Genotipar as diferentes linhagens bacterianas.

- Serão analisados pelo menos 500 amostras fecais provenientes de crianças apresentando manifestações clínicas do trato gastrointestinal de 0 a 5 anos de idade, atendidas na Policlínica de Bemfita (Regional Norte) e no Pronto Atendimento Infantil – PAI em Juiz de Fora. Os espécimes fecais serão colhidos nas unidades de saúde por enfermeiras previamente treinadas ou nos domicílios pelos responsáveis após as orientações passadas pelas enfermeiras. As amostras serão armazenadas em potes descartáveis e levadas ao Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do ICB/UFJF. As amostras serão codificadas para preservar o anonimato dos doadores cujos responsáveis deverão, no ato da coleta, consentir com sua utilização após leitura do TCLE. Além disso, os pesquisadores irão aplicar um questionário para coleta dos dados epidemiológicos pertinentes à pesquisa (tal questionário está anexado ao protocolo da pesquisa). Os pesquisadores descrevem detalhadamente como farão as análises necessárias para a detecção dos agentes virais e/ou bacterianos propostos.


Dra. Anujeta Maria Gollner
Coordenadora CEP - UFJF

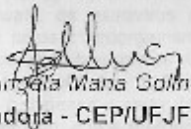


UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRORECTORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF
36369-6 - JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

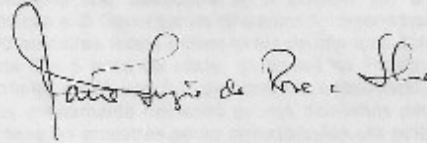
- A revisão e as referências bibliográficas sustentam os objetivos do estudo.
 - O orçamento foi apresentado de acordo com a planilha pertinente aos termos do Edital de Pesquisa FAPEMIG/SUS 006/2006, cujos formulários se encontravam-se em anexo. O custo final do projeto foi de R\$ 347.530,05, sendo R\$ 18.640,00 com gastos em diárias, R\$ 130.900,00 com gastos em material de consumo, R\$ 17.000,00 com gastos em passagens aéreas, R\$ 16.548,05 em gastos com despesas operacionais e R\$ 164.441,00 em gastos com aquisição de materiais permanentes. Todos estes gastos estão justificados na metodologia que será empregada na pesquisa.
 - O cronograma não está descrito em meses, a sim em Ano 1 e 2 e Meses de 01 a 12, em um total de 24 meses. Não há menção sobre a data de início e término do projeto. Os pesquisadores justificaram tal fato alegando que o início da pesquisa está condicionado a aprovação, assinatura do termo de outorga e liberação dos recursos pela FAPEMIG, de acordo com o edital 006/2006 desta mesma instituição.
 - O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, está em linguagem adequada, acessível à compreensão da metodologia e dos desfechos da pesquisa para os responsáveis pelos menores que participarão da pesquisa.
 - As qualificações dos pesquisadores são pertinentes ao tema de estudo proposto.
- Salientamos que os pesquisadores deverão encaminhar a este comitê o relatório final da pesquisa.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFJF, de acordo com as atribuições cefinidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pelo aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

SITUAÇÃO: Projeto Aprovado
Juiz de Fora, 23 de Novembro de 2006.


Prof. Dra. Aracélia Maria Gollner
Coordenadora - CEP/UFJF

Recabi em 24/11/06.


Paulo Sérgio de Paes e Silva

ANEXO B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CONFORME CAPÍTULO IV DA RESOLUÇÃO Nº. 196 DE 10 DE OUTUBRO 1996
DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE

“Investigação epidemiológica de patógenos virais, bacterianos e parasitas associados a manifestações clínicas no trato gastrointestinal, em crianças e adultos, na Zona da Mata Mineira.”

Responsável: Prof. Dra. Maria Luzia da Rosa e Silva
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – Tel.: 32293213.
Instituto de Ciências Biológicas - UFJF

Informações às participantes:

- O objetivo deste estudo é avaliar a ocorrência de vírus, bactérias e parasitas que possam estar associados à doenças do trato gastrointestinal em indivíduos que apresentam manifestação clínica no trato gastrointestinal, para fins epidemiológicos. Este estudo permitirá ações voltadas para estruturação de políticas de saúde que visem uma diminuição do risco de ocorrência e disseminação destas doenças na comunidade, além da produção de conhecimento para educação sanitária da população geral.
- Os participantes, voluntários, não serão submetidos a nenhum procedimento clínico invasivo. Uma alíquota de material fecal será obtida através de doação para análise científica nos laboratórios do ICB/UFJF. Não existe contato físico com os doadores e nem a possibilidade de qualquer risco físico para os participantes deste estudo.
- Os resultados da pesquisa serão sigilosos e divulgados apenas em veículos científicos sem nenhum tipo de identificação dos participantes;
- Este Termo foi elaborado em duas vias que devem ser preenchidas e assinadas pelos responsáveis legais dos menores e pelo pesquisador responsável. Uma das vias será entregue aos participantes e a outra será arquivada pelo pesquisador responsável.

Termo de consentimento pós-informação

Declaro que fui suficientemente informado a respeito dos objetivos da pesquisa e da ausência de contato físico e risco biológico e constrangimento moral durante ou após a realização da pesquisa.

Declaro, ainda, que concordo com a participação do menor sob minha responsabilidade na investigação sobre a ocorrência de vírus, bactérias e parasitas associados a manifestações clínicas no trato gastrointestinal, em Juiz de Fora, que não recebi qualquer tipo de pressão para que isso ocorresse e que os custos dos experimentos para pesquisa não serão de minha responsabilidade.

Estou ciente de que tenho a liberdade de desistir a qualquer momento de colaborar voluntariamente com a cessão do material clínico proveniente do menor sob minha responsabilidade na pesquisa em curso; não receberei qualquer pagamento e não haverá qualquer prejuízo pela colaboração voluntária neste estudo. Declaro, ainda, meu consentimento na utilização deste material para estudos futuros no Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do ICB/UFJF.

Responsável:		Assinatura:	
RG:	Endereço:	Telefone:	
Nome do menor:			

Pesquisador responsável:	Assinatura:
--------------------------	-------------

ANEXO C: Formulário de Coleta de Dados para Investigação Epidemiológica



Universidade Federal de Juiz de Fora
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia
Núcleo de Pesquisas em Doenças Infecto-Parasitárias

FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS PARA INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

Responsável: _____

Criança: _____

Idade: _____ **anos** **Sexo:** [M] [F] **Cor da pele:** [] Branca [] Negra [] Parda

Endereço: _____ **Data de início da doença:** ___/___/___

Data da coleta de fezes: ___/___/___ **Local da coleta:** _____

Colhidas fezes dos contactantes: [S] [N] **Vacina contra rotavírus:** [S] N° de doses [] - [N]

Medicamentos nos últimos 30 dias:

Antibióticos: [S] Citar _____ [N] **Antieméticos:** [S] - Oral [] Parenteral [] - [N]

Sintomas: [] Vômito [] Diarréia [] Febre (>37,8°C) [] Dor abdominal [] Dor de cabeça [] Coriza [] Tosse

1º Sintoma: [] Vômito [] Diarréia [] Febre (>37,8°C) [] Dor abdominal [] Dor de cabeça [] Coriza [] Tosse

Número de episódios de diarréia em 24h: [] 0-3 [] 3-5 [] Mais que 5

Número de episódios de vômito em 24h: [] 0-3 [] 3-5 [] Mais que 5

Desidratação: [S] [N] **Hidratação venosa:** [S] [N] **Hospitalização:** [S] [N]

Durante o dia a criança freqüenta: [] Creche pública [] Creche privada [] Escola pública [] Escola privada [] Berçário [] Domicílio com os pais [] Domicílio com babás [] Outros _____

Contactantes com sintomas semelhantes: [] Pai [] Mãe [] Irmão menor de 5 anos [] Irmão maior de 5 anos [] Babá [] Avós [] Tios [] Primos [] Cozinheira [] Colegas da escola [] Colegas da creche

Exame complementar de fezes: [S] [N] **Diagnóstico etiológico:** [S] [N]

Hipótese diagnóstica: [] Doença viral [] Doença bacteriana [] Doença parasitária [] Intolerância alimentar [] Intoxicação alimentar [] Outros _____

ANEXO D: Artigo Publicado na Revista Principia

ANEXO E: Artigo Submetido na Revista Epidemiology and Infection.