

OCORRÊNCIA DE *Clostridium difficile* NAS FEZES DE CRIANÇAS DO RIO DE JANEIRO, RJ. (1)

Lourdes Botelho GARCIA (2) & Milton de UZEDA (3)

RESUMO

A ocorrência de *Clostridium difficile* foi analisada em amostras de fezes de 175 crianças com idade variando de 1 a 35 meses. Para o isolamento primário do microrganismo foi empregado o meio de cultura seletivo diferencial "CCFA" (cicloserina-cefoxitina-frutose-agar). Num grupo de 67 crianças sem distúrbios gastrintestinais e que não estavam sob uso de agentes antimicrobianos a ocorrência do *C. difficile* foi de 22,4%, enquanto que num outro grupo de 28 crianças nas mesmas condições, porém, sob tratamento com antimicrobianos, a ocorrência do microrganismo foi de 50%. Num terceiro grupo de 58 crianças com diarreia e sob antibioticoterapia a ocorrência de *C. difficile* atingiu 13,8%. Este mesmo percentual foi encontrado num quarto grupo de 22 crianças com diarreia, porém, sem tratamento com agentes antimicrobianos.

De um modo geral, os maiores índices de ocorrência de *C. difficile* foram encontrados em crianças com idade variando entre 1 a 12 meses (28,1%). Índices inferiores foram verificados entre crianças com idade superior a 1 ano. Outrossim, os resultados evidenciam que crianças com distúrbios gastrintestinais apresentam menor incidência deste microrganismo nas fezes. Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de crianças com e sem terapia antimicrobiana.

UNITERMOS: *Clostridium difficile*; Colite pseudomembranosa; Bactérias anaeróbias

INTRODUÇÃO

Atualmente, *Clostridium difficile* toxigênico é reconhecido como patógeno responsável pela colite pseudomembranosa associada à antibioticoterapia e tem sido também associado, por diversos autores, a quadros diarréicos menos graves provocados pelo uso de agentes anti-

microbianos^{11, 22}. Entretanto, além de comportar-se como patógeno dessas infecções, pode ser isolado a partir de fezes de indivíduos normais, principalmente crianças, com ocorrência variando entre 4-70%^{1, 14, 15, 21}. É importante ressaltar que em algumas destas crianças as cepas de *C. diffi-*

(1) Trabalho desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, como parte da Dissertação de Mestrado (Microbiologia) de Lourdes Botelho Garcia.

(2) Professora Assistente do Departamento de Farmácia Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

(3) Professor Adjunto do Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Endereço para correspondência: Prof. Milton de Uzeda, Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Microbiologia Médica, Caixa Postal 68040, CEP 21944 Rio de Janeiro, RJ., Brasil.

cile isoladas são produtoras de citotoxina, porém nestes casos, não estão relacionadas com distúrbios gastrintestinais, pois estas crianças comportam-se como portadoras assintomáticas⁷. Considerando a inexistência de dados epidemiológicos sobre portadores assintomáticos de *C. difficile* na população brasileira, o objetivo do presente trabalho foi estudar a ocorrência deste microrganismo nas fezes de crianças, tentando correlacioná-la com a presença de quadros diarréicos, bem como o uso de agentes antimicrobianos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 175 amostras de fezes de crianças com idade variando entre 1 e 35 meses, visando o isolamento de *Clostridium difficile*. Durante todo o trabalho foi coletada e analisada apenas uma amostra de fezes de cada criança proveniente do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira ou da Creche da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, RJ — Brasil). Com a finalidade de observar os possíveis efeitos da antibioticoterapia, e dos distúrbios gastrintestinais sobre o rendimento dos isolamentos de *C. difficile*, as crianças estudadas foram distribuídas em quatro grupos:

Grupo I: constituído de 67 crianças com idade variando entre 2 e 35 meses, que caracterizam-se por não apresentar sintomas gastrintestinais e não estar em uso de agentes antimicrobianos.

Grupo II: constituído de 28 crianças com idade variando entre 2 e 19 meses, que estavam internadas em enfermaria do hospital pediátrico, sob terapia antimicrobiana, porém sem apresentar distúrbios gastrintestinais.

Grupo III: constituído de 58 crianças com idade variando entre 2 e 24 meses, internadas em enfermaria do hospital pediátrico, apresentando sintomas gastrintestinais e sob terapia com agentes antimicrobianos.

Grupo IV: constituído de 22 crianças com idade variando entre 1 e 24 meses, internadas em enfermaria do hospital, apresentando sintomas gastrintestinais, sem uso de agentes antimicrobianos.

Todas as amostras de fezes foram coletadas e acondicionadas em frasco esterilizado, sem a utilização de meio de transporte. Logo após a coleta, os espécimes foram semeados em meio seletivo "CCFA" — agar cicloserina cefoxitina frutose⁹, com incubação anaeróbica em jarra Gas Pak ("Vented lid" — BBL) contendo mistura gasosa (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) a 37°C durante 48-72 horas. Todas as culturas foram submetidas à identificação presuntiva pela detecção de fluorescência das colônias. Posteriormente foi realizada a identificação através de testes bioquímicos¹³.

O teste X² foi empregado para efetuar a análise estatística dos resultados obtidos, utilizando-se o limite de confiança $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS

A ocorrência de isolamento de *C. difficile*, no total de amostras de fezes examinadas (175), foi de 22,9%.

A distribuição dos isolamentos de *C. difficile*, de acordo com as faixas etárias das crianças estudadas, é apresentada na tabela 1, evidenciando-se uma maior frequência de isolamentos nas fezes provenientes de crianças com até um ano de idade. A tabela 2 indica a ocorrência de *C. difficile* para cada um dos quatro grupos de crianças estudadas. Na tabela 3 pode ser evidenciado que crianças com distúrbios gastrintestinais (grupos III e IV) apresentam menor incidência deste microrganismo nas fezes em relação às que não apresentam este quadro clínico (grupos I e II); sendo respectivamente 13,7 e 30,5 as porcentagens de isolamento. Por outro lado pode ser verificado que o tratamento com agentes antimicrobianos não alterou o rendimento

TABELA 1
Comparação da ocorrência de *C. difficile* nas fezes de 175 crianças agrupadas em faixas etárias até 36 meses

Faixa etária das crianças (meses)	N.º de amostras fezes analisadas	N.º de culturas positivas para <i>C. difficile</i> (%)
1 - 12	128	36 (28,1)
13 - 36	47	4 (8,5)
TOTAL	175	40 (22,9)

Diferença estatisticamente significativa.
P < 0,001 (Teste X²), P crítico = 0,05.

TABELA 2

Ocorrência de *C. difficile* nas fezes de 175 crianças agrupadas de acordo com a presença ou ausência de quadros diarreicos, com e sem tratamento com agentes antimicrobianos.

Grupos de crianças	Nº de amostras de fezes analisadas	Nº de culturas positivas para <i>C. difficile</i> (%)	Valor de P (Teste χ^2) P crítico = 0,05
I	67	15 (22,4)	
II	28	14 (50,0)*	0,007
III	58	8 (13,8)	0,21
IV	22	3 (13,6)	0,37
TOTAL	175	40 (22,9)	

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo I (controle)

Grupo I — Controle, crianças sem diarreia e sem tratamento com antimicrobianos.

Grupo II — Crianças sem diarreia, sob tratamento com antimicrobianos.

Grupo III — Crianças com diarreia, sob tratamento com antimicrobianos.

Grupo IV — Crianças com diarreia, sem tratamento com antimicrobianos.

TABELA 3

Ocorrência de *C. difficile* nas fezes de 175 crianças agrupadas de acordo com a presença ou ausência de quadros diarreicos.

Grupos de crianças	Nº de amostras de fezes analisadas	N. de culturas positivas para <i>C. difficile</i> (%)
I + II ^a	95	29 (30,5)
III + IV ^b	80	11 (13,7)
TOTAL	175	40 (22,9)

Diferença estatisticamente significativa.

P < 0,001 (Teste χ^2), P crítico = 0,05.

a — crianças sem diarreia

b — crianças com diarreia

TABELA 4

Ocorrência de *C. difficile* nas fezes de 175 crianças agrupadas de acordo com o uso ou não de agentes antimicrobianos no tratamento de processo infeccioso.

Grupos de crianças	Nº de amostras de fezes analisadas	Nº de culturas positivas para <i>C. difficile</i> (%)
I + II ^a	89	18 (20,2)
III + IV ^b	86	22 (25,6)
TOTAL	175	40 (22,9)

Não houve diferença estatisticamente significativa

P = 0,40 (Teste χ^2), P crítico = 0,05.

a — crianças sem tratamento com antimicrobianos

b — crianças com tratamento com antimicrobianos

resultados encontrados nas crianças com antibioticoterapia (grupos II e III) e sem tratamento com agentes antimicrobianos (grupos I e IV).

DISCUSSÃO

Vários estudos têm sido realizados por diversos pesquisadores em diferentes países, relatando a ocorrência de *C. difficile* em crianças. De um modo geral os índices apresentados são muito variados, principalmente quando se leva em consideração a faixa etária das crianças^{1, 5, 6, 12, 15, 20}.

As amplas variações nos índices de isolamentos encontrados pelos diversos autores em diferentes regiões geográficas são difíceis de se esclarecer. Entretanto, é possível que as diferenças na alimentação ou exposição a fontes ambientais contendo o microrganismo sejam fatores importantes para justificar essas ocorrências.

Em nosso estudo os maiores índices de isolamento foram encontrados em crianças na faixa etária de 1 a 12 meses. Um decréscimo acentuado na ocorrência de *C. difficile* foi verificado em crianças com idade superior a 12 meses. Esses resultados são compatíveis com aqueles encontrados por vários autores^{5, 6, 15, 18, 20}, mostrando claramente que *C. difficile* pode ser isolado de crianças, principalmente durante o primeiro ano

dos isolamentos de *C. difficile*, pois não houve diferença estatisticamente significativa entre os

de vida. Segundo STARK *et al* (1982)¹⁸, índices elevados (30%) ainda ocorrem em crianças com idade variando entre 1 a 2 anos, entretanto é consideravelmente menor (5,9%) em crianças com 2 anos completos.

Baseando-se em dados experimentais, vários pesquisadores têm procurado explicações para esclarecer a elevada ocorrência de *C. difficile* em crianças normais ou doentes, principalmente durante o primeiro ano de vida. Possivelmente, a permanência no hospital após o nascimento e a alimentação são fatores importantes influenciando não só na colonização no intestino da criança pelo *C. difficile*, como também na composição da flora intestinal de uma maneira geral^{1, 5, 6, 18}. Após o primeiro ano de vida a flora intestinal sofre alterações e tende a se estabilizar, aproximando-se qualitativamente a de adultos³. Com a aquisição de uma flora normal competidora instalam-se no intestino vários microrganismos que disputam espaço e nutrientes, gerando condições desfavoráveis para o crescimento de *C. difficile* e, conseqüentemente, diminuindo o índice de portadores^{8, 16, 18, 20}.

Os agentes antimicrobianos utilizados no tratamento das crianças estudadas não interferiram no índice de isolamento. Tem sido sugerido por alguns autores^{3, 10, 11, 16} que vários agentes antimicrobianos alteram a flora normal do trato gastrointestinal permitindo a colonização e/ou proliferação de *C. difficile* no intestino humano. Entretanto, em nossos estudos bem como em outros realizados com crianças, não foi constatada diferença significativa entre índices de isolamentos de crianças tratadas e não tratadas^{4, 20, 21}.

Diferenças significativas de isolamentos foram encontradas entre crianças com ou sem distúrbios gastrintestinais. Resultados similares foram relatados anteriormente por outros autores^{14, 17, 21}. A diminuição dos índices de isolamentos poderia ser explicada pelas alterações dos componentes da flora fecal¹⁴; certos fatores que favorecem a instalação de *C. difficile* são modificados interferindo em sua colonização²¹. Além disso, é possível que a grande perda de líquidos que ocorre freqüentemente em quadros diarreicos dificultem a detecção de *C. difficile*, principalmente se este microrganismo estiver presente em pequeno número no intestino.

É necessário ressaltar que, apesar das diarreias e colites associadas à terapia antimicrobiana serem raras em crianças^{2, 7, 19}, e não terem sido detectadas, até o momento, em indivíduos da população do Brasil, elas podem ocorrer¹¹. Neste sentido os indivíduos portadores assintomáticos de *C. difficile* poderiam ser considerados como mais suscetíveis a esses quadros clínicos.

SUMMARY

OCURRENCE OF *Clostridium difficile* IN FECAL SAMPLES OF CHILDREN IN RIO DE JANEIRO, RJ.

The occurrence of *Clostridium difficile* in stool specimens from 175 children, 1 to 35 months old, was examined. Cycloserine-cefoxitin — fructose agar (CCFA) was employed for the primary isolation of the microorganism. In a group of 67 children without symptoms of gastrointestinal disorders and not under antimicrobial therapy the microorganism was isolated from 22.4% of them, while in another group of 28 children, also showing no symptoms of gastrointestinal disorders but under antimicrobial therapy, *C. difficile* was isolated from 50%. In a third group of 58 children with diarrhea and under antimicrobial therapy this microorganism was isolated from 13.8%. A similar ratio was found in a fourth group of 22 children with diarrhea but not under antimicrobial therapy.

The highest percents of isolation of *Clostridium difficile* were found among children with ages between 1 and 12 months old (28.1%). The results also showed that the children with gastrointestinal disorders had lower occurrence of this microorganism in stool specimens. On the other hand, there was no statistically significant difference between the children groups under antimicrobial therapy or not.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao corpo clínico do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira da UFRJ pelas facilidades e cooperação na seleção de casos e coleta dos espécimes das crianças. Ao Dr. Paulo de Souza Muniz agradecem a análise estatística dos resultados e sugestões oportunas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AL JUMAILI, I. J.; SHIBLEY, M.; LISHMAN, A. H. & RECORD, C. O. — Incidence and origin of *Clostridium difficile* in neonates. *J. clin. Microbiol.*, 19: 77-78, 1984.
2. BARTLETT, J. G. — Antibiotic associated pseudomembranous colitis. *Hosp. Pract.*, 16:85-95, 1981.
3. BARTLETT, J. G. — Virulence factors of anaerobic bacteria. *Johns Hopk. med. J.*, 151: 1-9, 1982.
4. COLLIGNON, A.; COTTE LAFFITTE, J.; QUERO, A. M. & TORLOTIN, J. C. — *Clostridium difficile* et sa cytotoxine dans les selles de jeunes enfants hospitalisés. Influence du traitement antibiotique. *Path. biol.*, 34: 977-982, 1986.
5. COOPERSTOCK, M. S.; STEFFEN, E.; YOLKEN, R. & ONDERDONK, A. — *Clostridium difficile* in normal infants and sudden infant death syndrome: an association with infant formula feeding. *Pediatrics*, 70: 91-95, 1982.
6. COOPERSTOCK, M.; RIEGLE, L.; WOODRUFF, C. W. & ONDERDONK, A. — Influence of age, sex, and diet on asymptomatic colonization of infants with *Clostridium difficile*. *J. clin. Microbiol.*, 17: 830-833, 1983.
7. DONTA, S. T. & MYERS, M. G. — *Clostridium difficile* toxin in asymptomatic neonates. *J. Pediat.*, 100: 431-434, 1982.
8. FALSEN, E.; KAIJSER, B.; NEHLS, L.; NYGREN, B. & SVEDHEM, A. — *Clostridium difficile* in relation to enteric bacterial pathogens. *J. clin. Microbiol.*, 12: 297-300, 1980.
9. GEORGE, W. L.; SUTTER, V. L.; CITRON, D. & FINEGOLD, S. M. — Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J. clin. Microbiol.*, 9: 214-219, 1979.
10. GEORGE, W. L.; ROLFE, R. D. & FINEGOLD, S. M. — *C. difficile* and its cytotoxin in feces of patients with antimicrobial agent associated diarrhea and miscellaneous conditions. *J. clin. Microbiol.*, 15: 1049-1053, 1982.
11. GILLIGAN, P. H.; MC CARTHY, L. R. & GENTA, V. M. — Relative frequency of *Clostridium difficile* in patients with diarrheal disease. *J. clin. Microbiol.*, 14: 26-31, 1981.
12. HALL, I. C. & O'TOOLE, E. — Intestinal flora in new born infants. *Amer. J. Dis. Child.*, 49: 390-402, 1935.
13. HOLDEMAN, L. V.; CATO, E. P. & MOORE, W. E. C. — *Anaerobe laboratory manual*, 4th ed. Blacksburg, Va., Virginia Polytechnic Institute & State University, 1977.
14. MARDH, P. A.; HELIN, I.; COLLEEN, I.; OBERG, M. & HOLST, E. *Clostridium difficile* toxin in faecal specimens of healthy children and children with diarrhoea. *Acta paediat. scand.*, 71: 275-280, 1982.
15. NASH, J. Q.; CHATTOPADHYAY, B.; COMBE, J. H. & TABAQCHALI, S. — *Clostridium difficile* and cytotoxin in routine faecal specimens. *J. clin. Path.*, 35: 561-565, 1982.
16. ROLFE, R. D.; HELEBIAN, S. & FINEGOLD, S. M. Bacterial interference between *Clostridium difficile* and normal fecal flora. *J. infect. Dis.*, 143: 470-475, 1981.
17. SHERERTZ, R. J. & SARUBBI, F. A. — The prevalence of *Clostridium difficile* and toxin in a nursery population: a comparison between patients with necrotizing enterocolitis and an asymptomatic group. *J. Pediat.*, 100: 435-439, 1982.
18. STARK, P. L.; LEE, A. & PARSONAGE, B. D. — Colonization of the large bowel by *Clostridium difficile* in healthy infants: quantitative study. *Infect. Immun.*, 35: 895-899, 1982.
19. SUTPHEN, J. L.; GRAND, R. J.; FLORES, A.; CHANG, T. W. & BARTLETT, J. G. — Chronic diarrhea associated with *Clostridium difficile* in children. *Amer. J. Dis. Child.*, 137: 275-278, 1983.
20. SVEDHEM, A.; KAIJSER, B. & MACDOWALL, I. — Intestinal occurrence of *Campylobacter fetus* subspecies jejuni and *Clostridium difficile* in children in Sweden. *Europ. J. clin. Microbiol.*, 1: 29-32, 1982.
21. TORRES, J. F.; CEDILLO, R.; SANCHEZ, J.; DILLMAN, C.; GIONO, S. & MUNOZ, O. — Prevalence of *Clostridium difficile* and its cytotoxin in infants in Mexico. *J. clin. Microbiol.*, 20: 274-275, 1984.
22. WILLEY, S. H. & BARTLETT, J. G. — Cultures for *C. difficile* in stools containing a cytotoxin neutralized by *Clostridium sordelli* antitoxin. *J. clin. Microbiol.*, 10: 880-884, 1979.

Recebido para publicação em 12/5/1988.