

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**  
**USO E CONSERVAÇÃO DE RECURSOS HÍDRICOS**

**VÍVIAN WALTER DOS REIS**

Fatores de risco da diarreia humana associado às  
condições de saneamento básico em Ouro Preto,  
MG.

**Orientadora:**

**Prof<sup>ª</sup>.Dr<sup>ª</sup>. Maria Célia S. Lanna**

Laboratório de Microbiologia – ICEB /UFOP

**OURO PRETO**  
**2007**

**VÍVIAN WALTER DOS REIS**

Fatores de risco da diarreia humana associado às  
condições de saneamento básico em Ouro Preto,  
MG.

**Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia ambiental com ênfase no  
Uso e Conservação de Recursos  
Hídricos da Universidade Federal de  
Ouro Preto.**

**Orientadora:**

**Prof<sup>ª</sup>.Dr<sup>ª</sup>. Maria Célia S. Lanna**

Laboratório de Microbiologia – ICEB /UFOP

**OURO PRETO**

2007

R375f

Reis, Vivian Walter dos.

Fatores de risco da diarreia humana aguda associado às condições de saneamento em Ouro Preto – MG [manuscrito] /Vivian Walter dos Reis. - 2007.

xii, 69f. : il., color; graf.; tabs.; mapas.

Orientadora: Profa. Maria Célia da Silva Lanna.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Mestrado em Engenharia Ambiental.

Área de concentração: Recursos hídricos.

1. Soroterapia - Teses. 2. Diarreia em crianças - Ouro Preto (MG) - Teses. 3. Abastecimento de água - Ouro Preto (MG) - Teses.  
I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 616.34-053.2(815.1)

Catálogo: [sisbin@sisbin.ufop.br](mailto:sisbin@sisbin.ufop.br)



**UFOP**  
Universidade Federal  
de Ouro Preto

Ministério da Educação  
Universidade Federal de Ouro Preto  
Programa de Mestrado em Engenharia Ambiental  
ICEB - Campus – Morro do Cruzeiro  
Ouro Preto – MG – CEP 35.400-000  
Fone: (031)3559-1725  
E-mail: [proagua@iceb.ufop.br](mailto:proagua@iceb.ufop.br)

*“Fatores de risco da diarreia humana associado às condições de saneamento básico em Ouro Preto-MG”*

*Autor: Vivian Walter dos Reis*

Dissertação defendida e aprovada, em 09 de novembro de 2007, pela banca examinadora constituída pelos professores

---

**Professora Dr<sup>a</sup>. Maria Célia Silva Lanna**  
**Universidade Federal de Ouro Preto**

---

**Professora Dr<sup>a</sup>. Juliana Calabria de Araújo**  
**Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais**

---

**Professor Dr. Luiz Henrique Rosa**  
**Universidade Federal de Ouro Preto**

Esta dissertação é dedicada a meus pais, Garibaldi e Consolação, minhas irmãs, Débora e Ludmilla, e ao meu namorado e amigo Renato, que sempre foram meus alicerces da construção da minha caminhada.

*“A força não provém da capacidade física e sim de uma vontade indomável”.*

Mahatma Ghandi

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter colocado em meu caminho pessoas especiais que foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

À minha orientadora, Professora Dra. Maria Célia da Silva Lanna, por toda a doação para o meu aprimoramento científico, além da amizade e prazerosa convivência.

Á querida amiga Syomara Ker de Mello.

Aos colegas do curso de mestrado - turma 2005, em especial ao Gerson Oscar.

Aos Professores do laboratório de microbiologia: Gabriela e Luiz Henrique.

Aos técnicos Marly de Lurdes Lessa e Luiz Nicolau dos Reis.

A todos os amigos do Laboratório de Microbiologia pela maravilhosa convivência durante todos esses anos, em especial à Lorena Fagundes Coelho que comigo compartilhou muitos momentos de angústia.

Às Secretárias dos departamentos de Ciências Biológicas: Wanda, Marta e Eloísa e do Mestrado de Engenharia Ambiental: Fátima e Patrícia

À todas as coordenadoras das creches de Ouro Preto, de forma especial à Maria das Mercês e Débora Dutra, à Diretora da Escola municipal Sonho de Criança, Letícia Jardim e à todos enfermeiros da Santa Casa – Hospital Geral de Ouro Preto pela ajuda na aquisição do material clínico.

Ao professor Francisco Barreto pelo fundamental auxílio nas análises estatísticas.

Aos meus pais, minhas irmãs e meu namorado a contribuição fundamental para o transporte aos locais de coleta.

À todos os pais das crianças, que generosamente concordaram em ajudar para esta pesquisa.

## RESUMO

No presente trabalho, determinou-se a prevalência de patógenos em pacientes com diarreia na população infantil de Ouro Preto, Minas Gerais, no período de Julho/2006 a Março/2007 utilizando técnicas bacteriológicas e tipagens sorológicas rotineiras. Os patógenos bacterianos isolados dos pacientes, em ordem decrescente foram: sorotipos diarreiogênicos de *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. O Patógeno isolado em maior frequência foi *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC) (76%), seguida por *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (44%) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (12%). Detectou-se 24 % de *Giardia* sp. nos exames parasitológicos. Além disso, rotavírus foi detectado em 18% dos casos diarreicos. Para avaliar a significância estatística desses resultados utilizou-se o teste  $\chi^2$  (qui-quadrado), além do teste exato de Fischer comparando os grupos de pacientes testados e grupos controle. O valor de  $p < 0.005$  foi considerado por ser significativo. A resistência a antibióticos foi observada em alguns dos sorogrupos de *E. coli* obtidos de amostras clínicas. Recentemente, realizou-se investigações da qualidade microbiológica da água na cidade de Ouro Preto. Os agentes etiológicos de maior destaque, detectados nas amostras clínicas, assim como o perfil de resistência bacteriana a antibióticos, no presente trabalho foram semelhantes aos resultados obtidos na investigação de qualidade de água na mesma localidade. Os fatores sócio-econômicos, condições de moradia, presença de fossa, tipo de água, índice de bens de consumo ou renda per capita foram relacionados com o tipo de água consumida. Os dados sugerem uma relação entre tipo de fonte de água, condições sanitárias e a ocorrência de doenças usualmente transmitidas pela água. A análise conjunta de todos os dados obtidos possibilitou concluir que os consideráveis índices de contaminação previamente detectados em Ouro Preto parecem estar contribuindo para a prevalência das diarreias infecciosas. O presente estudo, assim como outros nesta linha, oferecem subsídios para os planejamentos da administração municipal de Ouro Preto quanto ao saneamento e saúde coletiva.

Palavras-chave: Diarreia infantil, *Escherichia coli*, sorotipos, água



## ABSTRACT

The prevalence of bacterial, parasitic and viral pathogens in infantile patients with diarrhea in community from July/2006 to March/2007 in Ouro Preto, Minas Gerais state, was determined using routine bacteriology and serotyping assay techniques. Bacterial pathogens isolated from patients were, in decreasing frequency: diarrheogenic *Escherichia coli* serotypes and *Salmonella* sp. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) was the most frequent (76%) pathogen isolated, followed by Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) (44%) and Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) (12%). Parasitic examination of diarrheic samples resulted in 24% positives to *Giardia* sp. Moreover Rotavirus (18%) was also detected. Chi-square test and Fischer's Exact Test were used to compare differences between the tests and control groups. A p-value of  $< 0.005$  was considered to be significant. Antimicrobial resistance was observed among some *E. coli* serotypes isolated from clinical samples. Previously, in Ouro Preto city, it has been done a study about the microbiology water quality, at the same community. The results of the present study from clinical samples were similar to this previously study, regarding the ethiological agents and antibiotic resistance profile. The socioeconomic factors, house quality, latrine ownership, type of water source were correlated with water use. Implications of these simple household water correlated with water sources and more deficient sanitary facilities for potential water borne disease transmission were briefly discussed. Finally, it could be concluded that data obtained from community-based study correlated with the high degree of contamination of drinking water in households previously studied will enable the justification of Ouro Preto to plan relevant studies on diarrhea and other diseases transmitted by contaminated water route.

Key-words: Infantile Diarrhea, *Escherichia coli*, serotypes, water

## SUMÁRIO

---

AGRADECIMENTOS .....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
1 – INTRODUÇÃO .....	01
1.1- Água, diarreia, saneamento e saúde .....	01
1.2 – Conceito de diarreia .....	02
1.3 – Principais fatores de risco associados à doença diarreica .....	03
1.3.1 – Influência do saneamento e situação sócio-econômica sobre a prevalência das diarreias .....	03
1.3.2 – Distribuição dos Enteropatógenos .....	04
1.4 – A etiologia das diarreias mais prevalentes no Brasil .....	10
1.4.1 – Caracterização dos diferentes tipos de <i>Escherichia coli</i> .....	10
1.4.2 – Os diferentes grupos patogênicos de <i>E. coli</i> .....	10
1.4.3 – Perfil de resistência das <i>Escherichia coli</i> diarreio gênicas aos antibióticos no agravamento das diarreias .....	14
1.5 – Outros patógenos envolvidos na etiologia das diarreias no Brasil .....	14
1.6 – O quadro das diarreias no município de Ouro Preto .....	17
2 – OBJETIVOS .....	18
2.1 – Objetivo Geral .....	18
2.2 – Objetivos Específicos .....	18
3 – MATERIAL E MÉTODOS .....	19
3.1 – Período e área de estudo .....	19
3.2 – Amostragem do material clínico e da água de consumo de Ouro Preto.....	22
3.3 – Inquérito clínico e epidemiológico dos pacientes e crianças controle .....	22
3.4 – Encaminhamento laboratorial das amostras Fecais .....	25
3.5 – Pesquisa dos principais patógenos diarreio gênicos .....	25
3.5.1 – Enterobactérias patogênicas .....	25
3.5.1.1 – Sorotipagem das linhagens de <i>E. coli</i> isoladas de material clínico.....	26
3.5.2.2 – Investigação do perfil de resistência dos antibióticos dos isolados de <i>E. coli</i>	26
3.5.1.3 – Fermentação do sorbitol e diferenciação dos isolados de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica .....	27

3.6 – Pesquisa Parasitológica .....	28
3.7 – Pesquisa do Rotavírus .....	28
3.8 – Determinação da significância estatística dos enteropatógenos isolados das amostras Clínicas .....	28
3.9 – Listagem de dados previamente obtidos para a determinação de água de consumo de Ouro Preto como fonte de enteropatógenos .....	29
3.9.1 – Amostragem e testes com água de consumo .....	29
3.9.1.1 – Isolamento e identificação de enterobactérias e patógenos entéricos da água de consumo .....	29
3.9.1.2 – Srotipagem das bactérias <i>Escherichia coli</i> isoladas de água .....	29
4 – RESULTADOS .....	30
4.1 – Análise da água de diferentes pontos do município de Ouro Preto .....	30
4.2 – Avaliação dos questionários clínicos e epidemiológicos da população estudada.	30
4.2.1 – Distribuição dos casos diarréicos em faixas etárias.....	31
4.2.2 – Renda familiar e escolaridade dos pais dos pacientes .....	31
4.2.3 – Sintomatologia dos episódios clínicos dos casos diarréicos investigados.....	33
4.2.4 – Infecções múltiplas associadas ao Rotavírus, enterobactérias e protozoários nos casos diarréicos estudados .....	34
4.3 – Principais enterobactérias isoladas .....	34
4.4 – Sorotipos patógenos de <i>E. coli</i> isolados de material clínico.....	35
4.5 – Perfil de susceptibilidade aos antibióticos das linhagens patogênicas de <i>E. coli</i> isoladas .....	36
4.6 – Confirmação bioquímica das linhagens de EHEC pela ausência de fermentação de sorbitol .....	41
4.7 – Pesquisa Parasitológica .....	43
4.8 – Frequência do Rotavírus nas amostras investigadas .....	43
4.9 – Análise estatística .....	44
4.9.1 – Comparação entre as amostras e Fezes (estudo atual) com dados de amostra de Água (estudo anterior) .....	44
4.91.1 – Identificados de sorotipos de <i>E. coli</i> pela técnica de aglutinação em lâmina ..	44
4.91.2 – Padrão de resistência dos sorotipos patogênicos aos antibióticos por sistema de distribuição da cidade de Ouro Preto .....	45
4.9.2 – Verificação da Significância Estatística .....	47
5 – DISCUSSÃO .....	48
5.1 - A água e demais componentes do saneamento de Ouro Preto como Patrimônio Nacional .....	48
5.2 - O Saneamento básico de Ouro Preto .....	48
5.3 – A correlação entre saneamento básico e diarreia .....	49
5.3.1- Indicadores culturais, sócio-econômicos e das condições sanitárias na prevalência das diarreias em Ouro Preto .....	50

5.3.2 – Enteropatógenos como fatores de risco das diarreias em Ouro Preto .....	51
5.3.2.1 - Os parasitas na etiologia das diarreias em Ouro Preto .....	52
5.3.2.2 – Rotavírus na etiologia das diarreias em Ouro Preto .....	52
5.3.2.3 – Enterobactérias na etiologia das diarreias em Ouro Preto .....	52
5.3.3 – Multi-resistência a antibióticos como fator de risco das diarreias em Ouro Preto .....	55
5.3.4 – Intervenções no sistema de saneamento em Ouro Preto nos últimos 14 anos ....	56
6 – CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES .....	57
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58
8 – ANEXO (Meio Carry & Blair modificado) .....	69

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Características dos casos associados aos principais parasitas .....	6
Tabela 2 – Características dos casos associados aos principais tipos bacterianos .....	7
Tabela 3 - Características dos casos associados aos principais tipos virais .....	9
Tabela 4 - Antibióticos, sigla e concentrações com respectivo perfil de sensibilidade fornecido por fabricante .....	27
Tabela 5 – Valores do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Termotolerantes por sistemas de abastecimento de água e pontos de coleta	30
Tabela 6 - Análise estatística das frequências de isolamento dos enteropatógenos nos 50 casos de diarreia e 10 controles .....	47

## Lista de Figuras

Figura 1: Localização do município de Ouro Preto e suas fronteiras .....	19
Figura 2: Apresentação da incidência de diarreias nas diferentes faixas etárias em crianças de 0 a 6 anos em Ouro Preto .....	31
Figura 3: Renda familiar dos pacientes expressa em número de salários mínimos .....	32
Figura 4: Escolaridade dos Pais dos Pacientes .....	32
Figura 5: Apresentação da frequência de recidivas e dos sinais clínicos associados as diarreias estudadas .....	33
Figura 6: Frequência dos enteropatógenos nas infecções múltiplas detectadas .....	34
Figura 7: Número dos Sorotipos identificados de <i>E. coli</i> pela técnica de aglutinação em lâmina .....	35
Figura 8: Porcentagens dos perfis de sensibilidade de cada antibiótico contra amostras de EPEC positivas .....	36
Figura 9: Porcentagens dos perfis de sensibilidade de cada antibiótico contra amostras de EHEC positivas .....	37
Figura 10: Porcentagens dos perfis de sensibilidade de cada antibiótico contra amostras de EIEC positivas .....	38
Figura 11: Perfil de Multi-resistência apresentada na amostra 2 colônia C .....	39
Figura 12: Perfil de Multi-resistência apresentada na amostra 14 colônia B .....	40
Figura 13: Perfil de Multi-resistência apresentada na amostra 17 colônia A .....	41
Figura 14: Teste negativo da fermentação do sorbitol, indicativo de <i>E. coli</i> Enterohemorrágica (EHEC).....	42
Figura 15: Teste positivo da fermentação do sorbitol que bioquimicamente exclui o sorotipo EHEC.....	42
Figura 16: Porcentagem de Amostras positivas na detecção de Rotavírus .....	43
Figura 17: Frequência dos sorotipos patogênicos de <i>E. coli</i> das fezes (estudo atual) e da água (estudo anterior) .....	44
Figura 18: Comparação da resistência aos antibióticos dos patógenos encontrado na água (estudo anterior) e fezes diarreicas (estudo atual) no Sistema de Distribuição Saramenha .....	45

Figura 19: Comparação da resistência aos antibióticos dos patógenos encontrado na água (estudo anterior) e fezes diarréicas (estudo atual) no Sistema de Distribuição Itacolomi .....	45
Figura 20: Comparação da resistência aos antibióticos dos patógenos encontrado na água (estudo anterior) e fezes diarréicas (estudo atual) no Sistema de Distribuição Piedade .....	46
Figura 21: Comparação da resistência aos antibióticos dos patógenos encontrado na água (estudo anterior) e fezes diarréicas (estudo atual) no sistema de distribuição Jardim Botânico .....	46

## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 – Água, diarreia, saneamento e saúde.

Os ambientes aquáticos são utilizados em todo o mundo com distintas finalidades, entre as quais se destacam o abastecimento de água, a geração de energia, a irrigação, a navegação, a aquicultura e a harmonia paisagística. Além disso, a água representa o principal constituinte de todos os organismos vivos.

No entanto, nas últimas décadas, esse precioso recurso vem apresentando forte influência da urbanização, atividades industriais e agropecuárias e sendo ameaçado pelas ações indevidas do homem. Isso acaba resultando em prejuízo para a própria humanidade devido à vários efeitos como os desmatamentos e outros dentre os quais se destaca a grande quantidade de despejos isentos de controle lançados nos corpos receptores (Semenza *et al.*, 1998; Borges *et al.*, 2002; Meirelles-Pereira *et al.*, 2002; Moraes & Jordão, 2002). Esses despejos provocam sérias conseqüências para a saúde dos homens como a ocorrência de várias doenças provocadas pelo consumo da água não tratada (Teixeira *et al.*, 2006).

Atualmente sabe-se que a cada 14 segundos, morre uma criança vítima de doenças de veiculação hídrica. Estima-se que 80% de todas as moléstias e mais de um terço dos óbitos dos países em desenvolvimento sejam causados pelo consumo de água contaminada e, em média, até um décimo do tempo produtivo de cada pessoa é perdido devido a doenças relacionadas à água (Moraes & Jordão, 2002; Albert *et al.*, 1995; Echeverria *et al.*, 1993).

Das moléstias referidas, uma das mais importantes é a diarreia, doença que é a maior causa de mortalidade e morbidade de crianças de até cinco anos (Benício *et al.*, 1987; Albert *et al.*, 1995; Andrade *et al.*, 1999; Benício & Monteiro, 2000; Sabrá, 2002; Pontual *et al.*, 2006). Embora as possibilidades de veiculação dos agentes causadores da diarreia já estejam fortemente definidas por consumo de alimentos (Tomasi *et al.*, 1994; Venkateswaran, *et al.*, 1997; Silva, 2001) e a manipulação de portadores assintomáticos (Sales & Goulart, 1997; Tomasi *et al.*, 1994), a transmissão hídrica constitui a de maior importância na abordagem epidemiológica das diarreias ao longo da história da humanidade (Tomasi *et al.*, 1994; Semenza, *et al.*, 1998; Moraes & Jordão, 2002).



## 1.2 – Conceito de diarreia

A diarreia consiste no aumento do número de evacuações (fezes não necessariamente líquidas) e/ou a presença de fezes amolecidas ou até líquidas. Variam de leves até as graves, duram de dois a quatorze dias e possuem etiologia presumivelmente infecciosa (viral, bacteriana ou parasitária) (Solarte *et al.*, 2006). A diarreia é a mais importante causa clínica de morte infantil e os agentes mais frequentemente isolados das fezes das crianças com diarreia são: *Shigella* sp., *Salmonella* sp. (Presterl *et al.*, 2003; Kapoor *et al.*, 2006), *Escherichia coli* enteroagregativa (EA<sub>g</sub>EC ou EAEC), *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC) (Oliva *et al.*, 1997; Afset *et al.*, 2004;), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) (Abu-Elyazeed *et al.*, 1999), *Giardia lamblia* (Franco *et al.*, 2001), *Cryptosporidium* sp. (Mangini, 1992; Oshiro, 2000; Carvalho-Almeida, 2006) e Rotavírus (Lanna, 1993).

A frequência de isolamento dos diferentes agentes varia de acordo com a distribuição geográfica, a faixa etária e a condição sócio-econômica da população estudada e o período sazonal (Tomasi *et al.*, 1994; França *et al.*, 2001; Souzal *et al.*, 2002). Diversos estudos realizados em centros urbanos de países em desenvolvimento têm mostrado a *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC) como o principal agente isolado em crianças menores de dois anos e, em especial, naquelas pertencentes às classes sócio-econômicas menos favorecidas (Oliva *et al.*, 1997).

Na diarreia, a perda de líquido pode levar a formas graves. A desidratação e os distúrbios eletrolíticos determinam a maior letalidade, principalmente quando associadas a desnutrição prévia. A perda de líquido resulta em redução do volume do líquido extracelular, do volume intravascular e diminuição da pressão arterial. Além do colapso circulatório, outros distúrbios estão relacionados aos eletrólitos perdidos pelo corpo no líquido diarreico como a acidose metabólica hipervolêmica ou hipocalcemia (Constanzo, 1999). Dentre os mecanismos de diarreias, conforme apresentado por Rodrigues, 2002, pode-se citar: diarreia exudativa, diarreia motora, diarreia osmótica e diarreia secretora, descritas a seguir:

### **Diarreia exudativa**

Ocorre devido a lesões inflamatórias ou exudativas da mucosa do intestino delgado ou grosso causadas por bactéria invasoras, a exemplo da *Salmonella* sp. e parasitas, bem como por doenças de origem não infecciosa.

#### **Diarréia motora**

Resultante da alteração da motilidade intestinal, com mais intensidade nas causadas pelo Rotavírus, podendo também aparecer em casos não infecciosos.

#### **Diarréia Osmótica**

É a diarréia causada pela presença em excesso de solutos osmoticamente ativos na luz intestinal. A doença por Rotavírus e a giardíase podem ser alguns dos motivos para o surgimento de casos diarréicos deste tipo. Além desses patógenos, esta forma de diarréia pode ocorrer devido a outros fatores de natureza não infecciosa como anomalias bioquímicas congênitas.

#### **Diarréia secretora**

É a forma de diarréia mais comum de ocorrer devido a infecção por microrganismos. Também pode se dar devido a agentes não infecciosos como prostaglandina, neurotransmissores colinérgicos, hormônios gastrointestinais e medicamentos.

### **1.3 – Principais fatores de risco associados à doença diarréica**

A prevalência e morbidade das diarréias são determinadas pelo grau de saneamento local, situação sócio-econômica da população e distribuição dos agentes etiológicos e seu potencial patogênico (Sabrá, 2002).

#### **1.3.1 – Influência do saneamento e situação sócio-econômica sobre a prevalência das diarréias**

A diarréia é um dos mais importantes problemas de saúde enfrentados por todo o mundo, principalmente pelos países em desenvolvimento (Benício & Monteiro, 2000; Sabrá, 2002) levando-se em conta aspectos locais na sua prevalência e patogenicidade. Nas regiões carentes, onde é baixo o poder aquisitivo, onde as condições de saneamento

são precárias, a poucos quilômetros dos centros urbanos, ou nas favelas, a mortalidade infantil é superior a 100, e a diarreia é responsável por mais de 50% destes óbitos, causada principalmente por bactérias. Por outro lado, nas regiões urbanas, com água encanada e esgoto sanitário, região habitada por populações educadas e de alto poder aquisitivo, onde a mortalidade infantil é inferior a 20, a diarreia é responsável por menos de 1% dos óbitos, prevalecendo como principal agente causal o vírus (Sabrá, 2002). Apesar dos números de mortalidade por diarreia ainda serem críticos, houve redução substancial nas décadas de 80 e 90 com o advento da terapia da reidratação oral, implantada desde 1980, por meio do Programa de Controle da Doença Diarréica da Organização Mundial de Saúde (OMS) (Pontual *et al.*, 2006).

O Brasil é um país continental, com regiões ricas e industrializadas cercadas por bolsões de extrema pobreza. Lado a lado convivem indivíduos educados e que dispõem de todo o conforto disponível do século XXI, com populações carentes sem noções mínimas de higiene e sem água encanada a seu dispor. Se para o primeiro grupo a renda *per capita* ultrapassa a 20 salários mínimos, e suas residências, em zona urbana, têm o conforto do saneamento básico, para o segundo grupo não se fala em renda *per capita*, pois a maioria não ganha sequer o salário mínimo (Sabrá, 2002). Dados do Ministério da Saúde indicam que a diarreia ocupa o segundo lugar entre as causas de morte (DATASUS, 2007) e de hospitalização no Brasil. (Pontual *et al.*, 2006).

### **1.3.2 – Distribuição dos Enteropatógenos**

A qualidade da água está proximamente relacionada com a saúde humana (Semenza *et al.*, 1998). São os esgotos e os excrementos humanos uma das principais causas da deterioração da qualidade das águas, visto que muitos patógenos humanos são veiculados pelas fezes que contaminam aquíferos. Esses patógenos são agentes de importantes doenças como hepatites, poliomielites e diarreias.

*Salmonella typhi* e *Vibrio cholerae* são as bactérias patogênicas mais frequentemente transmitidas por via hídrica (Moore, 1994; Ângulo *et al.*, 1997). O *V. cholerae*, além da água, pode ser transmitido pelo consumo de mariscos contaminados. Estas bactérias podem sobreviver por até 87 dias na água de abastecimento público (Rivera & Martins, 1996).

Uma outra espécie de bactéria, normalmente inofensiva, mas que possui determinados sorogrupos que podem causar doença intestinal é a *Escherichia coli*.

Além dessa infecção, essa espécie bacteriana também pode se encontrar associada a infecções urinárias e meningites de recém-nascidos (Robbins-Browne, 1987).

Os vírus, em geral, não são habitantes normais da microbiota intestinal, eles só são excretados por indivíduos infectados. Porém, os vírus não envelopados (como os vírus transmitidos pela água) possuem maior estabilidade frente aos fatores ambientais e aos tratamentos de água em comparação com outros vírus e bactérias (Payment *et al.*, 1995). Esse é um dos fatores que fazem com que alguns autores como Mehnert (2001) queiram incluir os vírus como indicadores biológicos de qualidade das águas. Dentre os vírus transmitidos por via hídrica se incluem os Poliovírus, o Vírus da Hepatite A, além de outros vírus associados às gastroenterites.

Nas tabelas 1, 2, e 3, que se seguem, estão apresentados, respectivamente, os patógenos parasitários, bacterianos e virais mais comuns de provocarem infecções diarréicas, mundialmente distribuídos (Moraes & Jordão, 2002). Esses quadros mostram, para cada agente etiológico, a faixa etária dos pacientes de maior prevalência, bem como os sinais clínicos, período de incubação e duração da doença, além do modo de transmissão mais freqüente de cada patógeno. Segundo Moraes e Jordão (2002), a combinação desses dados possibilita uma avaliação comparativa de modo a estabelecer o panorama de agravamento da doença diarréica associada a cada enteropatógeno.

Tabela 1 – Características dos casos associados aos principais parasitas (BRASÍLIA, 2006)

Agente	Grupo etário dos casos	Clínica			Período de incubação	Duração da Doença	Modo de Transmissão
		Diarréia	Febre	Abdômen			
<i>Balantidium coli</i>	Ignorado	Eventual com muco ou sangue	Rara	Dor	Ignorado	Ignorado	Fecal-oral, alimentos, água
<i>Cryptosporidium</i>	Crianças e adultos com AIDS	Abundante e aquosa	Eventual	Câimbra eventual	1 a 2 semanas	4 dias a 3 semanas	Fecal-oral, alimentos, água, pessoa a pessoa, alimentos domésticos
<i>Entamoeba histolytica</i>	Todos, principalmente adultos	Eventual com muco ou sangue	Variável	Cólica	2 a 4 semanas	Semanas a meses	Fecal-oral, alimentos, água
<i>Giardia lamblia</i>	Todos, principalmente crianças	Incoercível fezes claras e gordurosas	Rara	Câimbras Distensão	5 a 25 dias	Semanas a anos	Fecal-oral, alimentos, água
<i>Isoospora belli</i>	Adultos com AIDS	Incoercível	Ignorado	Ignorado	2 a 15 dias	2 a 3 semanas	Fecal-oral

Tabela 2 – Características dos casos associados aos principais tipos bacterianos (BRASÍLIA, 2006)

Agente	Grupo etário dos casos	Clínica			Período de incubação	Duração da Doença	Modo de Transmissão
		Diarréia	Febre	Abdômen			
<i>Bacillus cereus e Staphylococcus aureus</i>	Todos	Geralmente pouco importante	Rara	Comum	1 a 6 horas	< 24 horas	Alimentos
<i>Campylobacter</i>	Todos	Pode ser desintérica	Variável	Variável	1 a 7 dias	1 a 4 dias	Fecal-oral, alimentos, água, animais domésticos
<i>E. coli enterotoxigênica</i>	Todos	Aquosa, pode ser profusa	Variável	Eventual	12 a 3 dias	3 a 5 dias	Fecal-oral, alimentos, água, pessoa a pessoa
<i>E. coli enteropatogênica</i>	Crianças	Aquosa, pode ser profusa	Variável	Variável	2 a 7 dias	1 a 3 semanas	Fecal-oral, alimentos, água, pessoa a pessoa
<i>E. coli enteroinvasora</i>	Adultos	Pode ser desintérica	Comum	Eventual	2 a 3 dias	1 a 2 semanas	Fecal-oral, alimentos, água, pessoa a pessoa
<i>E. coli enterohemorrágica</i>	Todos	Inicia aquosa com sangue a seguir	Rara	Comum	3 a 5 dias	1 a 12 dias	Fecal-oral, alimentos, pessoa a pessoa
<i>Salmonella não tifóide</i>	Todos, principalmente crianças	Pastosa, aquosa, as vezes com sangue	Comum	Eventual	8 horas a 2 dias	7 a 5 dias	Fecal-oral, alimentos, água

Continuação da Tabela 2

Agente	Grupo etário dos casos	Clínica			Período de incubação	Duração da Doença	Modo de Transmissão
		Diarréia	Febre	Abdômen			
<i>Shigella</i> sp.	Todos, principalmente crianças	Pode ser desintérica	Comum	Eventual	1 a 7 dias	4 a 7 dias	Fecal-oral, alimentos, água, pessoa a pessoa
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Todos	Mucosa, as vezes com sangue	Comum	Eventual	2 a 7 dias	1 dia a 3 semanas	Fecal-oral, alimentos, água, pessoa a pessoa, animais domésticos
<i>Vibrio cholerae</i>	Todos, principalmente adultos	Pode ser profusa e aquosa	Geralmente afebril	Comum	7 horas a 5 dias	3 a 5 dias	Fecal-oral, alimentos, água

Tabela 3 - Características dos casos associados aos principais tipos virais (BRASÍLIA, 2006)

Agente	Grupo etário dos casos	Clínica		Período de Incubação	Duração da Doença	Modo de transmissão e principais fontes
		Febre	Vômito			
Astrovírus	Crianças pequenas e idosos	Eventual	Eventual	1 a 14 dias	1 a 14 dias	Fecal-oral, alimentos, água
Calicivírus	Crianças e adultos	Eventual	Comum em crianças	1 a dias	1 a 3 dias	Fecal-oral, alimentos, água, nosocomial
Adenovírus entérico	Crianças pequenas	Comum	Comum	7 a 8 dias	8 a 12 dias	Fecal-oral, nosocomial
Norwalk	Crianças maiores e adultos	Raiva	Comum	18 horas a 2 dias	12 horas a 2 dias	Fecal-oral, alimentos, água, pessoa a pessoa
Rotavírus do grupo A	Crianças pequenas	Comum	Comum	1 a 3 dias	5 a 7 dias	Fecal-oral, nosocomial, alimentos, água, pessoa a pessoa
Rotavírus do grupo B	Crianças e adultos	Rara	Variável	2 a 3 dias	3 a 7 dias	Fecal-oral, água, pessoa a pessoa
Rotavírus do grupo C	Crianças e adultos	Ignorado	Ignorado	1 a 2 dias	3 a 7 dias	Fecal-oral



## **1.4 – A etiologia das diarreias mais prevalentes no Brasil**

As diarreias mais prevalentes no Brasil até agora listadas, são associadas principalmente ao Rotavírus do tipo A, aos tipos diarreio gênicos de *E. coli* e os parasitas, destacando os protozoários (Medeiros *et al*, 2001). A semelhança dos demais países em desenvolvimento as maiores frequências se associam às *E. coli* diarreio gênicas seguidas pelo Rotavírus (Fagundes-Neto & Skaletsky, 2000)

### **1.4.1 – Caracterização dos diferentes tipos de *Escherichia coli***

A *Escherichia coli*, espécie bacteriana pertencente à família enterobacteriaceae é encontrada comensalmente no intestino de animais de sangue quente. Porém, eventos de transferência horizontal de genes permitiram a modificação de algumas *E. coli* de comensais para patógenos intestinais (Clarke, 2001). Essas *E. coli* patogênicas provocam, principalmente a diarreia, doença que pode ser provocada por vários outros patógenos.

Todos os membros dessa espécie podem crescer rapidamente em condições aeróbias e anaeróbias (anaeróbios facultativos) numa variedade de tipos de meios de cultura, pois apresentam exigências nutricionais muito simples. São bactérias que possuem a capacidade de fermentarem a glicose, reduzirem nitrato a nitrito, como característica dos demais da família, serem catalase positivas e produzirem indol a partir de triptofano. Atualmente são descritos seis tipos de *E. coli*: *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC ou STEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) e *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC) (Guth, 2000; Clarke, 2001; Sabrá, 2002; Campos *et al.*, 2004; Kaper *et al.*, 2004).

### **1.4.2 - Os diferentes grupos patogênicos de *Escherichia coli***

A *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC) é o principal agente etiológico causador da diarreia aguda em menores de 2 anos de idade nos países pobres (Oliva *et al.*, 1997; Nataro & Kaper, 1998; Afset *et al.*, 2004) e, frequentemente, está associada a

casos de diarreia persistentes. Vários estudos têm demonstrado que as EPEC são responsáveis por mais de 30% dos casos de diarreias no Brasil (Gomes *et al.*, 1991; Toledo *et al.*, 1983) e resultados semelhantes foram observados em outras regiões como na Cidade do México e no Chile (Cravioto *et al.*, 1991; Levine *et al.*, 1993).

A doença ocorre devido a aderência de bactérias a membrana plasmática do enterócito, causando destruição das microvilosidades intestinais (Afset *et al.*, 2004; Clarke, 2001), resultando na perda das propriedades absorptivas das células infectadas, provocando diarreia aquosa, às vezes com sangue, acompanhada por febre, cólicas e vômito, sendo na maioria dos casos necessário o acompanhamento médico (Oliva *et al.*, 1997). A aderência é mediada por uma proteína da membrana externa, a intimina (Phillips *et al.*, 2000). Não foi encontrada toxina como mecanismo de virulência da bactéria (Clarke, 2001).

A *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) teve a sua importância reconhecida como agente causador de diarreia na década de 1970 e, a partir dessa data, grande quantidade de informações sobre a epidemiologia e patogênese das ETEC tem sido acumuladas (Clarke, 2001). As linhagens de ETEC causam diarreia aguda em humanos e animais em todo o mundo (Guth, 2000; Kaper *et al.* 2004; Nardi *et al.*, 2005), sendo a causa mais comum de diarreia em crianças nos países subdesenvolvidos e em viajantes dessas áreas (Cravioto, *et al.*, 1991; Echeverria *et al.*, 1993; Gastra & Svennerholm, 1996). Nos animais, estudos revelam que ETEC é o agente causador de cerca de um terço das diarreias em leitões (Bequsoleil *et al.*, 2002) e estão associadas com baixas condições de higiene e saneamento (Clarke, 2001)

Como a maioria dos agentes enteropatogênicos, as ETEC são de transmissão fecal – oral pela ingestão de água ou alimento contaminados e também por meio do contato pessoal. Possui seu mecanismo de virulência mediado por suas fímbrias que auxiliam sua fixação a mucosa intestinal, como também pela elaboração de dois diferentes grupos de toxinas (Echeverria *et al.*, 1993; Clarke, 2001): as enterotoxinas termo lábeis (LT-I e LT-II) de alto peso molecular, as enterotoxinas termoestáveis (STa ou STI e STb ou STII) de baixo peso molecular (2 e 5 KDa, respectivamente) que são capazes de resistir ao tratamento térmico, a 100° C por 30 minutos (Alderete & Robertson, 1978).

Os genes de LT e ST são encontrados em plasmídios transferíveis que também podem transportar os genes das adesinas CFA/I e CFA/II. As toxinas STa e LT-I, são produzidas por linhagens de *E. coli* isoladas de casos humanos, já as toxinas STb e LT-

II por linhagens de *E. coli* isoladas de animais ou alimentos de origem animal, mas atualmente já existem relatos do isolamento de linhagens *E. coli* produtoras destas toxinas em seres humanos (Echeverria *et al.*, 1993).

As células bacterianas de ETEC LT e ETEC ST fixam-se a mucosa intestinal e a toxina penetra no enterócito perturbando o metabolismo hidrossalino da mucosa (Altmann, 1987; Pereira *et al.*, 2002), havendo, em seguida, saída de água para a luz intestinal, produzindo assim a diarreia aquosa e isenta de leucócitos. Não se observam alterações histológicas na mucosa intestinal, nem inflamação (Clarke, 2001). A diarreia secretória causada pela ETEC assemelha-se aos sintomas da diarreia causada pelo cólera com dores abdominais, náusea e febre regular, porém mais leves. A produção de toxina não está associada a sorotipos específicos, exigindo a realização de culturas de tecidos ou de ensaios de modelos animais para a atividade da toxina com a finalidade de detectar cepas toxigênicas. Também são utilizadas sondas de ácido nucléico para detectar os genes da toxina (Clarke, 2001).

As *Escherichia coli* enterohemorrágicas (EHEC) constituem as linhagens mais comuns que produzem doença nos países desenvolvidos com estimativas de 20 mil casos anualmente nos Estados Unidos (Wallace *et al.*, 1996; MacRae *et al.*, 1997). A doença é mais comum nos meses quentes, e a maior incidência é observada em crianças com menos de cinco anos de idade (Mead & Griffin, 1998). Apresenta mais de 50 sorotipos, mas o principal é o O157 que é o mais importante em doenças humanas (Kaper *et al.*, 2004). Este sorotipo é um habitante ocasional do intestino de animais, especialmente do gado, onde não tem efeito patogênico. Quando causa doença, este sorotipo pode provocar a denominada síndrome urêmica hemolítica (HUS) (Wallace *et al.*, 1997; Kaper *et al.*, 2004) que ocasiona falha crônica dos rins e ou complicações neurológicas. Em algumas situações um pequeno número desta linhagem é suficiente para provocar a doença (Mead & Griffin, 1998).

A bactéria possui como mecanismo de patogenicidade a capacidade de produzir grandes quantidades de citotoxinas (verotoxina ou shigatoxina) que causam morte celular e lesões destrutivas no intestino, o que medeia a diarreia sanguinolenta e o aumento da dor abdominal. Porém a gravidade da doença causada por EHEC varia desde diarreia leve até colite hemorrágica, com dor abdominal intensa, diarreia sanguinolenta e pouca ou nenhuma febre (Clarke, 2001; Murray *et al.* 2000).

As *E. coli* enteroinvasivas (EIEC) são importantes agentes causadores de diarreia em crianças e adultos principalmente em países subdesenvolvidos e apresentam

várias semelhanças com a *Shigella* tanto nas suas características bioquímicas quanto nas propriedades da doença. A bactéria invade, prolifera no interior dos enterócitos e destrói o epitélio do cólon e produz uma doença caracterizada por febre, diarreia e cólica com presença de sangue e leucócitos nas fezes (Hart *et al.*, 1993). A doença é geralmente observada em países em desenvolvimento, sendo a causadora de índices significantes de mortalidade em crianças de baixa idade (Clarke, 2001).

A *E. coli* enteroagregativa (EAEC ou EaggEC) também é relacionada aos casos de diarreia e é o tipo mais recentemente registrado que os outros sorotipos de *E. coli*. Seu fator de virulência é mediado por uma fímbria delgada (fímbrias GVVPQ) cujos genes estão presentes em plasmídeo. Foi descrito também uma toxina que estaria relacionada ao mecanismo, mas seu papel na doença não foi estabelecido (Phillips & Frankel, 1997; Clarke, 2001). A diarreia causada por esse grupo de *E. coli* possui como característica a presença de fezes aquosas persistentes, com vômitos e provoca desidratação em lactentes de países em desenvolvimento.

As *E. coli* enteroaderente difusa (DAEC) são uma categoria de bactérias que tem sido associada a diarreias em crianças em vários estudos epidemiológicos (Levine *et al.*, 1993; Gomes *et al.*, 1991), porém existem trabalhos que correlacionam as DAEC à pacientes assintomáticos. É um grupo bastante heterogêneo possuindo várias estruturas envolvidas na virulência relatadas o que faz com que esse grupo apresente resultados discrepantes a respeito de seu envolvimento na doença. A importância da categoria DAEC nas infecções do trato urinário também tem sido descrita uma vez que estudos demonstram que algumas linhagens carregam fatores de virulência encontrados em *E. coli* uropatogênica (Mead & Griffin, 1998; Johnson & Stell, 2000). Uma nova classificação para *E. coli* que aderem difusamente em células foi proposta recentemente (Servin, 2005). Nesta nova classificação, as DAEC podem ser divididas em típicas e atípicas. A classe típica inclui linhagens que carregam adesinas da família Dr enquanto a classe atípica englobaria linhagens que possuem, além das adesinas Dr outros tipos que promovem aderência difusa.

### **1.4.3 – Perfil de resistência das *Escherichia coli* diarreio gênicas aos antibióticos no agravamento das diarreias**

A grande disseminação do uso de antibióticos foi na Segunda Guerra Mundial (Tavares, 1985). A partir de então esse uso tem crescido significativamente para o tratamento de infecções humanas e tem se tornado abusivo fazendo com que as populações de microrganismos se tornem resistentes e multirresistentes (Mckeeon *et al.*, 1995). As bactérias adquirem resistência aos antibióticos rapidamente, sendo assim, a demanda por novos antibióticos tem aumentado acentuadamente (Pecota *et al.*, 2003), desse modo os resultados dos testes de sensibilidade a antimicrobianos, *in vitro*, são fundamentais para a seleção de agentes quimioterápicos ativos contra o microrganismo infectante.

O método mais difundido e adotado para tais testes seguem os princípios preconizados por Kirb & Bauer (1996), conhecido como antibiograma. Os antibióticos possuem diferentes mecanismos de ação para a inibição do crescimento bacteriano tais como: inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese de proteínas, alterações das membranas celulares, inibição da síntese de ácidos nucleicos e antimetabólitos.

Os genes que codificam a resistência adquirida aos antimicrobianos surgem por mutação ou por recombinação pela transmissão dos plasmídeos, principalmente durante processos de conjugação. Alguns plasmídeos podem acumular vários genes de resistência determinando a resistência múltipla a drogas (Pereira *et al.*, 2002).

### **1.5 – Outros patógenos envolvidos na etiologia das diarreias no Brasil**

A alta incidência de *E. coli* diarreio gênicas no Brasil é seguida pelo Rotavírus (Cauás *et al.*, 2006), e de semelhante importância aparecem bactérias como *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., seguidos pelos protozoários *Giardia* sp., *Entamoeba* sp. e *Cryptosporidium* sp.

### **Rotavírus e outros vírus**

Rotavírus é um tipo de vírus da família Reoviridae, do gênero Rotavírus que causa infecções no trato digestivo. São classificados sorologicamente em grupos, subgrupos, sorotipos e tipo eletroforético (Montgomery *et al.*, 1988). Até o momento, sete grupos foram identificados: A, B, C, D, E, F e G, sendo que os grupos A, B e C estão associados à doença no homem.

O Rotavírus vem sendo considerado, em todo mundo, um dos principais responsáveis pela diarreia em crianças menores de cinco anos e tem sido a principal causa de surtos de diarreia em hospitais, berçários, creches e pré-escolas devido ao fato de ser transmitido principalmente pela via respiratória.

Crianças prematuras ou com deficiência imunológica estão sujeitas à manifestação da doença com maior gravidade, podendo levar até a morte sendo considerado como uma importante causa de mortalidade infantil tanto em países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento (Cukor & Blacklow, 1984; Cardoso *et al.*, 2001). Adultos também podem ser infectados, mas a doença tende a ser mais moderada, porém causando grande mal-estar. Vômitos frequentes (até 10 vezes no dia), dor abdominal, diarreia líquida e febre (que pode ser alta e geralmente dura dois a três dias) são as queixas mais comuns, mas obstrução nasal, coriza, dor de garganta, tosse seca também podem acontecer. Como os vômitos podem ocorrer, a desidratação também surge com certa frequência.

A criança ou adulto pode ser contaminado mais de uma vez devido à existência de mais de um sorotipo de Rotavírus. Grandes epidemias de gastroenterites virais têm sido causadas pelo vírus conhecido como Agente Norwalk (Lara *et al.*, 1995). Na infecção causada por este tipo de vírus, após um período de incubação de dois dias, os infectados sofrem náuseas, cólicas abdominais e vômitos, além da diarreia, por cerca de um a três dias.

### **Parasitas Intestinais**

Nos países em desenvolvimento os principais parasitas associados à diarreia aguda infantil são *Giardia lamblia* e a *Entamoeba histolytica* e outros como o *Cryptosporidium* vêm ganhando importância, devido à sua elevada virulência (Motta & Silva, 2002). Porém, são considerados agentes menos frequentes nas diarreias agudas, quando comparados com as enterobactérias ou o Rotavírus, apesar de vários inquéritos coproparasitológicos demonstrarem que, nas regiões com infra-estrutura urbana

deficiente, metade das crianças lá residentes encontram-se parasitadas (Costa-Macedo, 1998).

A *Giardia lamblia* é um protozoário flagelar que é capaz de se fixar firmemente à parede intestinal humana e provocar a doença conhecida como Giardíase, que é uma doença diarréica prolongada, às vezes persistindo por semanas. A Giardíase é caracterizada por mal-estar, náuseas, flatulências, fraqueza, perda de peso e cólicas abdominais. As fezes, ou até mesmo o hálito podem ficar com um odor distinto de Sulfeto de Hidrogênio. A maioria dos surtos é transmitida por suprimentos de água contaminada uma vez que o estágio de cisto do protozoário é insensível ao cloro.

As disenterias provocadas por espécies do gênero *Entamoeba* são denominadas disenterias amebianas ou amebíase e, esse tipo de disenteria é disseminado, principalmente, por alimentos ou água contaminados com cistos deste protozoário.

Embora o ácido do estômago (HCl) possa destruir os trofozoítos, os cistos não são afetados. No trato gastrintestinal a parede do cisto é digerida e os trofozoítos são liberados. Sendo assim, ocorre uma multiplicação destes nas células epiteliais da parede do intestino grosso ocorrendo, com isso, uma disenteria grave com presença característica de sangue e muco. A espécie mais comum de provocar essa disenteria é a *Entamoeba histolytica*.

Os representantes do gênero *Cryptosporidium* são agrupados, atualmente, em 10 espécies, porém existe a possibilidade da existência de outras espécies. A fase de oocisto é de suma importância por causa do seu potencial de dispersão, sobrevivência, infecciosidade e para a identificação. A maioria dos oocistos mede de 4 a 6 micrômetros, possui aparência quase esférica e tem estruturas internas não distinguíveis, há pouca ou nenhuma característica morfológica para diferenciar espécies e o cultivo *in vitro* diferencial não fornece dados como para bactérias. Sendo assim, existe uma combinação de dados de três ferramentas: morfológica, técnicas moleculares, e especificidade de hospedeiro. Já se sabe que 152 espécies de mamíferos podem ser infetadas com *C. parvum* ou por outro organismo indistinguível. Dentre os mecanismos de transmissão estão o consumo de água contaminada ou mesmo o contato com águas destinadas à recreação e lazer.

## **1.6 - O quadro das diarreias no município de Ouro Preto**

O município de Ouro Preto está localizado na Zona Metalúrgica Mineira a 1061 m de altitude e é composto por 12 distritos rurais: Amarantina, Antônio Pereira, Cachoeira do Campo, Engenheiro Correia, Glaura (Casa Branca), Miguel Burnier, Rodrigo Silva, Santa Rita de Ouro Preto, Santo Antônio do Leite, São Bartolomeu, Santo Antônio do Salto e Lavras Novas abrangendo uma área de 1.245 Km<sup>2</sup>, com a população atual de 64.440 habitantes, sendo que 13% são menores de 6 anos (IBGE / 2001).

O clima predominante no município é o tropical de altitude apresentando inverno seco e verão brando. A média de temperatura anual oscila em torno dos 18° C, ocorrendo maior pluviosidade no semestre mais quente, de outubro a abril. A região é dotada de nascentes de duas grandes bacias: a bacia do Rio São Francisco (nascente do Rio das Velhas) e bacia do Rio Doce (nascente do Rio Gualaxo do Sul). A sede é banhada pelo Ribeirão do Funil, sendo o Córrego Tripuí um dos seus afluentes históricos.

Ouro Preto não possui bairros definidos por documentação oficial da prefeitura, dessa forma, existem locais, confundidos com bairros, cujos nomes populares se seguem: Bairro Nossa Senhora do Carmo, Lagoa do Gambá, Vila Aparecida, Vila dos Engenheiros, Bairro Tavares, Saramenha, Bauxita, Morro do Cruzeiro, Alto das Dores, Bairro Alto da Cruz, Bairro caminho da Fábrica, Bairro Santa Cruz, Bairro Antônio Dias, Bairro São Sebastião, Bairro São João, Vila São José, Pilar, Bairro do Rosário, Centro, Barra, Antônio Dias, Bairro Terceira, Santa Efigênia, Cruz das Almas, Bairro Água Limpa, Padre Faria, Taquaral, São Cristóvão, Nossa Senhora de Lourdes, Jardim Alvorada, Morro Santana, Piedade e Morro da Queimada e Cabeças.

Algumas dessas regiões não dispõem de água canalizada, apresentando condições de saneamento básico bastante precárias considerando os padrões adequados para tratamento de água de abastecimento conforme registrado, em investigação realizada em 2002 (Neves, 2003). Essa pesquisa foi motivada pela considerável prevalência de diarreia viral, bacteriana e parasitária detectada primeiramente por Lanna (1993).



## **2 – OBJETIVOS**

### **2.1 – Objetivo Geral**

Investigar os principais fatores determinantes da alta prevalência da diarreia infecciosa na população de zero a seis anos na cidade de Ouro Preto.

### **2.2- Objetivos Específicos**

Determinar:

- Os fatores sócio-econômicos relacionados com as diarreias.
- Os fatores de saneamento básico relacionados com a presença de diarreias.
- Os principais patógenos associados às diarreias infantis em Ouro Preto.
- Os patógenos bacterianos multirresistentes associados às diarreias infantis em Ouro Preto.

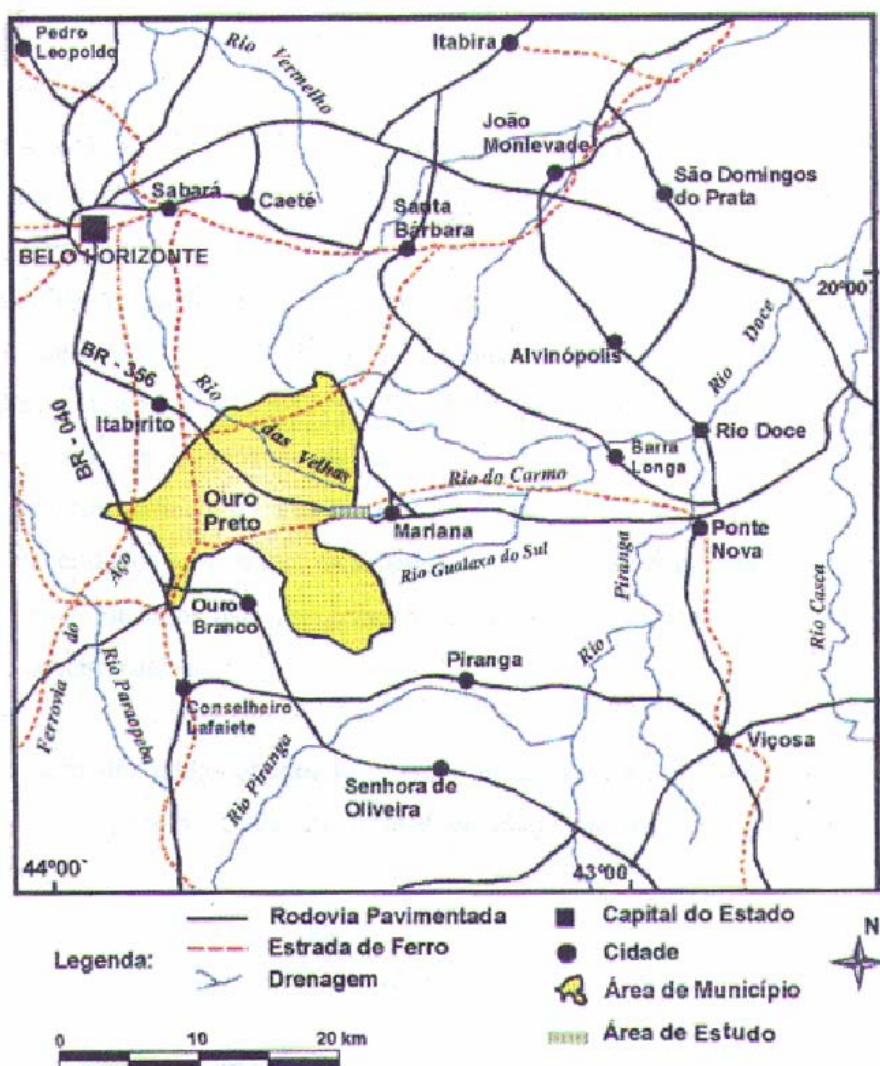
Correlacionar:

- Os patógenos detectados nas diarreias infantis com aqueles previamente detectados na água de consumo em Ouro Preto.
- As *Escherichia coli* diarreiógênicas multirresistentes detectadas nas diarreias infantis com aquelas previamente detectadas na água de consumo em Ouro Preto.

### 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 - Período e área de estudo

O trabalho foi realizado no período de julho de 2006 a Março de 2007 na cidade de Ouro Preto – MG em amostras coletadas aleatoriamente. Os pontos principais de coletas foram as 14 creches da sede, três escolas de Educação infantil, a principal Unidade de Pronto Atendimento Municipal (UPA) e a Santa Casa - Hospital Geral do Município.



Fonte: Pimentel, 2001.

Figura 1: Localização do município de Ouro Preto e suas fronteiras.

Ouro Preto possui atualmente 13 sistemas de distribuição que cobrem quase que a totalidade da população da sede de Ouro Preto.

Futuramente os sistemas 15 de agosto, IX – Piedade, VII - Encardideira e VIII – São João serão eliminados e o sistema Jardim Botânico ficará responsável pelo abastecimento da região assistida pelos sistemas excluídos.

Os sistemas de distribuição, bem como as respectivas áreas de abrangência estão listadas a seguir:

### **Sistema Jardim Botânico**

Área de abastecimento: Jardim Botânico, Camping, Cadeia Pública, São Cristóvão, Calçada, parte alta da Rua Alvarenga (Cabeças), Nossa Senhora de Lourdes, Jardim Alvorada, parte alta da Rua Albino Sartóri, Vila São José, Morro Santana, Rua 15 de Agosto, Rua 13 de Maio.

Essa água também abastece a Rua Padre Rolim, terminal Rodoviário e Cruz das Almas juntamente com a água do Sistema III.

### **Sistema 15 de Agosto**

Área de Abastecimento: Região abaixo da Rua 15 de Agosto, Bairro Alto da Cruz.

### **Sistema IX – Piedade**

Área de Abastecimento: Bairro Alto da Cruz, Taquaral, Padre Faria, região localizada abaixo da Rua Chico Rei até a Rua do Barão, Escola Estadual Marília de Dirceu, Ladeira Santa Efigênia e Rua Dr. João Veloso. (Sistema Encardideira)

### **Sistema VIII**

Área de Abastecimento: Misturada com o sistema IX, abastece os bairros Alto da Cruz e Padre Faria.

### **Sistema II**

Área de Abastecimento: Bairro Água Limpa e Rosário, parte baixa da rua Alvarenga e área de lazer ao lado da Rua Alvarenga.

### **Sistema III**

Área de Abastecimento: Parte do Bairro Rosário, Rua Getúlio Vargas, Rua São José, Praça Reinaldo Alves de Brito e Rua Paraná, parte da Rua Padre Rolim, Rua São Miguel Arcaño, Rodoviária, Cruz das Almas, Rua das Flores, Rua Direita, Ruas da Região da Igreja do Carmo e Escola de Farmácia, Largo do Coimbra, Praça Tiradentes, Rua do Jibu até Proximidades da Prainha (Bairro Barra).

### **Sistema IV**

Bairro do Rosário, Pilar, Centro (Rua Xavier da Veiga), Barra (Rua Washington Dias, Praça Vicente Botelho), Antônio Dias (Rua Felipe dos Santos, Adro da Matriz de Nossa Senhora da Conceição, Largo Marília de Dirceu), Bairro Terceira, Santa Efigênia (Parte da Rua do Barão)

### **Sistema V – Banheira**

Área de Abastecimento: Imóveis situados abaixo do Reservatório da Vila São José e Rua Albino Sartóri, região da Escola Dom Veloso, Pilar, Prefeitura, Praça Cesário Alvim até a travessia para Saramenha.

### **Sistema São João**

Área de Abastecimento: Todo o bairro São João.

### **Sistema XII - São Sebastião**

Área de Abastecimento: Bairro São Sebastião, Ladeira João de Paiva até proximidades do Mirante.

### **Sistema Pico do Amor**

Área de Abastecimento: Região do Palácio Velho e parte do Bairro Antônio Dias.

### **Sistema Saramenha de Cima**

Área de Abastecimento: Comunidade próxima ao portão da Empresa Vermelhão e escola René Gianetti e Avenida René Ganetti.

## **Sistema Estação de Tratamento de Água – Itacolomi**

Área de Abastecimento: Bairro Nossa Senhora do Carmo, Lagoa do Gambá, Vila Aparecida, Vila dos Engenheiros, Bairro Tavares, Saramenha, Bauxita, Morro do Cruzeiro, Alto das Dores, parte do Bairro Alto da Cruz (da rua Desidério de Matos até o Bairro caminho da Fábrica) e Bairro Santa Cruz.

### **3.2 – Amostragem do material clínico e da água de consumo de Ouro Preto**

Realizou-se o estudo em 50 crianças menores de seis anos que apresentavam diarreia e 10 crianças saudáveis (sem apresentar diarreia, também menores de 6 anos). O segundo grupo de crianças foi considerado como grupo controle.

As fezes coletadas foram colhidas das crianças diariamente em creches, escolas, Unidade de Pronto Atendimento e a Santa Casa, todos localizados em Ouro Preto. Algumas amostras foram colhidas em domicílio atendendo ao chamado das famílias motivadas por cartazes divulgadores do projeto afixados por toda a cidade.

As amostras foram colhidas nas próprias fraldas das crianças ou em frascos coletores utilizando meio Carry & Blair modificado como meio de transporte. Essas amostras foram imediatamente transportadas ao Laboratório de Microbiologia e devidamente processadas.

No ato da coleta, questionários clínicos e epidemiológicos foram entregues para serem preenchidos pelos responsáveis, para a obtenção de dados.

As amostras de água para este trabalho foram coletadas em diferentes pontos da sede do município para realização de um diagnóstico presuntivo da contaminação fecal das águas servidas para a população. A análise foi realizada utilizando a técnica de tubos múltiplos padronizada pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998).

### **3.3 – Inquérito clínico e epidemiológico dos pacientes e crianças controle**

O inquérito para a obtenção dos dados clínicos e epidemiológicos utilizou os questionários cujos modelos estão apresentados a seguir:



## Modelo de Questionário Clínico

Universidade Federal de Ouro Preto - Laboratório de Microbiologia Geral

### Ficha Clínica

Procedimento do Material:

Data: / /

Nome do Paciente:

Endereço:

Bairro:

Sexo: ( ) M ( ) F

Idade:

Origem do caso ( ) ( ) Epidêmico ( ) Investig. Espec.  
Esporádico

( ) Outros ( ) Ignorado

No de dias da doença

Vômito ( ) Sim dias ( ) Não

Febre: ( ) Sim ( ) Não

Queixa Respiratória ( ) Sim ( ) Não

Dor Abdominal ( ) Sim ( ) Não

Dermatite: ( ) Sim ( ) Não

Diarréia: ( ) Sim dias ( ) Não

Muco ( ) Sim ( ) Não

Sangue ( ) Sim ( ) Não

Consistência Líquida ( )

Semi-sólida ( )

Pastosa ( )

Tratamento:

Orientação ( ) Orientação + soro oral ( )

Medicamento antidiarréico ( ) Sim ( ) Não

Antitérmico ( ) Sim ( ) Não

Antibiótico ( ) Sim ( ) Não

Antiemético ( ) Sim ( ) Não

### **3.4 – Encaminhamento laboratorial das amostras fecais**

Assim que as fezes eram colhidas em frascos contendo meio de transporte de fezes Cary & Blair modificado (Anexo 1) ou nas fraldas as amostras eram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Ouro Preto onde foram realizados todos os experimentos para isolamento e identificações. As amostras fecais foram aliqüotadas para a realização dos exames parasitológico, bacteriológico e Viroológico.

### **3.5 – Pesquisa dos principais patógenos diarreio gênicos**

#### **3.5.1 – Enterobactérias patogênicas**

A pesquisa das enterobactérias das amostras fecais seguiu metodologia sugerida por Bailey & Scott descrita em Baron (1994). Essa metodologia foi realizada seguindo as seguintes etapas.

- Enriquecimento da amostra

Foi inoculada uma alçada direta da alíquota própria para este exame em meio de enriquecimento TSB (Tryptic Soy Broth) e incubada (24h / 37° C). O crescimento continha uma cultura mista.

- Isolamento das colônias

O crescimento do meio TSB foi semeado por esgotamento em ágar EMB (Agar Eosina Azul de Metileno) e, novamente, incubado (24 h / 37° C) para a obtenção de colônias isoladas.

- Obtenção de cultura pura

Com o crescimento de colônias isoladas em Placa de Petri, pescou-se quatro colônias Lac + (lactose positivas – colônias avermelhadas) e duas colônias Lac – (lactose negativas – colônias claras), quando havia a presença destas últimas. As colônias foram transferidas para meio de enriquecimento TSB para obtenção de cultura pura. As culturas puras eram incubadas por 24 h a 37°.

- Identificação dos gêneros e espécies

Após o crescimento da cultura pura em TSB estas foram inoculados em Meio Rugai (modificado por Pessoa e Silva) para identificação bioquímica. As provas



bioquímicas identificáveis neste meio são: Reações fermentativas de carboidrato (glicose), Reação para verificação da utilização da uréia como única fonte de nitrogênio, Pesquisa da produção de gás sulfídrico (H<sub>2</sub>S) a partir da utilização de aminoácidos sulfurados, Produção do Indol a partir da utilização do aminoácido triptofano e, complementarmente, testes adicionais foram realizados como: Reação para verificação da utilização do citrato de sódio como única fonte de carbono.

### **3.5.1.1 – Sorotipagem das Linhagens de *E. coli* isoladas de material clínico**

As amostras de *E. coli* isoladas e identificadas passaram por processo de sorotipagem, que consiste na busca de sorogrupos patogênicos de *E. coli*. A técnica foi realizada pelo método de aglutinação em lâmina com a utilização de soros polivalentes comerciais da marca PROBAC que contém anticorpos contra antígenos reconhecendo, dessa forma, os sorogrupos de *E. coli*.

Foram realizadas sorotipagens utilizando-se os seguintes soros:

- Soro anti *E. coli* enteropatogênica clássica A (EPEC A)
- Soro anti *E. coli* enteropatogênica clássica B (EPEC B)
- Soro anti *E. coli* enteropatogênica clássica C (EPEC C)
- Soro anti *E. coli* enteroinvasora clássica A (EIEC A)
- Soro anti *E. coli* enteroinvasora clássica B (EIEC B)
- Soro anti *E. coli* enterohemorrágica (Anti *E. coli* O157) (EHEC)

### **3.5.1.2 – Investigação do perfil de resistência aos antibióticos dos isolados de *E. coli***

Os sorogrupos patogênicos de *E. coli* isolados e identificados foram submetidos aos testes da avaliação de susceptibilidade aos antibióticos por meio do método de difusão em ágar, conhecido por antibiograma, segundo Kirby & Bauer (1966).

Para a realização dos testes foram utilizados discos Gram negativos I e II comerciais da marca PROBAC. Esses discos contam com os seguintes antibióticos nas respectivas concentrações:

Tabela 4: Antibióticos, Sigla e Concentrações com respectivo perfil de sensibilidade fornecido pelo fabricante.

Antibiótico	Concentração	Sigla	Padrão de Sensibilidade/Resistência (mm)		
			Resistente	Intermediário	Sensível
Cefoxitina	30µ g	CFO	14 ou -	15 a 17	18 ou +
Amplicilina	10µ g	AMP	13 ou -	14 a 16	17 ou +
Cefuroxima axetil (oral)	30µ g	CRX	14 ou -	15 a 22	22 ou +
Ceftriaxoma	30µ g	CRO	13 ou -	14 a 20	21 ou +
Cefalotina	30 µg	CFL	14 ou -	15 a 17	18 ou +
Amoxicilina + Clavulanato	20/10 µg	AMC	13 ou -	14 a 17	18 ou +
Amicacina	30 µg	AMI	14 ou -	15 a 16	17 ou +
Sulfazotrin	25 µg	SUT	10 ou -	11 a 15	16 ou +
Ceftazidima	30µ g	CAZ	14 ou -	15 a 17	18 ou +
Cefepime	30µ g	COM	14 ou -	15 a 17	18 ou +
Gentamicina	10 µg	GEN	12 ou -	13 a 14	15 ou +
Ciprofloxacina	5 µg	CIP	15 ou -	16 a 20	21 ou +

A leitura do experimento foi realizada com a leitura dos halos de inibição do crescimento ao redor dos discos com os antibióticos impregnados. Os resultados foram comparados com a tabela 4 fornecida pelo fabricante dos discos, que relaciona sensibilidade e diâmetro das zonas de inibição de crescimento. Tais resultados permitiram a interpretação e classificação das culturas em: Sensíveis, Resistentes ou Sensibilidade Intermediária. Foi realizado um controle de qualidade com uma linhagem padrão de *E. coli* (ATCC 25.922).

### 3.5.1.3 - Fermentação do sorbitol e diferenciação dos isolados de *Escherichia coli* enterohemorrágica O157: H7

Para identificação fenotípica do sorotipo O157: H7 de EHEC, 193 linhagens de *E. coli* isoladas dos pacientes com diarreia e 40 linhagens isoladas das crianças controle (sem diarreia) neste trabalho foram analisadas para fermentação do sorbitol.

Inicialmente os isolados foram enriquecidos em caldo TSB por 24 h a 37° C. Na sequência as culturas foram semeadas em placas de Ágar base MacConkey Sorbitol (Ágar SMAC) por 18 h a 37° C. A interpretação dos resultados para verificar a fermentação do sorbitol é baseada nas características fenotípicas das colônias. O fenótipo “colônias rosas” indica fermentação positiva do sorbitol, já o fenótipo “colônias brancas” indica fermentação negativa desse açúcar (March & Ratnam, 1986; Chapman *et al.*, 1991)

### **3.6 – Pesquisa Parasitológica**

A alíquota destinada para exame parasitológico foi processada segundo o método convencional de Lutz ou de Hooffman, Pons e Janer, conhecido como Sedimentação Espontânea. As lâminas foram visualizadas em microscópio óptico Olympus BX41, no aumento de 40 x.

### **3.7 – Pesquisa do Rotavírus**

A pesquisa virológica consistiu no uso da técnica de Látex que consiste de uma suspensão de látex de tamanho uniforme sensibilizadas com inumoglobulinas específicas contra antígenos de grupo obtidos da cepa AS – 11 de Rotavírus Símio. As partículas de látex reagem prontamente formando a reação antígeno – anticorpo e devido à presença de antígeno de Rotavírus na suspensão de látex, perde seu aspecto uniforme, formando-se imunoglobulinas específicas unidas às partículas de látex, iniciando a formação de uma malha entre as mesmas, ocorrendo a aglutinação, que é macroscopicamente visível.

### **3.8 - Determinação da significância estatística dos enteropatógenos isolados das amostras clínicas**

Para verificação da significância estatística dos dados obtidos dos pacientes e controles estudados, foram utilizados os testes do Qui-quadrado e o Exato de Fischer.

### **3.9 – Listagem de dados previamente obtidos para a determinação da Água de consumo de Ouro Preto como fonte dos Enteropatógenos**

Realizou-se o levantamento das linhagens de *E. coli* consideradas patogênicas tanto pela determinação dos genes (Ribeiro, 2006) como de fenótipos indicativos de virulência (Neves, 2003), previamente isolados da água de abastecimento dos bairros da periferia de Ouro Preto para posterior comparação com os índices de *E. coli* patogênicas dos isolados dos casos de diarreia da população infantil que habita bairros abastecidos pelas mesmas fontes de água do estudo anterior.

#### **3.9.1 - Amostragem e testes com água de consumo**

No presente trabalho, foram considerados os dados gerados nas análises da água de consumo de Ouro Preto previamente investigados no Laboratório de Microbiologia DECBI / ICEB – UFOP (Neves, 2003) e Departamento de Microbiologia da UNICAMP em trabalho técnico científico associativo (Ribeiro, 2006).

##### **3.9.1.1 - Isolamento e identificação de enterobactérias e patógenos entéricos da água de Consumo**

As amostras de água foram coletadas no ano de 2002 nas mesmas regiões onde os pacientes do atual trabalho residem.

Para isolamento e identificação das enterobactérias encontradas seguiu-se a metodologia sugerida por Bailey & Scott (Baron *et al.*, 1994), como descrito anteriormente.

##### **3.9.1.2 – Sorotipagem das bactérias *E. coli* isoladas de água**

A partir dos isolados de *E. coli* obtidos foram realizados testes de sorotipagem para a investigação da patogenicidade, utilizando soros anti *E. coli* polivalente da marca PROBAC. Os soros testados foram os seguintes: *E. coli* enteropatogênica clássica A, *E. coli* enteropatogênica clássica B, *E. coli* enteropatogênica clássica C, *E. coli* enteroinvasora A, *E. coli* enteroinvasora B e *E. coli* enterohemorrágica.

## 4 – Resultados

### 4.1 Análise da água de diferentes pontos do município de Ouro Preto

A análise da água dos diferentes pontos amostrados no município de Ouro Preto revelou a presença de Coliformes termotolerantes em níveis acima dos estabelecidos pela legislação vigente (Brasil, 2005), conforme pode ser observado na Tabela Y:

Tabela 5: Valores do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Termotolerantes por sistemas de abastecimento de água e pontos de coleta.

Sistema de Abastecimento	Ponto	NMP / 100 mL
Itacolomi	Montante da Captação da ETA	240
Itacolomi	Torneira de domicílio	0
Itacolomi	Torneira de Unidade de Educação	0
Saramenha	Filtro de domicílio	240
Jardim Botânico	Torneira de domicílio	0
Piedade	Chafariz	240

Valores limites de referência: Portaria 518 / 04 MS: Ausente em 100 mL (BRASIL, 2004).

Resolução CONAMA 274 / 00: Limite de 1000/100mL para recreação (BRASIL, 2000).

### 4.2 – Avaliação dos questionários clínicos e epidemiológicos da população estudada

Os 50 pacientes e 10 controles preencheram questionários clínicos e epidemiológicos que forneceram informações sobre a situação de saneamento das residências, *status* social e sintomatologia do episódio diarréico.

Setenta e cinco por cento dos pacientes e controles residem em locais assistidos por fornecimento de água, coleta de lixo e esgoto públicos (promovido pela prefeitura).

Dos 50 pacientes, 16 afirmaram ter feito uso de tratamento para controle da diarréia, sendo que três pacientes faziam uso de terapia com antibióticos, um uso de medicamento antidiarréico e nove faziam somente reidratação oral. Dos 16, três fizeram mais de um dos tratamentos concomitantemente.

#### 4.2.1 – Distribuição dos casos diarreicos em faixas etárias

A diarreia foi observada em todos os grupos etários investigados entre as crianças de zero a seis anos de idade e conforme apresentado na figura 3, a seguir, nota-se a incidência diferenciada em algumas faixas etárias.

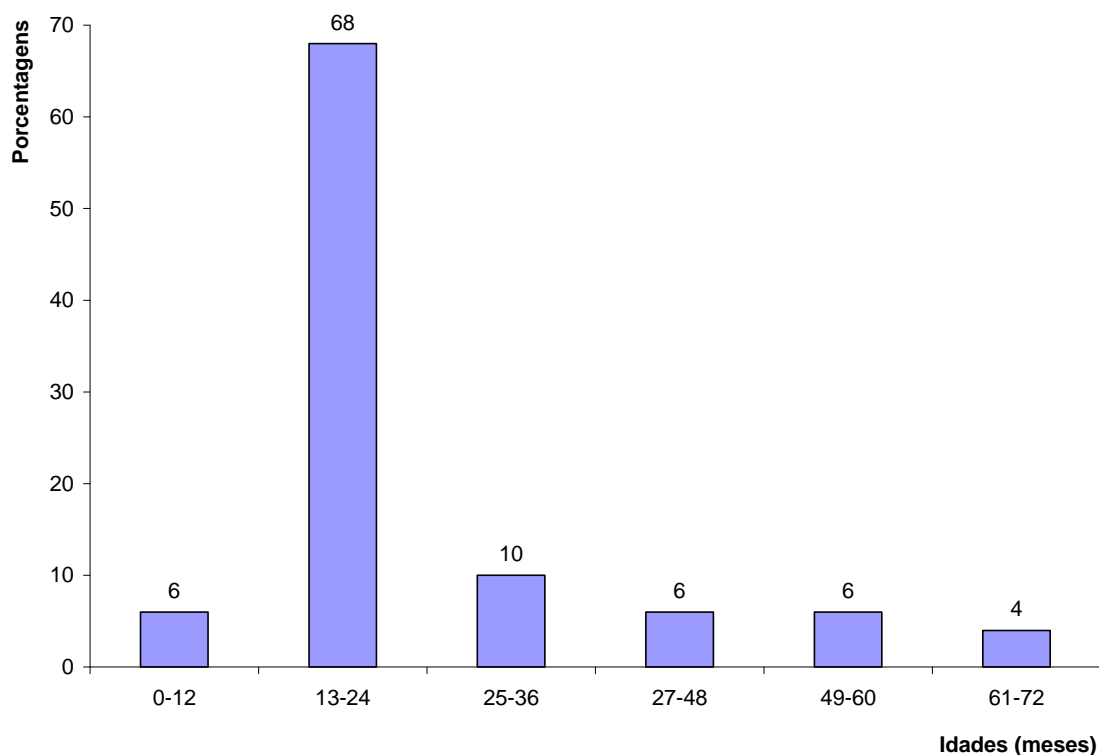


Figura 2: Apresentação da incidência de diarreias nas diferentes faixas etárias em crianças de zero a seis anos em Ouro Preto nos anos de 2006 e 2007.

#### 4.2.2 – Renda familiar e escolaridade dos pais dos pacientes

A renda familiar e escolaridade dos pais foram dados que muitos dos pacientes tiveram restrições para informá-los. Dentre os 50 pacientes com diarreia, 26 (52%) revelaram a renda familiar e 32 (44%), o nível de escolaridade. A grande maioria (37% do total dos 50 pacientes) apresentava renda familiar inferior a dois salários mínimos e 26% dos pais dos 50 pacientes não tinham ensino fundamental completo, conforme observado nas figuras 3 e 4, respectivamente.

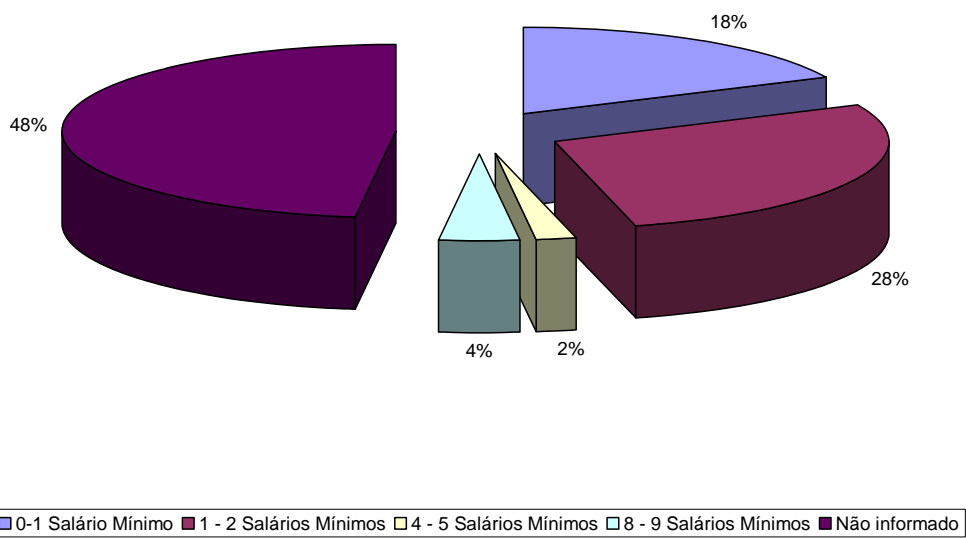


Figura 3: Renda familiar dos Pacientes expressa em número de salários mínimos.

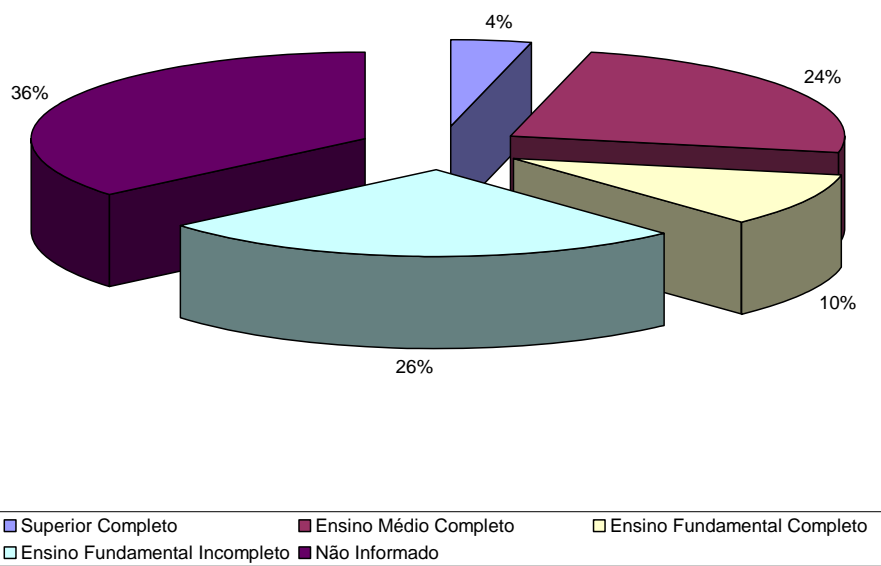


Figura 4: Escolaridade dos Pais dos Pacientes

#### 4.2.3- Sintomatologia dos episódios clínicos dos casos diarreicos investigados

Quanto às recorrências, na população infantil investigada, 23 (46%) pacientes apresentaram mais de um dos sintomas clínicos durante o episódio da diarreia. Também foi de extrema importância os casos de recidivas de episódios de diarreia, verificados em 6 (12%) dos pacientes.

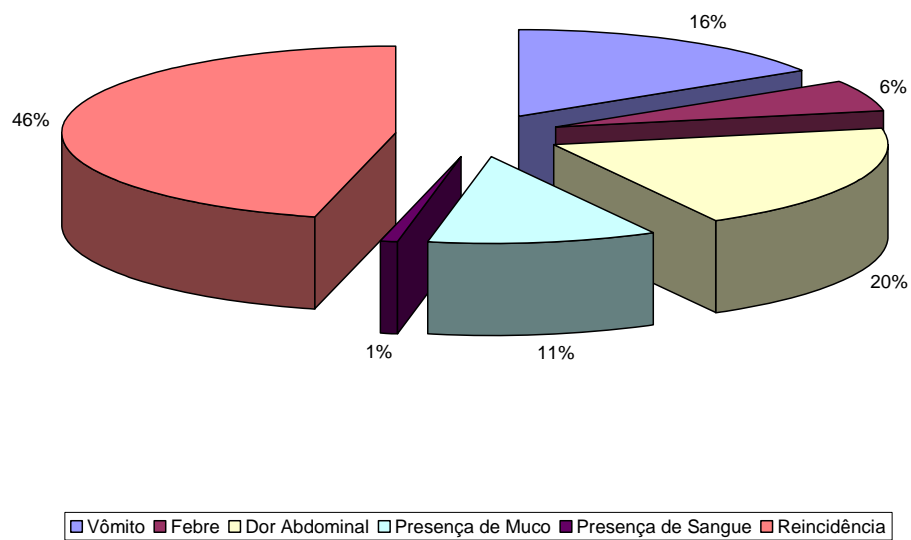


Figura 5: Apresentação da frequência de recidivas e dos sinais clínicos associados as diarreias estudadas.



#### 4.2.4 – Infecções múltiplas associadas ao Rotavírus, enterobactérias e protozoários nos casos diarréicos estudados.

Do total de amostras analisadas (60), tanto de pacientes com diarreia, quanto dos controles foi verificado ampla variedade de infecções múltiplas. EPEC ou EIEC aparecem na quase totalidade das infecções.

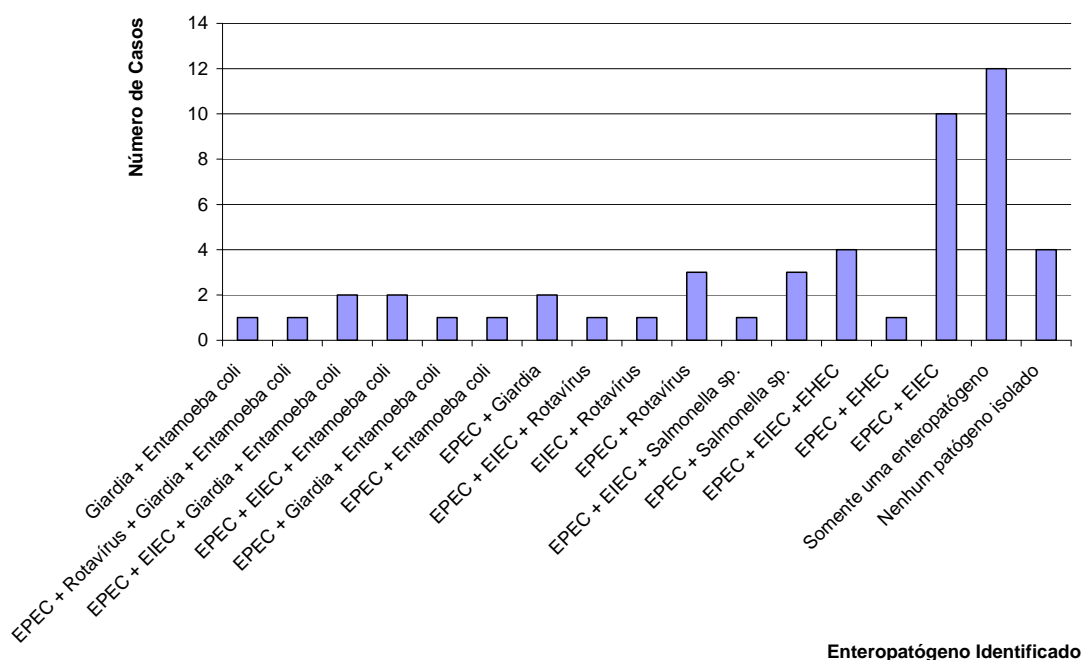


Figura 6: Frequência dos enteropatógenos nas infecções múltiplas detectadas.

EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasora

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica

EHEC: *Escherichia coli* enteroemorrágica

#### 4.3 – Principais enterobactérias isoladas

Em quatro amostras do total dos 50 pacientes foi verificada a presença do gênero *Salmonella* na pesquisa bacteriológica. Em 86% das amostras de fezes analisadas, foram encontradas linhagens patogênicas de *E. coli*. Os demais gêneros isolados e identificados são de pouca relevância, uma vez que fazem parte da microbiota normal intestinal e não há relatos na literatura de sorotipos patogênicos.

#### 4.4 – Sorotipos patogênicos de *E. coli* isolados de material clínico

As 193 linhagens de *E. coli* isoladas e identificadas foram submetidas ao teste de aglutinação em lâmina e verificou-se que 82% delas pertenciam a pelo menos um dos sorotipos patogênicos testados, conforme verificado na Figura 7.

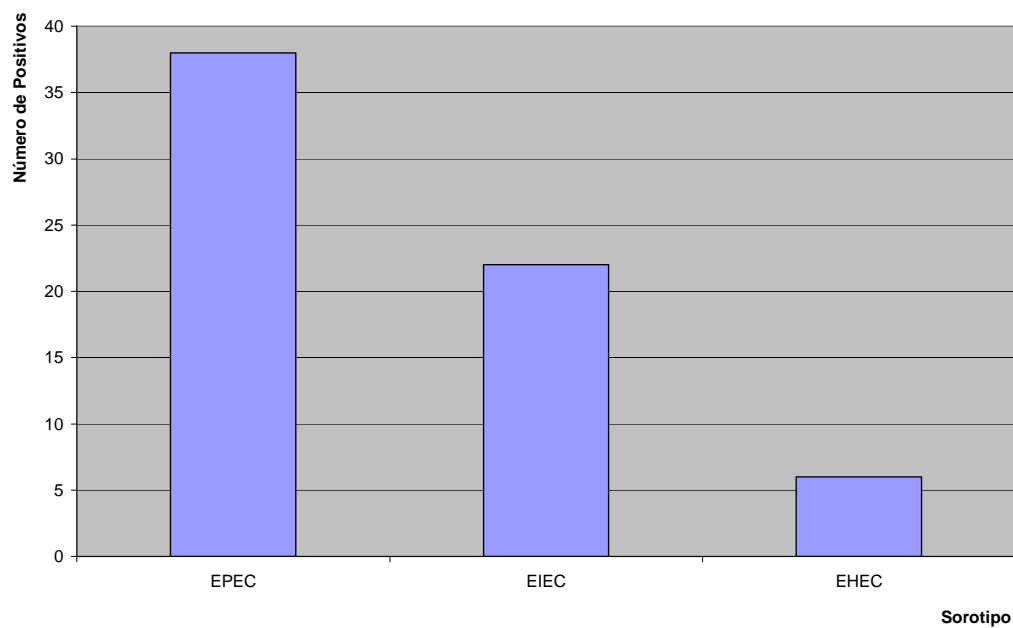


Figura 7: Número dos Sorotipos identificados de *E. coli* pela técnica de aglutinação em lâmina

EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasora

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica

EHEC: *Escherichia coli* enteroemorrágica

#### 4.5 – Perfil de susceptibilidade aos antibióticos das linhagens patogênicas de *E. coli* isoladas

Para todos os antibióticos testados havia, pelo menos, uma linhagem de EPEC resistente a eles, como verificado na Figura 8.

Das 67 linhagens positivas para EPEC houve resistência com índices significativos para os antibióticos AMP, CFL, AMC e SUT.

A maioria das linhagens de EPEC isoladas (66,67%) apresentou resistência a mais de um dos antibióticos testados.

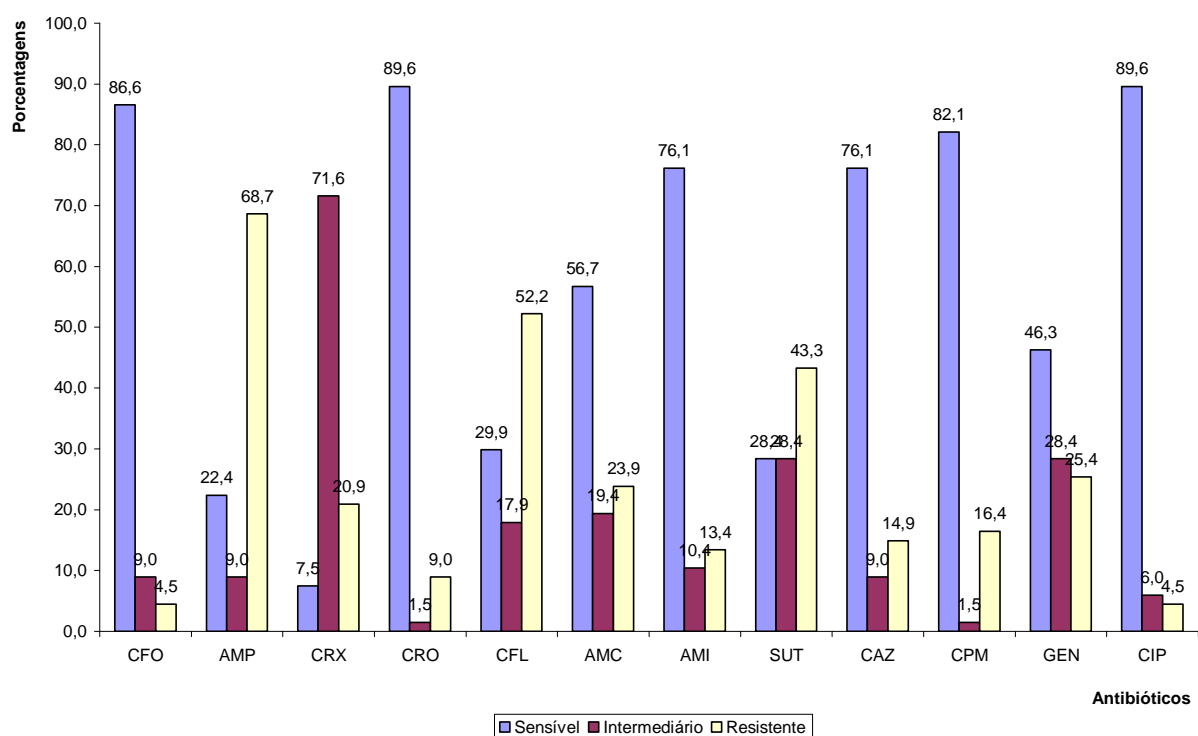


Figura 8: Porcentagens dos perfis de sensibilidade de cada antibiótico contra amostras de EPEC positivas

CFO: Cefoxitina; AMP: Amplicilina; CRX: Cefuroxima axetil (oral); CRO: Ceftriaxoma; CFL: Cefalotina; AMC: Amoxilina; AMI: Amicacina; SUT: Sulfazotrim; CAZ: Ceftazidima; CPM: Cefepime; GEN: Gentamicina; CIP: Ciprofloxacina.

Das 6 linhagens de EHEC positivas, a grande maioria foi sensível aos antibióticos. Para AMP, CRX, CFL, AMC e SUT houve resistência com índices significativos.

Apesar da sensibilidade ter sido apresentada por quase todos os antibióticos testados, o perfil de multi-resistência pôde ser verificado pela maior parte das linhagens de EHEC (71,46%) (Figura 9).

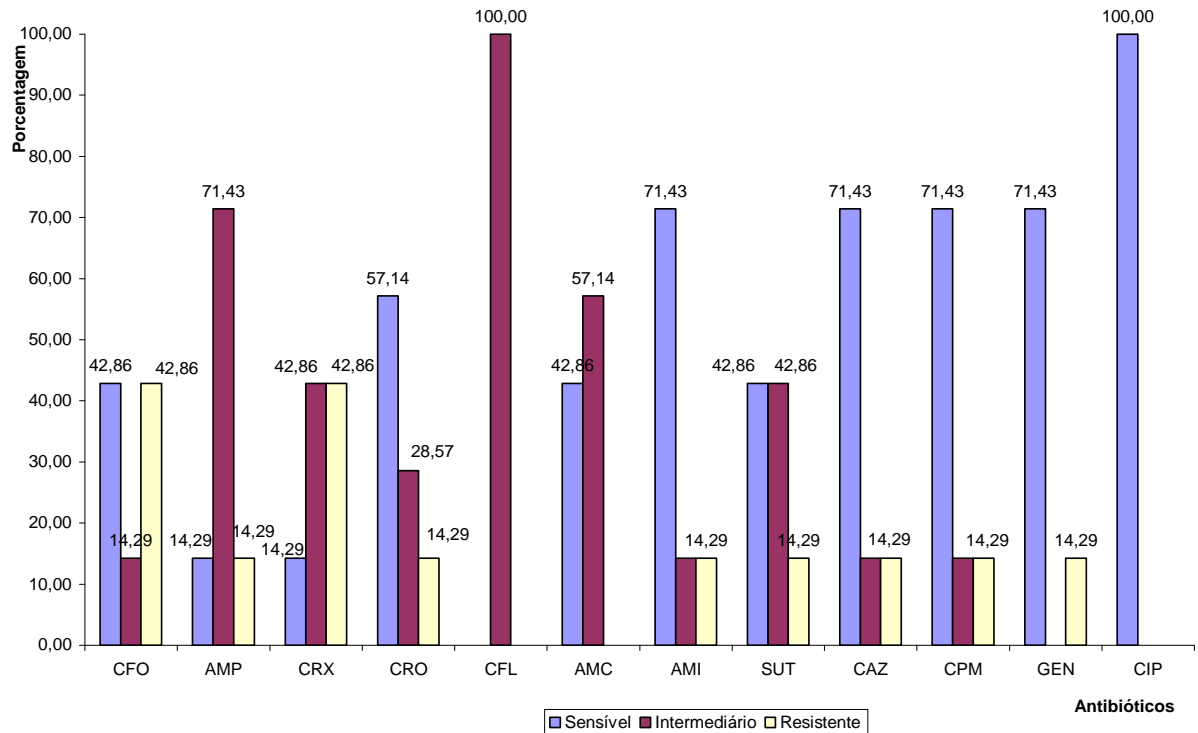


Figura 09: Porcentagens dos perfis de sensibilidade de cada antibiótico contra amostras de EHEC positivas

CFO: Cefoxitina; AMP: Amplicilina; CRX: Cefuroxima axetil (oral); CRO: Ceftriaxoma; CFL: Cefalotina; AMC: Amoxicilina; AMI: Amicacina; SUT: Sulfazotrim; CAZ: Ceftazidima; CPM: Cefepime; GEN: Gentamicina; CIP: Ciprofloxacina.

Das 27 linhagens EIEC positivas a resistência foi significativa para os antibióticos AMP, CRX e CFL, como pode ser verificado na Figura 10. Apesar da sensibilidade ter sido apresentada por vários dos antibióticos testados, o perfil de multi-resistência pôde ser verificado pela maior parte das linhagens (74,07%).

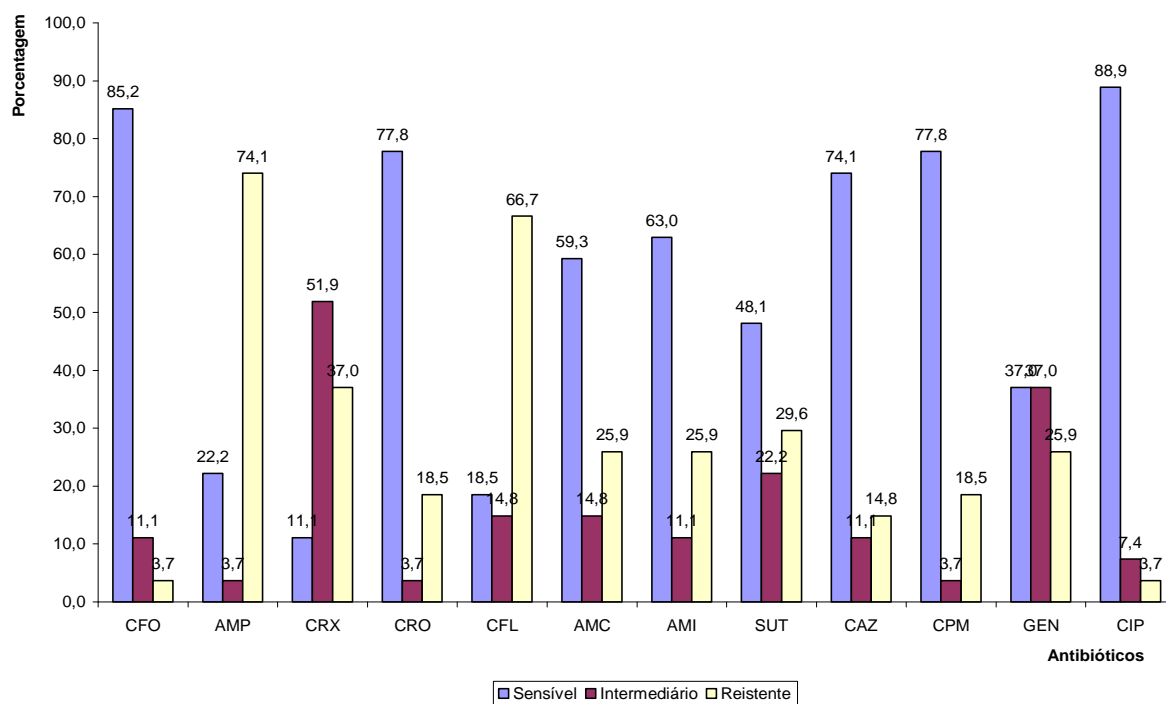


Figura 10: Porcentagens dos perfis de sensibilidade de cada antibiótico contra amostras de EIEC positivas.

CFO: Cefoxitina; AMP: Amplicilina; CRX: Cefuroxima axetil (oral); CRO: Ceftriaxoma; CFL: Cefalotina; AMC: Amoxilina; AMI: Amicacina; SUT: Sulfazotri; CAZ: Ceftazidima; CPM: Cefepime; GEN: Gentamicina; CIP: Ciprofloxacina.

A Figura 11 apresenta o perfil de multi-resistência apresentado pela Amostra 2 colônia C. Verifica-se que uma mesma amostra apresenta resistência à vários antibióticos.

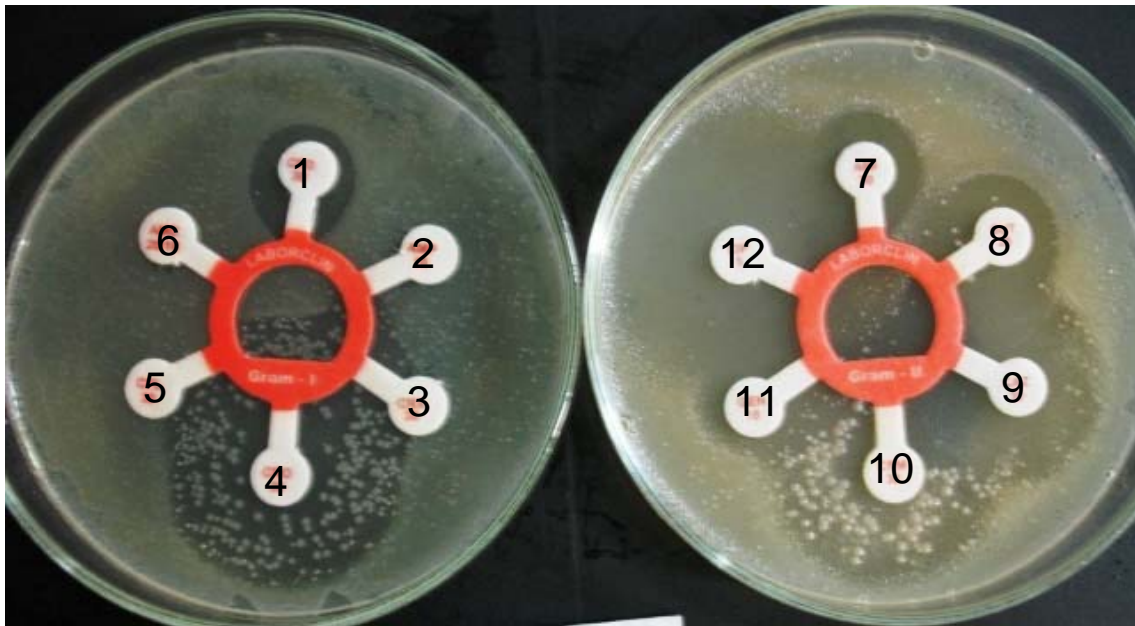


Figura 11: Perfil de Multi-resistência apresentada na amostra 2 colônia C

(1) CFO: Cefoxitina, (2) AMC: Amoxilina, (3) CFL: Cefalotina, (4) CRO: Ceftriaxoma, (5) CRX: Cefuroxima axetil (oral), (6) AMP: Amplicilina, (7) AMI: Amicacina, (8) CIP: Ciprofloxacina CIP, (9) GEN: Gentamicina, (10) CPM: Cefepime, (11) CAZ Ceftazidima, (12) SUT: Sulfazotrin.

A amostra 14 colônia B, linhagem EPEC positiva apresentou perfil de multi-resistência, uma vez que foi resistente à 6 dos 6 antibióticos testados, conforme pode ser verificado na Figura 12.

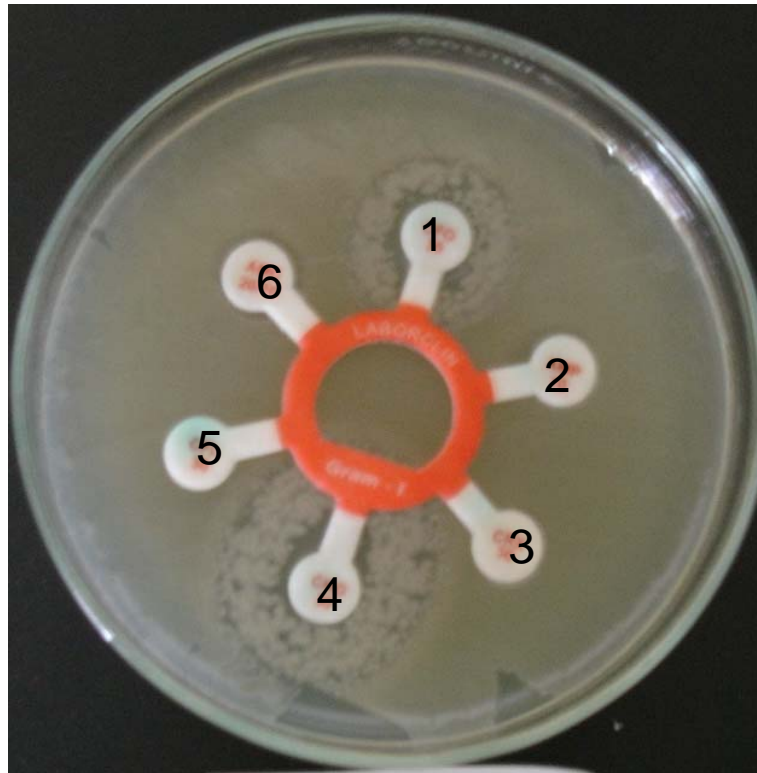


Figura 12: Perfil de Multi-resistência apresentada na amostra 14 colônia B

(1) CFO: Cefoxitina, (2) AMC: Amoxilina, (3) CFL: Cefalotina, (4) CRO: Ceftriaxoma, (5) CRX: Cefuroxima axetil (oral), (6) AMP: Amplicilina.

A Figura 13 apresenta o perfil de multi-resistência da amostra 17 colônia A. Na figura verifica-se que, dos 12 antibióticos testados, esta linhagem apresentou resistência à nove deles.

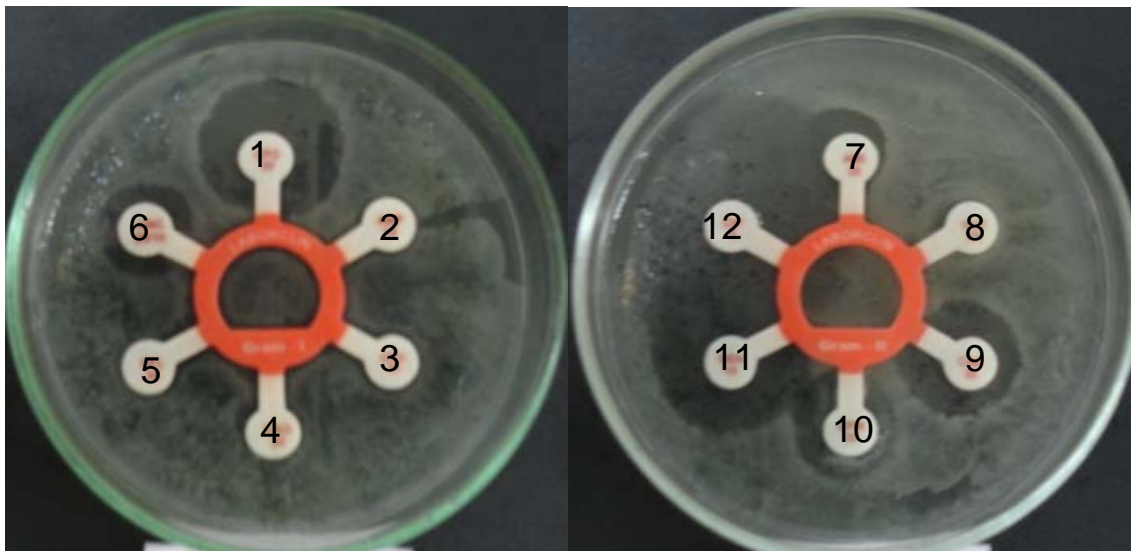


Figura 13: Perfil de Multi-resistência apresentada na amostra 17 colônia A

(1) CFO: Cefoxitina, (2) AMC: Amoxicilina, (3) CFL: Cefalotina, (4) CRO: Ceftriaxoma, (5) CRX: Cefuroxima axetil (oral), (6) AMP: Amplicilina, (7) AMI: Amicacina, (8) CIP: Ciprofloxacina CIP, (9) GEN: Gentamicina, (10) CPM: Cefepime, (11) CAZ Ceftazidima, (12) SUT: Sulfazotrin.

#### **4.6 – Confirmação bioquímica das linhagens de EHEC pela ausência de fermentação do sorbitol**

O teste negativo da fermentação do Sorbitol como indicação bioquímica das linhagens EHEC foi obtido em 26 dentro as 193 linhagens isoladas de *E. coli*. Entretanto, somente três desses isolados puderam ser verdadeiramente considerados como pertencentes ao sorogrupo EHEC por terem sido os únicos que aglutinaram especificamente o soro anti-EHEC no teste de aglutinação em lâmina. As Figuras 14 e 15 mostram o teste negativo para fermentação do sorbitol indicativo de EHEC para a Amostra P 09 (com o controle) e o teste positivo para fermentação de sorbitol que exclui bioquimicamente o sorotipo EHEC, respectivamente.



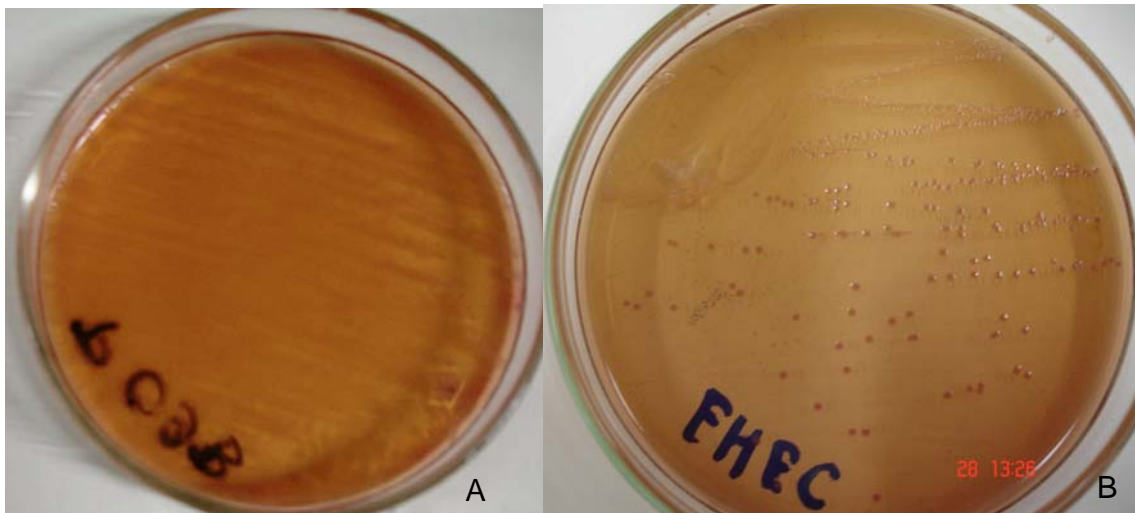


Figura 14: Teste negativo da fermentação do sorbitol, indicativo de *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC).

A. Isolado da Amostra P 09

B. Linhagem padrão de referência de *E. coli* enterohemorrágica

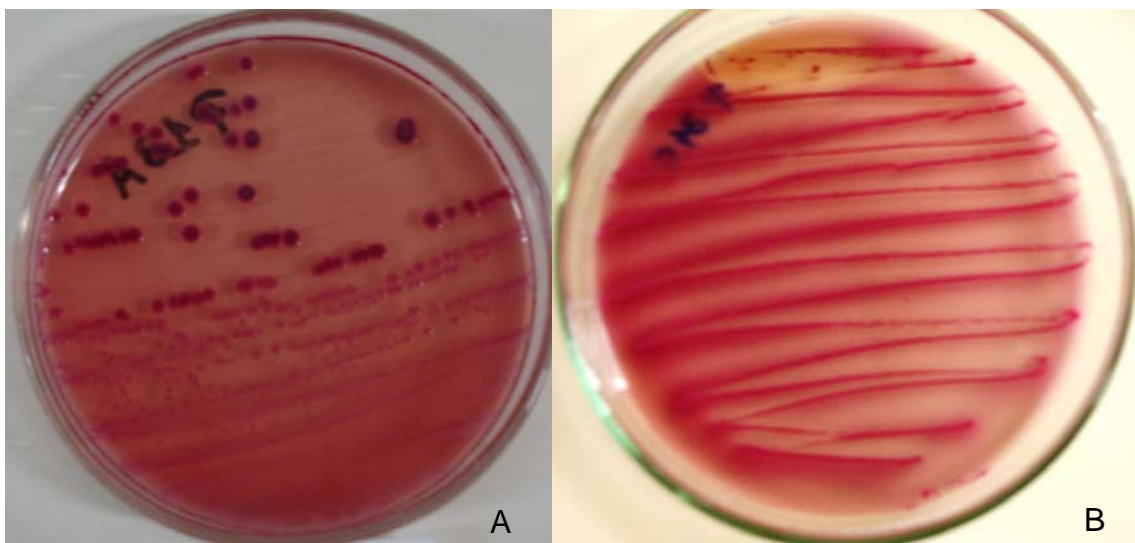


Figura 15: Teste positivo da fermentação do sorbitol que bioquimicamente exclui o sorotipo EHEC.

A. Resultado negativo do Isolado da amostra

B. Resultado do padrão de referência de *E. coli* ATCC 25.922, negativo para EHEC.

#### 4.7 – Pesquisa parasitológica

Na pesquisa parasitológica foram identificados 12 pacientes portadores de parasitas, sendo que oito eram portadores de *Giardia* sp. e quatro pacientes portadores de *Entamoeba coli*. Nos controles não foi identificado nenhum portador de *Giardia* sp., mas um dos controles apresentou cistos de *Entamoeba coli* nas fezes.

Os pacientes portadores de *Giardia* sp. são residentes nos bairros Saramenha de Cima (2), Cabeças (2) e Nossa Senhora do Carmo (4).

#### 4.8 – Frequência do Rotavírus detectada nas amostras investigadas

Conforme verificado na Figura 16, oito (16%) dos 50 pacientes testados apresentaram resultado positivo no teste de aglutinação Látex para Rotavírus. Os pacientes controles foram negativos na totalidade.

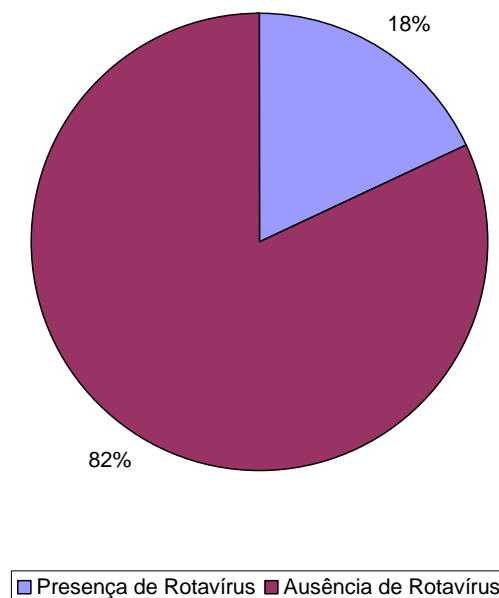


Figura 16: Porcentagem de Amostras positivas na detecção de Rotavírus

## 4.9 – Análise estatística

### 4.9.1 - Comparação entre as amostras de fezes (estudo atual) com dados de amostra de água (estudo anterior).

A comparação entre os dados do atual estudo com os dados do estudo realizado anteriormente revela a maior prevalência do sorotipo de EPEC tanto nas amostras de diarreia quanto nas amostras de água. Para a realização dessa correlação não foi aplicado nenhum teste estatístico uma vez que a periodicidade dos experimentos não coincide.

#### 4.9.1.1 – Identificados de sorotipos de *E. coli* pela técnica de aglutinação em lâmina

A sorotipagem das linhagens isoladas das fezes diarréicas foi comparada com as linhagens isoladas de água de estudo anteriormente realizado na mesma área, objeto de estudo desta pesquisa. Os resultados encontram-se apresentados na Figura 17.

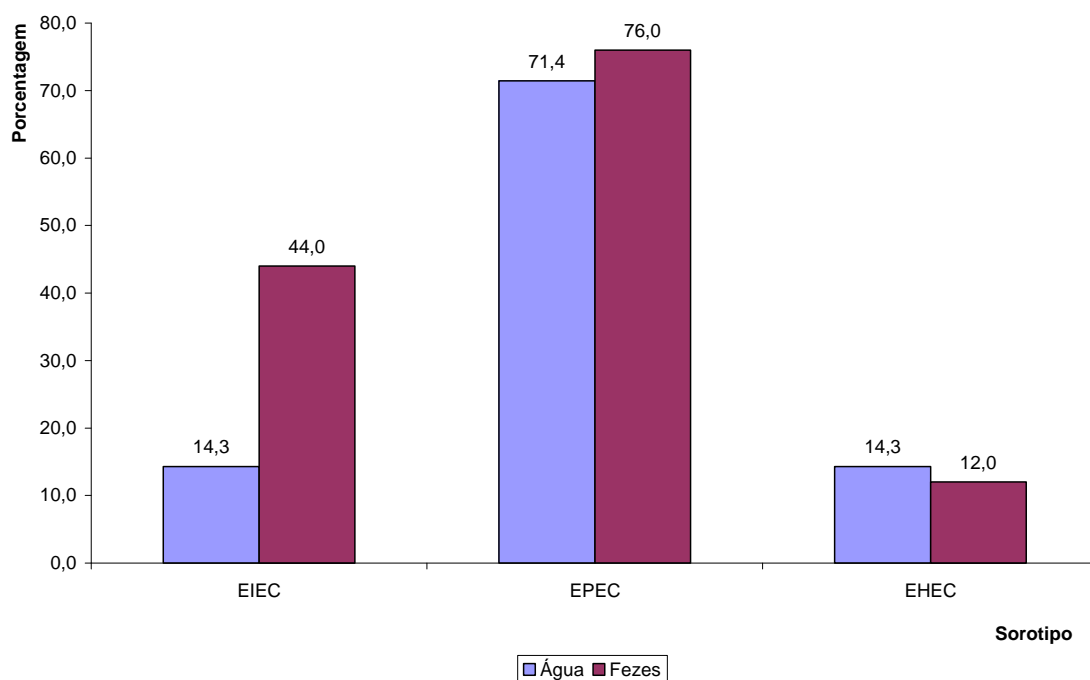


Figura 17: Frequência dos sorotipos patogênicos de *Escherichia coli* das fezes (estudo atual) e da água (Neves, 2003) (estudo anterior).

#### 4.9.1.2 – Padrão de resistência dos sorotipos patogênicos aos antibióticos por sistema de distribuição da cidade de Ouro Preto.

Conforme verificado nas Figuras 18, 19, 20 e 21 houve semelhança no padrão de resistência das linhagens patogênicas de *E. coli*.

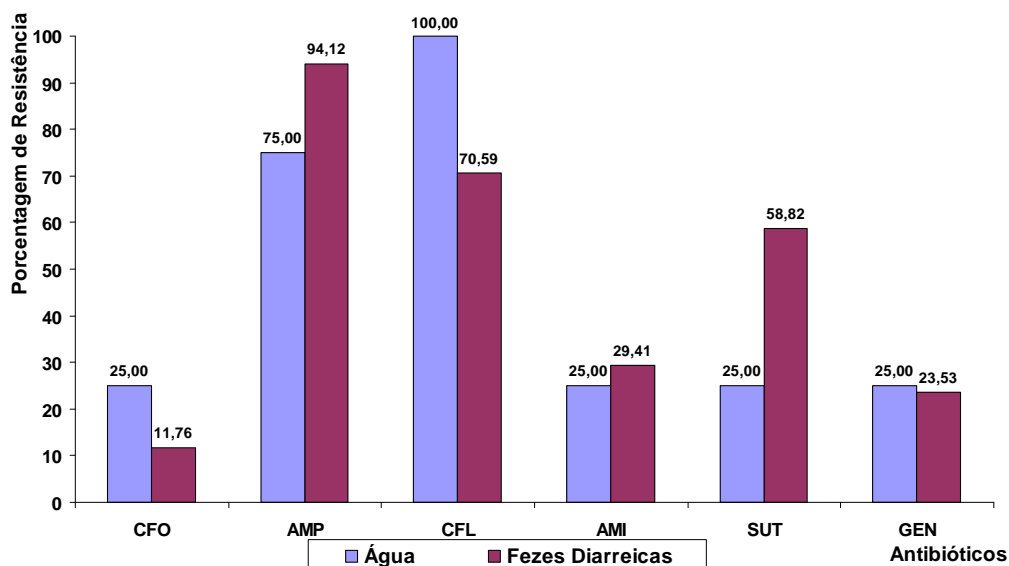


Figura 18: Comparação da resistência aos antibióticos dos patógenos encontrado na água (estudo anterior) e fezes diarreicas (estudo atual) no Sistema de Distribuição Saramenha.

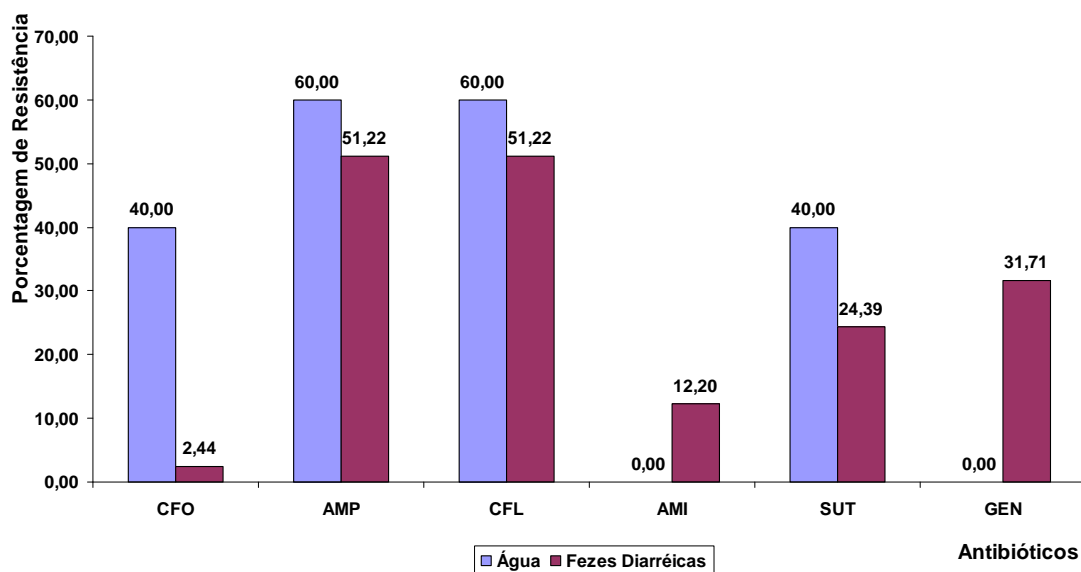


Figura 19: Comparação da resistência aos antibióticos dos patógenos encontrado na água (estudo anterior) e fezes diarreicas (estudo atual) no Sistema de Distribuição Itacolomi.

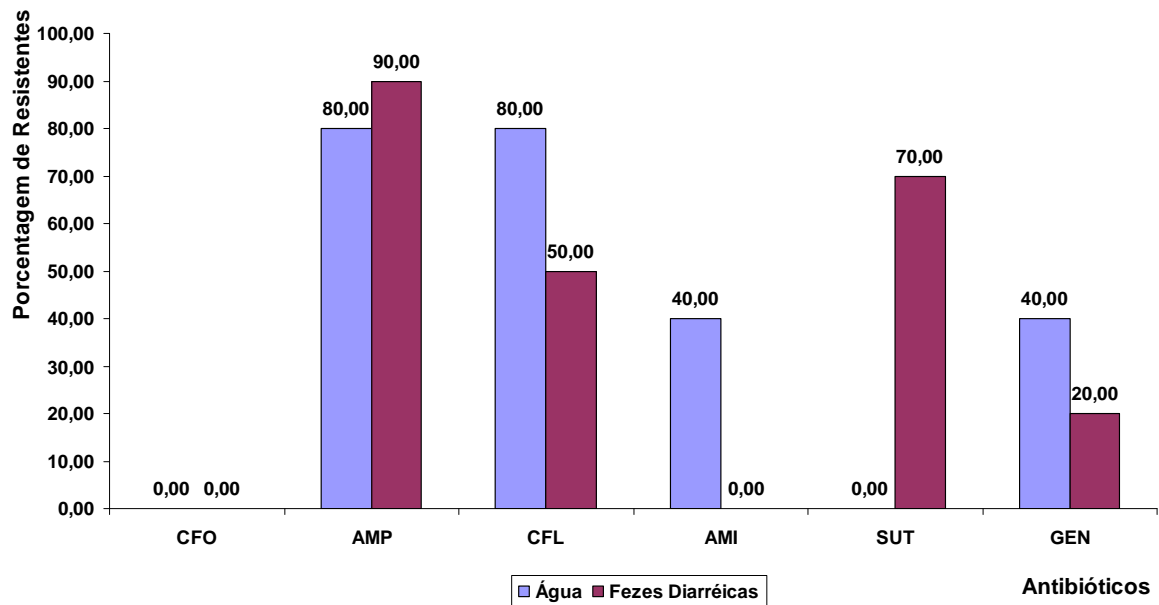


Figura 20: Comparação da resistência aos antibióticos dos patógenos encontrado na água (estudo anterior) e fezes diarréicas (estudo atual) no Sistema de Distribuição Piedade

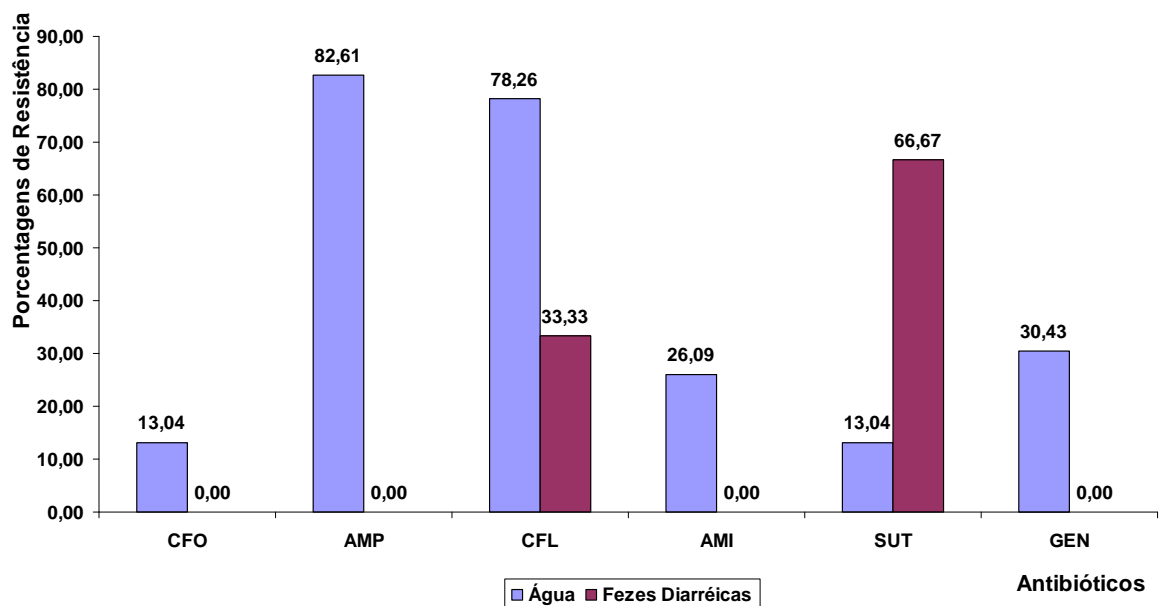


Figura 21: Comparação da resistência aos antibióticos dos patógenos encontrados na água (estudo anterior) e fezes diarréicas (estudo atual) no Sistema de Distribuição Jardim Botânico.

#### 4.9.2 – Verificação da significância estatística

Na Tabela 5 estão apresentados os valores obtidos por meio dos testes de significância estatística. Nas análises realizadas pode-se verificar que houve correlação entre a ocorrência de diarreias e a presença de EPEC e EIEC. Para EHEC, *Salmonella* sp., parasitas e Rotavírus não foi verificada tal relação.

Tabela 6: Análise estatística das frequências de isolamento dos enteropatógenos nos 50 casos de diarreia e 10 controles.

Enteropatógeno	Teste utilizado	Diarreias	Controles	Valores da Análise Estatística	Significância Estatística
EPEC	Qui-quadrado	38	4	$X^2=5,14$ ; $df=1$ ; $p=0,0233$	Sim
EIEC	Qui-quadrado	22	1	$X^2=4,07521$ , $df=1$ , $p=0,043520$	Sim
EHEC	Qui-quadrado	6	1	$X^2=0,032345$ , $df=1$ , $p=0,857273$	Não
<i>Salmonella</i> sp.	teste exato de Fisher	4	0	$p=0,47228$	Não
Parasitas	Qui-quadrado	8	1	$X^2=0,235294$ , $df=1$ , $p=0,627627$	Não
Rotavírus	Qui-quadrado	8	0	$X^2= 1,84615$ , $df=1$ , $p=0,174234$	Não

## **5 – DISCUSSÃO**

### **5.1 - A água e demais componentes do saneamento de Ouro Preto como Patrimônio Nacional**

A abundância e qualidade dos aquíferos de um país compõem o quadro de sua soberania territorial e reflete a política básica de uma nação. Segundo Moraes & Jordão, 2002; Albert, 1995, Escheverria, 1993, pelas estatísticas mundiais a cada 14 segundos, morre uma criança vítima de doença de veiculação hídrica. Além dos índices de mortalidade, a alta taxa de moléstias decorrentes do consumo de água contaminada remete às perdas econômicas de um país, uma vez que, em média, até um décimo do tempo produtivo de cada pessoa é perdido devido a doenças relacionadas à água.

Os dados obtidos dos inquéritos epidemiológicos do presente trabalho comprovam que o saneamento básico de Ouro Preto, na atualidade, é precário. Nos bairros observados, representativos de aproximadamente 33% da população, menos de 60% das casas tem coleta sistemática de lixo regular, além das habitações serem inadequadas ao abrigo de número de componentes familiar.

### **5.2 - O Saneamento básico de Ouro Preto**

Ouro Preto aparece como uma das primeiras cidades brasileiras providas de rede de esgoto, implementado à época do império. A falta de manutenção ao longo do tempo resultou no precário sistema atual.

Compondo o quadro atual do saneamento básico de Ouro Preto, a rede pública de abastecimento de água dispõe de uma única estação de tratamento de água, a ETA – Itacolomi, que abastece apenas uma pequena área da cidade referente aos bairros Nossa Senhora do Carmo, Vila Aparecida, Vila dos Engenheiros, Bairro Tavares, Saramenha, Bauxita, Morro do Cruzeiro, Alto das Dores, parte do Bairro Alto da Cruz, Caminho da Fábrica e Bairro Santa Cruz.

Os demais segmentos da rede pública têm como forma de tratamento da água a cloração sistemática nos reservatórios distribuidores. Uma parcela considerável da população de Ouro Preto habita bairros da periferia localizados nos morros ao redor da cidade que não tem acesso a volume da água adequado e nem tratada. Para suprir essa falta, esses moradores, por iniciativa própria, criaram uma forma alternativa, pela

capitação de água de minas abandonadas utilizando um sistema precário de abastecimento. Neves, 2003, estudando o potencial patogênico da água consumida pela população de Ouro Preto analisou a água de pontos representativos de todas as citadas formas de abastecimento, incluindo aqueles de água cloradas do mesmo município e verificou que as amostras de água avaliadas em sua quase totalidade, apresentaram-se impróprias ao consumo.

### **5.3 – A correlação entre saneamento básico e diarreia**

A investigação de fatores de risco para uma doença infecciosa, como é o caso de diarreias, envolve a coleta de um número considerável de variáveis (Fuchs *et al.*, 1996), tais como, condições sanitárias e fatores sócio-econômicos. Embora nos últimos anos tenham aumentado os conhecimentos sobre epidemiologia, transmissão e patogenia da diarreia infecciosa em lactentes e pré-escolares, e, apesar dos esforços realizados no campo da prevenção, esta enfermidade ainda persiste como problema de saúde muito freqüente e importante, especialmente, nos países em desenvolvimento onde as deficiências no saneamento ambiental são alarmantes (Benício & Monteiro, 2000).

Nos países industrializados, durante os últimos cem anos, com a aplicação de melhores métodos de saneamento, a importância da doença diarreica como problema de saúde pública tem diminuído (Rodrigues *et al.*, 2002). As prováveis causas responsáveis por este declínio estão ligadas, essencialmente, pelo aumento do acesso à água tratada e ao saneamento ambiental (Teixeira & Guilhermino, 2006) e pelo estado nutricional da criança. Estes fatores, por sua vez, estão fortemente ligados à renda familiar e pela forma racional que a família têm de alocar tais recursos, capacidade que poderia ser indicada pela escolaridade materna (Benício & Monteiro, 2000).

Consequentemente, a maior parte dos indivíduos que vivem nestes ambientes relativamente saneados são altamente suscetíveis à algum tipo doença diarreica quando visitam países em desenvolvimento, pois não desenvolvem imunidade necessária que resultaria de contatos anteriores com a maior parte dos agentes patogênicos intestinais. Porém, a doença diarreica continua a se manifestar em países desenvolvidos, onde surge, frequentemente, sob a forma de surtos relacionados à contaminação fecal da água, do leite ou de outros produtos lácteos, das aves e da carne de gado (Oyofó, 2002).



### **5.3.1 - Indicadores culturais, sócio-econômicos e das condições sanitárias na prevalência das diarreias em Ouro Preto**

A cidade de Ouro Preto é provida de muitas nascentes devido ao seu relevo montanhoso. Os habitantes locais tem o hábito cultural, centenário da utilização dessas fontes fornecedoras de água para consumo, alheios à realidade atual de sua contaminação microbiológica decorrente da ocupação crescente e desordenada nas últimas décadas. Os dirigentes municipais alegam que o adiamento à implantação de tratamento de água em Ouro Preto se deve, em parte, à falta de aceitação desse sistema pela população, que tradicionalmente acredita na abundância e pureza da água das minas de Ouro Preto (Fonseca, 2004).

O componente sócio-econômico como já foi verificado em outras regiões (Nanan *et al.* 2003) parece ser também, em Ouro Preto, um dos principais fatores de risco para as diarreias infantis. A maioria das comunidades envolvidas no presente estudo é originária dos bairros peri-urbanos da cidade de Ouro Preto vivendo em condições de pobreza, em habitações precárias com saneamento básico e condições de higiene deficientes. O restante da população corresponde àqueles residentes no centro urbano.

Para ampliar as discussões sobre as condições sanitárias como indicadores da prevalência de diarreias, McMichael (2001) comentou a análise de vários especialistas sobre a influência das alterações dos ecossistemas terrestres dos últimos anos, a exemplo as alterações climáticas, sobre a saúde pública mundial. Comentam que os suprimentos de água têm sido um dos principais alvos dessas alterações influenciando, consideravelmente, na incidência das doenças de caráter epidêmico, como as diarreias humanas. Esse é mais um motivo para se dispensar maior vigilância ao saneamento básico que atende às populações.

Uma localidade com sistema precário de água e esgoto vem, portanto, aumentando suas chances de endemias cada vez mais incidentes e de maior gravidade. Isto é crítico numa cidade como Ouro Preto, de população em crescimento e variável devido ao intenso fluxo turístico.

Ouro Preto possui várias localidades suprimidas de sistema de abastecimento de água da rede pública, ou seja, realizam a canalização de água de minas pela utilização

de mangueiras, por iniciativa particular (Neves, 2003). Nas regiões servidas pelo sistema convencional de abastecimento pela Prefeitura, cujo tratamento é feito unicamente pela adição de cloro à água canalizada, este pode ser pouco satisfatório para a eliminação de microrganismos patogênicos principalmente no que se refere aos cistos dos protozoários que são notadamente resistentes à cloração.

Estudos realizados por Lanna (1993) e Neves (2003) sugerem que a condição da água consumida pela população é de origem duvidosa e o esgoto é lançado no Rio Funil sem tratamento. Neves (2003), analisou a qualidade microbiológica da água de consumo de Ouro Preto e concluiu que a maioria dos bairros amostrados recebem água fora dos padrões de potabilidade estabelecidos pela legislação vigente. Apesar da constatação destes trabalhos, o problema persiste e tem se agravado cada vez mais. No presente trabalho realizou-se a análise da qualidade microbiológica da água em alguns pontos da rede abastecedora a qual se mostrou imprópria ao consumo humano pelo índice de Coliformes termotolerantes. Esta água abastece a maioria dos bairros investigados quanto a prevalência dos casos diarréicos. A água servida continua, portanto, de má qualidade, esta tem-se deteriorado com o crescimento da população e certamente veicula enteropatógenos como enteroparasitas, enterobactérias e vírus.

### **5.3.2 – Enteropatógenos como fatores de risco das diarréias em Ouro Preto**

A maior parte dos agentes enteropatogênicos que causam diarréia aguda penetram no organismo por via oral e colonizam o intestino antes que se produza a sintomatologia da doença diarréica. Na tentativa de diminuir a mortalidade por diarréia, além dos conhecimentos já adquiridos quanto à fisiologia hidreletrolítica, são necessários novos avanços a respeito da epidemiologia e da interação entre os agentes enteropatogênicos e o hospedeiro tem sido objetos de estudo (Andrade *et al.*, 1999). Também, a determinação dos agentes etiológicos da diarréia são importantes para o desenvolvimento de uma terapia racional e otimização de planos efetivos de controle (Albert *et al.*, 1995).

Estudos epidemiológicos em vários países, nos últimos anos têm indicado declínios da mortalidade infantil por diarréia, mas não da sua incidência (Benicio & Monteiro, 2000). Benicio & Monteiro (2000), estudando a tendência secular da doença diarréica em São Paulo, mostraram que o declínio na prevalência da diarréia pôde ser associado às melhorias na cobertura da rede pública de abastecimento de água.

### **5.3.2.1 - Os parasitas na etiologia das diarreias em Ouro Preto**

As enteroparasitoses são um importante indicador das condições de saneamento em que vive uma população. Segundo a UNICEF (1995), a população menor de 5 anos reflete o grau de contaminação de uma região por tratar-se de indivíduos com pouca capacidade de deslocamento e maior vulnerabilidade, espelhando, assim, as condições sociais da comunidade onde habitam (Costa-Macedo *et al.*, 1998).

Neste trabalho, as Giardias foram identificados em 26% dos casos de diarreia e não foram verificados nos controles indicando a relação positiva entre a presença de diarreia e este parasita. Ballester (2003), em trabalho realizado com crianças do Pronto Socorro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo encontrou resultados semelhantes. Nesse trabalho, foram encontrados 28,1% das crianças com parasitas.

No atual estudo, dos 50 casos de diarreia infantil observados, em 44 casos (88%) foram identificados, pelo menos, um enteropatógeno. A maioria dos trabalhos, como o de Lanna (1993) observou 69,7% de casos positivos na mesma região estudada.

### **5.3.2.2 – Rotavírus na etiologia das diarreias em Ouro Preto**

Nos países em desenvolvimento o Rotavírus figura entre os principais patógenos associados à diarreia infantil. A partir de 1973, quando o Rotavírus foi definido como um enteropatógeno importante, um dos agravantes para a sua detecção era a dificuldade de diagnóstico laboratorial, cujas técnicas usuais eram restritivas como é próprio para a identificação dos vírus. Entretanto, atualmente já existem técnicas mais acessíveis ao diagnóstico rotineiro, como o teste de aglutinação de látex que, segundo Al-Yousif (2001), consiste em um método seguro e rápido para a detecção dos Rotavírus em amostras fecais.

Em crianças, o Rotavírus é a causa principal de infecção hospitalar sendo este o único agente para o qual as fezes de crianças com diarreia desenvolvida no hospital devem ser rotineiramente pesquisadas. Rodrigues (2002) revelaram que no ambiente hospitalar a incidência do Rotavírus pode chegar até a 40% dos casos de diarreia. Esses mesmos autores em estudo de prevalência em São Paulo observaram a incidência do Rotavírus em 13,4% das diarreias em crianças de comunidades de baixo nível sócio-econômico. No presente estudo detectou-se a taxa de 18% e anteriormente, também em

Ouro Preto, incidência semelhante, de 17,4%, foi detectada por Lanna (1993). Possivelmente esta maior incidência em Ouro Preto seja explicada pela considerável contaminação da água servida que não condiz com o padrão de potabilidade exigido pela legislação vigente. Por outro lado a população observada em São Paulo apresentou menor índice deste agente considerando que recebe água devidamente tratada (Benício & Monteiro, 2000). Índices elevados de Rotavírus (37,5%) foram observados em estudo prospectivo de diarreias em regiões da Indonésia com baixo nível de saneamento público (Oyofó *et al.*, 2002).

### 5.3.2.3 – Enterobactérias na etiologia das diarreias em Ouro Preto

As principais Enterobactérias patogênicas detectadas nos casos diarreicos do presente trabalho foram do gênero *Salmonella* e sorotipos da espécie *Escherichia coli*. Identificou-se *Salmonella* sp. em aproximadamente 10% dos casos, os quais foram detectados em um mesmo bairro, sendo reincidente em um dos pacientes e esses casos apareceram tanto em meses secos como nos chuvosos. Resultados semelhantes a esses foram observados por Oyofó (2002) na Indonésia.

Na presente investigação, ao lado dos 38 isolados de EPEC encontram-se as EIEC em 22 das linhagens analisadas. Depois das EPEC, foram as EIEC o agente mais importante nos episódios diarreicos.

As EHEC foram verificadas por teste de aglutinação em lâmina em seis casos e, em seguida, procedeu-se o teste da fermentação de sorbitol como parâmetro confirmatório. Porém a fermentação do açúcar sorbitol mostrou ser pouco eficiente para a detecção dos tipos enterohemorrágicos de *E. coli*, uma vez que somente três dos isolados apresentaram concordância entre os resultados de fermentação e a sorotipagem realizada. Outras 26 amostras apresentaram ausência de fermentação, porém não houve a aglutinação em lâmina para este antígeno.

Embora as *E.coli* diarreogênicas tenham sido também detectadas em crianças do grupo controle, seu achado nos pacientes foi estatisticamente significativo (qui-quadrado= 5,14; df= 1; p= 0,0233) pela utilização do teste qui-quadrado de Pearson, comprovando a relação da ocorrência das EPEC e diarreias. O mesmo pode ser

comprovado para EIEC. Esse sorotipo foi encontrado nas crianças controle, mas a avaliação estatística revelou uma correlação entre a presença deste patógeno nas fezes das crianças e a presença dos episódios de diarreia.

Em estudo prospectivo, semelhante a este, realizado em Ouro Preto por Lanna (1993), incidência considerável de *E. coli* diarreiogênica também foi encontrada e estatisticamente significativa em pacientes diarreicos de 0 a 5 anos de idade. Dando continuidade a esta linha de pesquisa, em 2000, avaliou-se a qualidade microbiológica da água de consumo em Ouro Preto e os resultados foram contrários ao padrão de potabilidade da mesma compatível com o sistema precário de tratamento de água em Ouro Preto.

Naquela ocasião foram obtidos 150 isolados da espécie *E. coli* que foram posteriormente submetidos à investigação dos principais fatores de virulência de *E. coli* diarreiogênicas no Departamento de Microbiologia e Imunologia – IB - UNICAMP, coordenado pelo professor Tomomasa Yano e co-orientado por Maria Célia da Silva Lanna. Para a investigação deste fator de virulência procedeu-se à pesquisa dos genes de virulência. *stx1*, *stx2*, *eltIA*, *eltIIA*, *stI*, *stII*, *cdtB*, *cnf-s*, *hlyA*, *Enhly*, *sat*, *pic*, *pet*, *astA*, *bfp*, *eae*, EAF, INV, *icuD*, *fimH*, *aagA*, *aafA*, *papC*, *papGI*, *papGII*, *papGIII*, K 88, 987p e *kpsMTII* além de fenótipos compatíveis tanto em experimentos investigados em cultura de células *in vitro* como em ensaios *in vivo* em camundongos neonatos.

Essa investigação dos fatores de virulência nos isolados de *E. coli* da água de consumo de Ouro Preto mostraram resultados surpreendentes. Dos 97 casos estudados, pelo menos 82 mostraram algum fator de virulência associado à doença diarreica. O destaque maior deve ser feito para as linhagens que apresentaram o gene *eae* característico de EPEC, os quais foram detectados em índice importante no presente trabalho em 76% dos pacientes. Relevante também foi a detecção do gene *icuD*, característico de EIEC em 11,3% dos isolados de *E. coli* da água de Ouro Preto que mostra possível relação causal com casos diarreicos detectados no presente trabalho, visto a atual incidência deste patógeno em 44% dos pacientes investigados.

No trabalho anterior a avaliação das características microbiológicas em termos de potabilidade da água consumida pelos moradores da maioria dos bairros de Ouro Preto, além da proveniente dos chafarizes que também servem os turistas visitantes do centro histórico, devido aos altos índices de contaminação microbiana encontrados colocam-na fora dos padrões permitidos pela legislação (Neves, 2003). A quase totalidade de linhagens de *E. coli* circulante na água de Ouro Preto tem algum fator de

virulência. Pelo menos 39 (40,62%) dos 96 isolados de *E. coli* obtidos dessa água analisada, apresentaram associação dos fatores de virulência positivos pela PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) e do padrão de adesão em célula Hep-2 com as amostras de *E. coli* produtoras de citotoxina. Ou seja, quase metade dos isolados de *E. coli* que circulam na água de Ouro Preto estão cientificamente comprovados que são de alta virulência pelo número de fatores de virulência combinados e além dessas detectou-se 43 tendo algum fator. Nessa inspeção observou-se que dentre essas 82 linhagens (85,41%) patogênicas de *E. coli*, 24 são do grupo EPEC, 36 EAEC, 13 DAEC e 13 EXPEC. Pelo menos (31,57%) das amostras isoladas de pacientes, no presente trabalho, são de sorotipos patogênicos que tem correlação com esses grupos patogênicos isolados da água. No trabalho prospectivo anterior, com pacientes da mesma localidade, a correlação desses patógenos também foi evidente (Lanna, 1993).

### **5.3.3 – Multi-resistência a antibióticos como fator de risco das diarreias em Ouro Preto**

Altas frequências de resistência a antibióticos tem sido reportadas para bactérias isoladas de áreas onde os antibióticos tem sido usado extensivamente por humanos e animais em ambientes aquáticos e terrestres sujeitos a intensa produção animal (Baldini & Cabezali, 1991; Bloon, 1998). Esta resistência aos antimicrobianos vêm aumentando os problemas médicos por todo o mundo (Meirelles-Pereira *et al.*, 2002).

No atual estudo, dos 50 pacientes dois, logo no início do episódio diarreico, faziam uso de antibióticos injetáveis adicionados ao soro, no processo de terapêutica hospitalar e outros dois tratavam-se com antibióticos por via oral.

O uso contínuo de antimicrobianos tem aumentado a resistência de várias bactérias a antimicrobianos comuns (Cyrino *et al.*, 2003).

No presente trabalho das 67 linhagens identificadas como EPEC 66,67 foram resistentes a mais de um antibiótico. Entre as sete linhagens identificadas como EHEC, 71,46% foram resistentes a pelo menos dois antibióticos e nas 27 linhagens identificadas como pertencentes ao sorotipo EIEC, 74,07 foram resistentes a mais de um antibiótico. Esses dados sugerem que na região estudada o uso indiscriminado de antibióticos parece convencional e, além disso, o perfil de multi-resistência é um indicativo de regiões com baixo nível de saneamento.

Os antimicrobianos menos eficazes para as linhagens isoladas foram AMP (Ampicilina) e CFL (Cefalotina) que apresentaram baixa eficiência para os três sorotipos estudados.

A limitação do consumo de antibióticos só reduz a resistência microbiana quando é suficientemente ampla e se prolonga por tempo suficiente, já o emprego de medidas de saúde pública (vacinação, saneamento, cuidados com a água de uso) podem levar à redução da disseminação das infecções por bactérias resistentes (Cyrino *et al.*, 2003).

Outro agravante para os episódios diarreicos e também um indicativo de regiões com baixo nível de saneamento é o aparecimento de infecções múltiplas. No presente trabalho, infecções múltiplas estiveram presentes na maioria dos episódios de diarreia e, eventualmente a infecção era ocasionada por mais de dois patógenos.

#### **5.3.4 – Intervenções no sistema de saneamento em Ouro Preto nos últimos 14 anos**

Nos últimos 14 anos, período a que se refere os dados coletados na região de Ouro Preto abordando a potabilidade da água consumida bem como o estudo prospectivo de casos diarreicos da população infantil, observou-se que a água servida à população de Ouro Preto continuou nos mesmos padrões de potabilidade (NMP de Coliformes termotolerantes em vários pontos da cidade igual a 240 / 100 mL), o que nos permitiu validar a combinação dos dados clínicos com o grau de saneamento local nesse mesmo período e afirmar que a água isenta de processo convencional de tratamento seria imprópria para consumo e até mesmo para atividades recreativas de contato físico primário, uma vez que o limite estabelecido pela Resolução CONAMA 274 / 00 para este fim é 200 Coliformes Termotolerantes / 100 mL.

Tal estudo poderá servir de base para a administração municipal, quanto a política de ações em prol do saneamento e saúde coletiva de Ouro Preto. Além disso, o presente trabalho vem, de modo inédito em Minas Gerais, mostrar a associação de linhagens patogênicas de *E. coli* circulantes na água de consumo de uma população e casos clínicos de diarreia.

## 6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Analisando os dados do presente trabalho pode-se concluir que:

A diarreia infantil continua prevalente em Ouro Preto.

O Rotavírus e os sorotipos patogênicos de *E. coli* continuam como principais agentes etiológicos da diarreia em Ouro Preto.

O principal fator de risco para a prevalência da diarreia em Ouro Preto refere-se à veiculação hídrica de enteropatógenos com destaque aos sorotipos de *E. coli* que além de patogênicos são multirresistentes aos antibióticos.

Outros fatores de risco para a prevalência da diarreia infecciosa em Ouro Preto estão associados às situações que dificultam o saneamento, como: Ocupação desordenada na área urbana, tipo precário de moradia, renda salarial familiar baixa e resistência cultural da população à implantação de estações de tratamento de água adequadas em Ouro Preto.

O presente trabalho poderá oferecer subsídios para a política local incentivar a população resistente a aceitação de novas técnicas para o saneamento da cidade



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-ELYAZEED, R. et al. Epidemiology of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Diarrhea in a Pediatric Cohort in a Periurban Area of Lower Egypt. **The Journal of Infectious Diseases**, 179 : 382 – 389. 1999

AFSET, J. E. et al. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhea. **Journal of Medical Microbiology**. 53 : 1137 – 1144. 2004

ALBERT, M. J. et al. Controlled Study of *Escherichia coli* Diarrheal Infections in Bangladesh Children. **Journal Of Clinical Microbiology**, 33 (4): 973-977. 1995.

ALDERETE, J. F. & ROBERTSON, D. C. Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, 19 : 1011 – 1020. 1978.

ALTMANN, K & MUKKUR T. K. S. Alternative Procedure for the Purification of the heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* pathogenic for calves. **Journal of Chromatography**, 420: 253-262. 1987.

ANDRADE, J.A.B ; OLIVEIRA , J.O.T.; FAGUNDES NETO, U. Letalidade em crianças hospitalizadas com diarréia aguda fatores de risco associados ao óbito. **Revista da Associação Médica do Brasil**, 45 (2) : 121- 127. 1999.

ANGULO F. J. et al. A community water-borne outbreak of salmonellosis and effectiveness of boil water order. **American Journal of Public Health**, 87: 580-584. 1997.

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 20 ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation: Washington.1998.

BALDINI, M. D. & CABEZALI, C. Occurrence of Antibiotic-resistant *Escherichia coli* Isolated from Environmental Samples. **Marine Pollution Bulletin**, 22 (10) : 500 – 503. 1991.

BALLESTER, D.; ESCOBAR, A. M. U. e GRISI, S. J. F. E. Tratamento não intervencionista da diarreia persistente. **Pediatria**, 25 (3) : 91 – 100. 2003.

BARON, E. J. et al. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 9th edition. Mosby – Year Books, Inc. St. Louis. 1994.

BEAUSOLEIL, H. E. & DUBREUIL, V. L. J. D. Trypan blue uptake by chinese hamster ovary culture epithelial cells: a cellular model to study *Escherichia coli* STb enterotoxin. **Toxicon**, 40: 185-191. 2002

BENICIO, M. H. D. et al. Estudo das condições de saúde das crianças do Município de São Paulo, SP (Brasil), 1984 – 1985. **Revista de Saúde Pública**, 21 (1) : 23 – 28. 1987.

BENICIO, M. H. D. & MONTEIRO, C. A. Tendência secular da doença diarreica na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). **Revista de Saúde Pública**, 34 : 83-90. 2000.

BOON P. I. & CATTANACH, M. Antibiotic resistance os native and faecal bacteria isolated from rivers, reservoirs and sewage treatment facilities in Victoria, south-eastern Australia. **Letters in Applied Microbiology**, 28 : 164 – 168.

BORGES L. G. A.; VECHIA V. D. & CORÇÃO G. Characterization and genetic diversity via REP-PCR of *Escherichia coli* isolates from polluted waters in southern Brazil. **FEMS Microbiology Ecology**, 1533: 1-8. 2002.

BRASIL. Portaria MS nº. 518. Ministério da Saúde. Vigilância em Saúde – Coordenação Geral de Vigilância em saúde Ambiental – Editora do Ministério da Saúde Brasília, 2005.

BRASIL. Resolução CONAMA nº. 274. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Brasília, 2000.

BRASILIA. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso - Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde. 2006.

CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* Categories among the Tradicional Enteropathogenic *E. coli* Serogroups – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 99 (6) : 545 – 552. 2004.

CARVALHO-ALMEIDA, T. T. Detection of *Cryptosporidium* sp. in non diarrheal faeces from children, in a day care center in the city of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto Medico Tropical de São Paulo**, 48 (1) : 27-32. 2006.

CARDOSO, D. D. P. et al. Genotyping of group A rotavirus samples from Brazilian children by probe hybridization. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, 34 : 471 – 473. 2001

CAUÁS, R. C. et al. Diarréia por rotavírus em crianças desnutridas hospitalizadas no Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira, IMIP. **Revista Brasileira Saúde Materna e Infantil**, 6 (1) : 77-83. 2006.

CHAPMAN, P. A. et al. An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O 157. **Journal of Medical Microbiology**, 35 : 107 – 110. 1991.

CLARKE, S. C. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* - an emerging problem?. **Diagnostic microbiology and Infectious Disease**, 41: 93-98. 2001.

COSTANZO, L. S. Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1999.

COSTA-MACEDO, L. M. et al. Enteroparasitoses em pré-escolares de comunidades favelizadas da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 14 (4) : 851 – 855 . 1998.

CRAVIOTO, A. et al. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhea. **Lancet**, 337 :262 – 264. 1991.

CUKOR, G. & BLACKLOW, N. R. Human viral gastroenteritis. **Microbiological Reviews**, 48 (2) : 157 – 179. 1984.

CYRINO, A. P. P. et al. Uso racional de medicamentos. Organização Pan-Americana de Saúde / Organização Mundial de Saúde / Ministério da Saúde. Brasil, 2003.

DATASUS, 2007. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>. Acesso em: 15/05/2007.

ECHEVERRIA, P.; SAVARINO, S. J.; YAMAMOTO, T. *Escherichia coli* diarrhoea. **Baillier's Clinical Gastroenterology**, 7: 243-262. 1993

FAGUNDES-NETO, U. & SCALETSKY, I. C. A. The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. **Revista Paulista de Medicina**, 118 (1) : 21 – 29. 2000.

FONSECA, A. F. C. **Controle do uso da água na Ouro Preto dos Séculos XVIII e XIX. Dissertação de Mestrado.** Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental. Mestrado em Recursos Hídricos. Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, M. G. 2004.

FRANÇA, E. et al. Associação entre fatores sócio-econômicos e mortalidade infantil por diarréia, pneumonia e desnutrição em região metropolitana so sudeste do Brasil: um estudo caso-controle. **Cadernos de Saúde Pública**, 17 (6) : 1437 – 1447. 2001.

FRANCO, R. M. B.; ROCHA-EBERHARDT , R. & CANTUSIO NETO, R. Brief communication occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the atibaia river, Campinas, Brazil. **Revista do Instituto Médico Tropical de São Paulo**, 43 (2) : 109 – 111. 2001.

FUCHS, S. C.; VICTORA, C. G. e FACHEL, J. Modelo hierarquizado: uma proposta de modelagem aplicada à investigação de fatores de risco para diarreia grave. **Revista de Saúde Pública**, 30 (2) : 168 – 178. 1996.

GAASTRA, W. & SVENNERHOLM, A. M. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **Trends in Microbiology**, 4: 444-452. 1996.

GOMES, T. A. et al. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brasil. **Journal of Infectious Diseases**, 164 (2) : 331 -337. 1991.

GUTH, B. E. C. Enterotoxigenic *Escherichia coli* – An Overview. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 95 (1) : 95-97. 2000.

HART, C. A.; BATT, R. M.; SAUNDERS, J. R. Diarrhoea caused by *Escherichia coli*. **Annals of Tropical Paediatrics**, 13: 121-131. 1993.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acessado em: 19/01/2007.

JOHNSON, J. R. & STELL, A. L. Extend virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **Journal of Infectious Diseases**, 181 : 261 – 272. 2000.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews/Microbiology**, 2 : 123 – 140. 2004.

KAPOOR, L. et al. Molecular typing of *Salmonella enterica* serotype Worthington isolates from infantile diarrhea. **Indian Journal of Medical Research**, 123 : 691 – 696. 2006.

KIRBY, W. M. & BAUER, A. W. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**. 45 (4) : 493-496. 1966

LARA, J. L. C. et al. Brote de Gastroenterites Associado al Consumo de Água Possivelmente Produzido Por Vírus Tipo Norwalk o Semejantes. **Revista Especializada em Salud Pública**, 69 (2) : 243 – 254. 1995.

LANNA, M. C. S. **Pesquisa de Rotavírus e outros Agentes Associados as Diarréias Humanas no Município de Ouro Preto, Minas Gerais. Dissertação de Doutorado.** Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 226p. 1993

LEVINE, M. M. Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infection in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. **American Journal of Epidemiology**, 138 : 849 -869. 1993.

MACRAE, M. et al. The sensitivity of *Escherichia coli* O157 to same antimicrobials by conventional and conductance assays. **Letters in Applied Microbiology**, 25 : 135 – 137. 1997.

MANGINI, A. C. S. Parasitismo por *Cryptosporidium* sp. em crianças com diarréia aguda. **Revista do Instituto Médico Tropical de São Paulo**, 34 (4) : 341 – 345. 1992.

MARCH, S. B. & RATNAM, S. Sorbitol – MacConkey Medium for Detection of *E. coli* O157:H7 Associated with Hemorrhagic Colits . **Journal of Clinical Microbiology**, 23 (5) : 869 – 872. 1986.

MCMICHAEL, T. Ecosystem change and public health: a global perspective. **Bulletin of World Health Organ**, 80 (2) : 171. 2001.

MCKEON, D. M.; CALABRESE, J. P. & BISSONNETTE, G. K. Antibiotic resistant gram-negative bacteria in rural groundwater supplies. **Elsevier Science Ltd**, 29 : 1902-1908. 1995.

MEAD, P. S. & GRIFFIN, P. M. *Escherichia coli* O:157:H7. **The Lancet**, 352: 1207-1212. 1998.

MEDEIROS, M. I. C. et al. Etiology of Acute Diarrhea Among Children in Ribeirão Preto – SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 43 (1) : 21 – 24. 2001.

MEHNERT, D. U. Vírus no ambiente aquático e o impacto da poluição por água de esgoto. **Resumo de conferências – V CAEB – Unicamp 2001**. Departamento de Microbiologia – ICB/USP. 2001

MEIRELES-PEREIRA, F. et al. Ecological aspects of the microbial resistance in bactéria of importance to human infections. **Brasilian Journal of Microbiology**, 33: 287- 293. 2002.

MONTGOMERY, J. R. School of primary medical care, University of Alabama, Huntsville. **Primary Care**, 15 (1) : 43 – 62. 1988.

MOORE, A. C. Waterborne disease in United States, 1991 and 1992. **Journal of the American Water Works Association**, 86: 87-89. 1994.

MORAES, D. S. L & JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, 36(3): 370-374. 2002.

MOTTA, M. E. F. A.; SILVA, G. A. P. Diarréia por parasitas. **Revista Brasileira de Saúde Maternal e Infantil**, 2 (2) : 117 – 127. 2002.

MURRAY, P. R. et al. Microbiologia Médica. 3<sup>rd</sup> Editora Guanabara Koogan. 2002.

NARDI, A. R. M. et al. Type 2 heat-labile enterotoxin (LT-II) producing *Escherichia coli* isolated from ostriches with diarrhea. **Veterinary Microbiology**, 105 : 245 – 249 p. 2005.

NATARO, J. P. & KAPPER, J. B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology**, 11: 141-201. 1998.

NEVES, K. O. Qualidade Microbiológica da Água de Abastecimento Público e Alternativo no Município de Ouro Preto, Minas Gerais. Mestrado em Engenharia Ambiental – Uso e Conservação de Recursos hídricos. Universidade Federal de Ouro Preto. Dissertação de Mestrado. 2003.

OLIVA, C. A. G. et al. Diarréia aguda grave associada à *Escherichia coli* enteropatogénica clássica (EPEC): características clínicas e perdas fecais em lactentes hospitalizados. **Revista da Associação Médica**, 43 (4) : 283 – 289 p. 1997.

OYOFO, B. A. et al. Enteropathogens associated with acute diarrhea in community and hospital patients in Yakarta, Indonesia. **Immunology and Medical Microbiology**, 34: 139 – 146. 2002.

OSHIRO, E. T. Prevalência do *Cryptosporidium parvum* em crianças abaixo de 5 anos, residentes na zona urbana de Campo Grande, MS, Brasil, 1996. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 33 (3) : 277-280. 2000.

PAYMENT P.; TRUDEL, M.; PLANTE, R. Elimination of viruses and indicator bacteria at each step of treatment during preparation or drinking water at seven water treatment plants. **Applied of environmental Microbiology**, 49 : 1418-28. 1985.

PECOTA, D. C. et al. Antimicrobial properties of the *Escherichia coli* R1 plasmid host Killing peptide. **Journal of Biotechnology**, 100: 1-12. 2003.

PEREIRA, F. M. et al. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. **Brazilian Journal of Microbiology**, 33: 287-293. 2002.

PRESTERRL, E. et al. Frequency and Virulence properties of Diarrheagenic *Escherichia coli* in Children With Diarrhea in Gabon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 69 (4) : 406 – 410. 2003.

PHILLIPS, A. D. Intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* mediates remodelling of the eukaryotic cell surface. **Microbiology**, 146: 1333-1344. 2000.



PHILLIPS, A. D. & FRANKEL, G. Mechanisms of gut damage by *Escherichia coli*. **Ballière's Clinical Gastroenterology**, 11 (3) : 465 – 483. 1997.

PONTUAL, J. P. S.; FALBO, A. R.; GOUVEIA, J. S. Estudo etiológico da diarreia em crianças hospitalizadas no Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira, IMIP, em Recife, Pernambuco. **Revista do Instituto de Saúde Maternal e Infantil**, 6 (1) : 11 – 17. 2006.

RIBEIRO, D. A. *Escherichia coli* isoladas da água de consumo: Caracterização fenotípica e genotípica das propriedades de virulência. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-graduação - Mestrado em Genética e Biologia Molecular – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2006.

RIVERA, N. G. & MARTINS, M. T. Bactérias enteropatogênicas no ambiente aquático. **Revista de ciências farmacêuticas**, 17: 115-136. 1996

RODRIGUES, J. et al. Prevalence of diarrheogenic *Escherichia coli* and rotavirus among children from Botucatu, São Paulo State, Brasil. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, 35 : 1311 – 1318. 2002.

ROBBINS-BROWNE, R. N. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. **Reviews of Infectious Diseases**, 9 : 28-53. 1987.

SABRÁ, A. ECEP, ECET, ECEA, ECEH, ECEI, ECAD: a *E. coli* revisitada no contexto da diarreia aguda. **Jornal de Pediatria**, 77 (1) : 5 – 7. 2002.

SALLES, R. K. & GOULART, R. Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias e microbiológicas de lactários hospitalares. **Revista Saúde Pública**, 31:131-139. 1997.

SEMENZA, J. C. et al. Water distribution system and diarrheal disease transmission: a case study in Uzbekistan. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 59 (6): 941 – 946. 1998.

SERVIN, A. A. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, 18 : 264 – 292. 2005.

SILVA, Z. N. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brasil. **Revista de Saúde Pública**, 35 (4) : 375 – 379. 2001.

SOLARTE, Y.; PEÑA, M.; MADERA, C. Transmisión de protozoários patógenos através del água para consumo humano. **Colômbia Médica**, 37 (1) : 74 – 82. 2006.

SOUZAL, E. C. et al. Perfil etiológico das diarréias agudas de crianças atendidas em São Paulo. **Jornal de Pediatria**, 77 (1) 31 - 38. 2002.

TEIXEIRA, J. C. & GUILHERMINO, R. L. Análise da associação entre saneamento e saúde nos estados brasileiros, empregando dados secundários do banco de dados indicadores e dados básicos para a saúde – IBD 2003. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, 11 (3) : 277 – 282. 2006.

TOLEDO, M. R. F. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. **Infection and Immunity**, 39 : 586 – 589. 1983.

TOMASI, E. et al. Uso de chupeta em crianças: contaminação fecal e associação com diarréia. **Revista de Saúde Pública**, 28 (5) : 373 – 379. 1994.

VENKATESWARAN, K. A simple filtration Technique to Detect Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and Toxins in Beff by Multiplex PCR. **Applied and Environmental microbiology**, 63 (10) : 4127 – 4131 p. 1997.

UNICEF. Situação da infância Brasileira 2006. Violações- Mortalidade. Disponível em: [http://www.unicef.org/brazil/Pags\\_008\\_019\\_Mortalidade.pdf](http://www.unicef.org/brazil/Pags_008_019_Mortalidade.pdf). Acessado em: 15/05/2007.

WALLACE, J. S. et al. Isolation of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O 157 from wild birds. **Journal of Applied Microbiology**, 82 : 399 – 404. 1997.

WALLACE, J. S. & JONES, K. The use of selective and differential agars in the isolation of *Escherichia coli* O157 from dairy herds. **Journal of Applied Bacteriology**, 81 : 663 – 668. 1996.

## 8 - ANEXO

### Meio de Carry & Blair (Modificado)

Fosfato Dissódico.....	.....1,10 g
Tioglicolato de Sódio .....	..... 1,50 g
Cloreto de Sódio .....	..... 5,0 g
Cloreto de Cálcio .....	..... 0,09 g
Agar .....	..... 1,16 g
Água qsp .....	1000 mL