

ELIZABETH SOARES DA SILVA

*Estudo do Conteúdo de Lactoferrina Fecal em
Diarréia Infeciosa*

Dissertação apresentada à
Universidade Federal do
Ceará para obtenção do
Título de Mestre em
Farmacologia

TESE
616.3107
S 586 e
1994

FC-00002619-6

Fortaleza

1994

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
Biblioteca de ...

ELIZABETH SOARES DA SILVA

*Estudo do Conteúdo de Lactoferrina Fecal em
Diarréia Infecçiosa*

Orientador: Aldo Ângelo Moreira Lima

Fortaleza

1994

"Buscai, pois, em primeiro lugar o reino de Deus e a sua justiça e todas estas coisas vos serão acrescentadas." (Mt 6:33)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois em tudo me fortalece.

A minha família, pelo apoio em todos os momentos.

Ao Dr. César Lincoln Campelo Maia, pela sincera amizade e apoio científico.

Ao Dr. Richard Lawson Guerrant, pela autoria da hipótese principal dessa dissertação e orientação no estudo realizado na Universidade de Virginia.

Ao professores de Estatística Roberto Cláudio Frota Bezerra, Maurício Mota e Rosa Salani Mota, os quais colaboraram na análise estatística dos dados dessa dissertação.

Ao Dr. Marcelo Gurgel, pelo fornecimento das referências bibliográficas de epidemiologia clínica, imprescindíveis para a conclusão deste estudo.

Ao Prof. Dr. Manassés Fonteles, pela colaboração na resolução de problemas científicos desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, pelo profícuo estímulo à pesquisa científica.

Ao Prof. Manoel Bezerra Campêlo Neto, pela imprescindível ajuda na confecção formal dessa dissertação.

A Jânia Teixeira, Maria do Carmo, Isabel, Conceição e Ivo, pelo apoio no trabalho de laboratório.

Aos bibliotecários Sálema, Rejane, Norma, Mônica e César pela paciência e colaboração na aquisição de literatura médica científica.

A Selma Lessa de Castro, pela ajuda nas correções de texto.

Apoio financeiro: Laboratório Tech Lab (USA) e CAPES (Brasil).

SUMMARY

Lactoferrin is a 78-Kd glycoprotein found in various organic fluids and in low concentrations in the gastrointestinal tract. This study was undertaken to verify if lactoferrin is a marker of intestinal acute inflammation determined by enteric pathogens.

We utilized a latex agglutination test to detect lactoferrin in fecal samples in two different studies. Determination of the cutoff was carried out comparing the results of the latex agglutination test expressed in titers with the presence or absence of leucocytes in fecal specimens of children and adult patients and controls. Ultimate correlation of the results and specific etiologic agents was done.

The measurement of fecal lactoferrin was done in 72 control samples and in a 168 samples of Brazilian children with acute and persistent diarrhea in a case control study carried out in Fortaleza, Brazil, from 1988 to 1991. The cutoff of the test established to children was 1/100. Titers equal or over 1/200 were considered abnormal to children. The comparison of latex agglutination test with fecal leukocyte examination showed good correlation. The test sensitivity (0.74) was significantly higher than that of fecal leukocytes (0.60). Results were false negative in 13% and false positive in 27%. The specificity of the latex agglutination anti-lactoferrin test was 0.88 and positive predictive value was 0.93. Correlation of fecal lactoferrin titers with

specific diarrhoeagenic pathogens revealed that either invasive or non-invasive pathogens presented high fecal lactoferrin titers without a distinctive cutoff between them.

Three hundred and forty seven fecal samples from adult inpatients with diarrhea of the University of Virginia Hospital, Charlottesville, USA, and 65 control samples were evaluated by latex agglutination test, CHO cell culture assay, and ELISA for the detection of fecal lactoferrin, *Clostridium difficile* toxins B and A, respectively. The cutoff for adults was established in $<1/50$. Titers equal or over $1/50$ were considered abnormal. Fecal lactoferrin showed variable sensitivity in samples positive by CHO cell assay for toxin B (38% - 74%) and positive by ELISA for toxin A (60%). We observed increasing sensitivity of the anti-lactoferrin latex agglutination test in correlation with increasing titers of toxin B detected by CHO cell assay.

The overall evaluation of these two studies let us conclude that fecal lactoferrin is not a marker of intestinal inflammatory diarrhea but an indicator of enteric lesion by inflammatory and non-inflammatory etiologic agents. Increased fecal lactoferrin concentration suggest that it could originate either from neutrophil degranulation in the gut or from local mucosal epithelial intestinal cells. It could be a screening test for further fecal microbiological studies in hospitalized patients with *C. difficile* associated diarrhea diagnostic hypothesis.

RESUMO

A lactoferrina é uma glicoproteína de 78-Kd que se encontra em numerosos fluidos orgânicos e em baixas concentrações no trato gastrointestinal. O presente estudo tem por objetivo averiguar se a lactoferrina é um marcador de inflamação intestinal aguda.

Utilizou-se um teste de aglutinação pelo látex para detecção de lactoferrina fecal em amostras fecais em dois estudos diferentes. A determinação do ponto de corte ("cutoff") do método foi realizada comparando-se os resultados do teste em estudo expresso em títulos com a presença ou ausência de neutrófilos nas fezes de crianças e adultos com diarreia e controles. Foi realizada ulterior correlação dos resultados com agentes etiológicos específicos de diarreia infecciosa.

A medida de lactoferrina fecal foi feita em 72 amostras controles e 168 amostras de diarreia aguda e persistente de crianças brasileiras menores de 5 anos de um estudo caso-controle realizado em Fortaleza no período de 1988 a 1991. O ponto de corte do método encontrado para crianças foi de 1/100. Títulos maiores ou iguais a 1/200 foram considerados anormais. Ao se fazer a comparação com a pesquisa de leucócitos nas 168 amostras fecais diarreicas, observou-se boa correlação, porém elevado número de falsos positivos (27%). Houve 13% de falsos negativos. A sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo foram 0.74, 0.88 e 0.93, respectivamente. A correlação dos títulos de lactoferrina fecal com etiologias específicas de diarreia revelou que tanto patógenos invasivos quanto não invasivos se associavam a elevados títulos de lactoferrina nas amostras diarreicas. Assim, não houve distinção de títulos inflamatórios e não inflamatórios.

Trezentas e quarenta e sete amostras de diarreia de pacientes adultos internados no Hospital da Universidade de Virginia e 65 amostras controles foram avaliadas pelo teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina e por cultura de células "CHO" e ELISA para detecção de toxinas B e A do *C. difficile*. O ponto de corte do teste para adultos foi estabelecido em $<1/50$. Títulos maiores ou iguais a $1/50$ foram considerados anormais. A lactoferrina fecal mostrou boa correlação com amostras positivas para toxinas do *C. difficile* pela cultura de células e/ou ELISA, com sensibilidade variável de 38 a 74%, porém sempre igual ou maior à sensibilidade da pesquisa de leucócitos. A especificidade e valor preditivo neste estudo foram 0.94 e 0.97, respectivamente. Observou-se sensibilidade crescente do teste para lactoferrina em correlação com a elevação dos títulos de toxina B.

A análise global dos dados dos dois estudos de diarreia em crianças e adultos leva-nos a concluir que a lactoferrina não é um marcador de diarreia inflamatória, porém é um indicador de lesão entérica por agentes etiológicos de diarreia inflamatória e não inflamatória. A elevação das concentrações de lactoferrina fecal sugere que esta possa ser proveniente da degranulação neutrofílica ou produção autóctone pelas células epiteliais intestinais. Essa proteína poderia servir como critério de seleção de amostras fecais de pacientes hospitalizados com hipótese diagnóstica de diarreia associada a antibiótico que devam seguir para ulterior análise laboratorial de toxinas A e/ou B.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	01
OBJETIVO	17
MATERIAL E MÉTODO	18
RESULTADOS	29
DISCUSSÃO	53
CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	38
FIGURA 2	39
FIGURA 3	40
FIGURA 4	41
FIGURA 5	42
FIGURA 6	43
FIGURA 7	44
FIGURA 8	45
FIGURA 9	46
FIGURA 10	47
FIGURA 11	48
FIGURA 12	49
FIGURA 13	50
FIGURA 14	51
FIGURA 15	52

1-INTRODUÇÃO

Lactoferrina: caracterização e papel biológico

A lactoferrina ou lactotransferrina foi inicialmente isolada em leite bovino por Sorensen & Sorensen em 1939 (MASSON e col., 1969). É uma glicoproteína de cadeia única que se liga a dois átomos de ferro e faz parte da família das transferrinas. Esta família de proteínas caracteriza-se por sua capacidade de se ligar reversivelmente ao ferro com alta afinidade. A completa seqüência de aminoácidos da lactoferrina de glândula mamária humana já foi determinada (POWELL & OGDEN, 1990; REY e col., 1990). Existem múltiplas formas moleculares desta proteína de 78-Kd no leite humano. A forma convencional ligante de ferro é denominada Lf- α , enquanto outras designadas Lf- β e Lf- γ possuem potente atividade de ribonuclease. Semelhantes formas também foram encontradas em grânulos secundários de granulócitos normais e leucêmicos. Esses dados sugerem diferentes funções para esta proteína (FURMANSKI e col., 1989; FURMANSKI & LI, 1990).

A lactoferrina tem ampla distribuição em fluidos orgânicos. Vários estudos mostram sua presença em concentrações normais em indivíduos sadios ou alteradas durante processos biológicos que modificam a composição das secreções externas. Assim, sua presença já foi determinada no muco vaginal (COHEN e col., 1987), lágrima (FULLARD & TUCKER, 1991), secreções nasais (RAPHAEL e col., 1989), saliva (PAGE e col., 1990), fluido seminal (THALER e col., 1990), bile, suco pancreático, muco traqueal, leite, suor, urina e fezes de seres humanos (MASSON e col., 1966; GOLDMAN e col., 1990; GUERRANT e col., 1992). A localização tecidual da lactoferrina tem sido bem demonstrada através de estudos imunohistoquímicos e de expressão protéica em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de glândulas salivares, carcinoma de mama e tireóide dentre outros (CHOMETTE e

col., 1991; CAMPBELL e col., 1992; BEDROSSIAN, 1988). Em tecidos normais ou com patologias não neoplásicas já foi descrita a presença de lactoferrina em células epiteliais do estômago, intestino delgado, próstata e vesículas seminais (LUQMANI e col., 1991; TETSUO e col., 1993; WICHMANN e col., 1989). Aparece também como antígeno de superfície em linfócitos B (BUTLER e col., 1990). A ampla distribuição da lactoferrina em tecidos epiteliais e barreiras mucosas sugere um importante papel biológico para esta proteína.

A concentração de lactoferrina no leite humano diminui com a idade da lactação. Sua concentração média no colostro, leite transicional e leite maduro foi de 6.7, 3.7 e 2.6 g/l, respectivamente, ao ser determinada por método imunoeletroforético (HIRAI e col., 1990). A forma predominante de lactoferrina no leite materno caracteriza-se por exibir baixa saturação de ferro (1.5%), o que lhe confere a capacidade de desempenhar função bacteriostática no trato gastrointestinal (DONANGELO e col., 1991).

Recentemente foi caracterizado um receptor específico para lactoferrina humana e de macacos na membrana de células intestinais com borda em escova. Este receptor tem o papel de facilitador da absorção intestinal de ferro e manganês (DAVIDSON & LÖNNERDAL, 1989). A degradação da lactoferrina proveniente da saliva e leite materno em lactoferricina ocorre no trato gastrointestinal através da digestão pela pepsina gástrica. Esse peptídeo tem ação bactericida mais potente que a lactoferrina sobre numerosas bactérias da flora intestinal e patógenos entéricos como *E. coli*, *S. enteritidis*, *Y. enterocolitica*, *C. jejuni* ou sobre outras bactérias produtoras de toxina entérica como *B. cereus*, *S. aureus* e *C. perfringens* (BELLAMY e col., 1992).

A complexa interação da lactoferrina com diversos microorganismos, principalmente as bactérias, tem sido largamente estudada em experimentos *in vitro* e

in vivo (CZIRÓK e col., 1990). Tanto as bactérias quanto os mamíferos necessitam de ferro para a sua sobrevivência. Em seres humanos, a lactoferrina, bem como a transferrina, ligam-se ao íon ferroso, sequestrando-o das bactérias. Esse mecanismo é capaz de manter o nível de ferro livre abaixo daquele requerido para o crescimento bacteriano (0.4 a 1 μ M), especialmente quando a lactoferrina está na forma não saturada (apolactoferrina). Ellison III e colaboradores demonstraram que a lactoferrina não saturada era capaz de produzir lesão e alteração da permeabilidade da membrana externa de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. Outros experimentos mostraram que isoladamente a lactoferrina tem efeito bacteriostático. Efeito bactericida foi observado ao se combinar com a lisozima (ELLISON III e col., 1988; ELLISON III & GIEHL, 1991). A ação lesiva da lactoferrina sobre a parede de bactérias Gram-negativas aumenta o potencial bactericida de alguns antibióticos (ELLISON III e col., 1990).

Por outro lado, algumas espécies de bactérias são capazes de secretar substâncias de baixo peso molecular denominadas sideróforos. Esses compostos são capazes de remover o ferro ligado à lactoferrina ou à transferrina. A secreção desses quelantes do ferro está bem descrita como mecanismo adaptativo em *E. coli*, *S. flexneri* e *S. typhimurium*. A lactoferrina apresenta graus variáveis de ligação específica ou inespecífica a essas e outras bactérias intestinais e extra-intestinais (NAIDU e col., 1991; TIGYI e col., 1992; NAIDU e col., 1993). No caso da *Neisseria gonorrhoeae*, após a ligação da lactoferrina aos receptores específicos de membrana, ocorre remoção do ferro pela bactéria (BLANTON e col., 1990).

O papel da lactoferrina sobre o tecido hematopoiético tem sido bastante estudado nos últimos dez anos. Classificada também como uma citocina, essa proteína causa supressão da medula óssea hematopoiética por diminuir indiretamente a produção de fatores estimuladores de colônia. A interleucina-1, cujo papel inclui estimulação da liberação de fatores estimuladores de colônias hematopoiéticas a partir

de células acessórias à medula óssea, possui sua liberação diminuída pela lactoferrina. Entretanto, a interleucina-6 e lipopolissacarídeo bacteriano são capazes de anular o efeito supressor da lactoferrina (BROXMEYER, 1992).

Uma boa evidência de que a lactoferrina desempenha um importante papel nos mecanismos de defesa do organismo é o desenvolvimento de infecções bacterianas recorrentes de pele em pacientes com deficiência de lactoferrina nos grânulos secundários dos neutrófilos (RAPHAEL e col., 1989). A lactoferrina é capaz de catalisar a reação de Haber-Weiss em neutrófilos ativados ao fornecer íon ferroso para a formação de $\text{OH}\cdot$, um potente oxidante, a partir de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio em pH ácido. Exerce, desta forma, atividade bactericida via agentes oxidantes (KLEBANOFF & WALTERSDORPH, 1990; SÁNCHEZ, 1992).

Ainda dentro do contexto da inflamação, observou-se que a lactoferrina sensibiliza os polimorfonucleares a produzir mais superóxido e a exibir maior motilidade (GAHR e col., 1991). Os monócitos apresentam receptores de membrana para lactoferrina. Em condições normais, menos de 10% dos receptores são ocupados, porém taxas superiores a 50% são encontradas durante estados inflamatórios do organismo humano. A lactoferrina saturada de ferro é então internalizada para o citoplasma, onde o ferro é deslocado para a ferritina. Esse processo leva à diminuição do ferro sérico em doenças inflamatórias (BIRGENS e col., 1991). Finalmente, evidências sugerem que níveis séricos elevados de lactoferrina correlacionam-se com a degranulação neutrofílica que ocorre em septicemias, uma vez que os polimorfonucleares parecem ser a única fonte de lactoferrina intravascular (NUIJENS e col., 1992).

Visão panorâmica de diarreia infecciosa

A diarreia é uma das doenças mais comuns no homem. Embora na maioria das vezes seja de fácil tratamento, torna-se ameaçadora à vida quando fatores do hospedeiro e ambientais desfavoráveis impedem o pronto estabelecimento de terapêutica e profilaxia adequadas. Desta forma, ambientes populosos e sem o desejado nível de saneamento básico e educação sanitária constituem meio favorável ao desenvolvimento tanto endêmico quanto epidêmico de patógenos entéricos (MATA & GUERRANT, 1988).

A estimativa da incidência de diarreia em crianças com menos de 5 anos de idade em países em desenvolvimento na década de 70 foi de 2.2 episódios de diarreia por criança por ano, com uma estimativa de incidência e mortalidade total anual de doença diarreica na mesma faixa etária de 744-1000 milhões de episódios e 4.6 milhões de mortes ao se utilizar dados provenientes da África, Ásia e América Latina (SNYDER & MERSON, 1982).

Dez anos após o trabalho de Snyder & Merson, observou-se que a incidência de diarreia nas citadas regiões em desenvolvimento, na década de 80, permaneceu virtualmente a mesma, qual seja, 2.6 episódios por criança por ano ou 1 bilhão de episódios por ano, enquanto a mortalidade total foi reduzida significativamente para 3.3 milhões de mortes por ano. Este último fato provavelmente reflete os esforços mundiais em melhorar os recursos básicos de atendimento em saúde, tendo como ênfase o estabelecimento da terapêutica de reidratação oral (BERN e col., 1992).

Um estudo realizado em 1985 em duas cidades do sul do Brasil, onde 90% das crianças estudadas tiveram acesso a cuidados médicos, mostra ser a diarreia persistente a principal causa de mortalidade por diarreia (62%), enquanto a diarreia aguda e a

disenteria revelaram uma proporção de 28% e 10%, respectivamente. Esses resultados demonstram a eficácia do acesso a cuidados médicos e terapia de reidratação oral em reduzir a mortalidade por diarreia aguda, bem como os diferentes padrões clínicos de apresentação das diarreias e seu impacto no prognóstico (VICTORA e col., 1992).

A afirmação de que diarreia predispõe à desnutrição é um consenso na prática médica. De fato, Leslie estimou uma perda estatural de 5cm no segundo ano de vida relacionada à presença de 6 a 7 episódios de diarreia em crianças do Nordeste brasileiro (GUERRANT & McAULIFFE, 1986). Desnutrição, por sua vez, está associada à maior incidência e duração dos episódios diarreicos (SCHORLING e col., 1990). Secundariamente, instala-se a má absorção intestinal dos nutrientes devido às múltiplas ações de patógenos intestinais isolados ou em combinação com o estado hipoplásico da mucosa intestinal ligado à desnutrição *per se* (SULLIVAN e col., 1991; SULLIVAN e col., 1992). Forma-se, assim, o clássico ciclo vicioso de diarreia, desnutrição e má absorção. A magnitude deste ciclo reflete-se nos altos índices de mortalidade por diarreia e no retardo do crescimento e desenvolvimento infantis.

Os agentes infecciosos constituem a mais frequente causa de diarreia dentre os diversos mecanismos etiopatogênicos desta enfermidade intestinal intensamente pesquisada (RUBINOFF & FIELD, 1991; FIELD e col., 1989; TAMAI e col., 1992). Uma forma de classificação de diarreias amplamente aceita na prática médica divide-as em diarreias não inflamatórias e inflamatórias, segundo a ausência ou presença de leucócitos nas fezes (GUERRANT & McAULIFFE, 1986; GUERRANT, 1990a; GUERRANT, 1990b).

Dentro do grupo de diarreias não inflamatórias estão aquelas causadas por *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (*E. coli*) enterotoxigênica (ECET), dentre outras bactérias produtoras de enterotoxinas citotônicas, as quais promovem diarreia aquosa com variáveis graus

de severidade (ACHESON, 1992; BOBAK & GUERRANT, 1992). A *Escherichia coli* enteropatogênica (ECEP), responsável por diarreia aquosa sem sangue, acomete principalmente as crianças. Seu mecanismo patogênico foi recentemente revisado (DONNENBERG & KAPER, 1992). Um outro tipo de *E. coli* denominado enterohemorrágica (ECEH) causa severa diarreia sanguinolenta por vezes complicada com síndrome hemolítico-urêmica, estando associada à produção de uma Verotoxina (CRANE & GUERRANT, 1988; BURKE e col., 1993). A principal causa de diarreia aguda em crianças em todo o mundo são as gastroenterites por Rotavírus, Norwalk e Norwalk-like vírus, Astrovírus e Adenovírus dentre outros, os quais podem levar à severa desidratação por perda aquosa (HAMILTON, 1988; AVERY e col., 1992). Desta categoria de diarreia não inflamatória ainda fazem parte as enteroparasitoses causadas por *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium spp.* (RAVDIN e col., 1988; FAYER & UNGAR, 1986).

As diarreias inflamatórias são provocadas por patógenos invasores da parte distal da mucosa do intestino delgado ou do cólon, os quais adicionalmente podem produzir citotoxinas e enterotoxinas. A resposta inflamatória induzida pelo patógeno invasor ou sua toxina leva à destruição tecidual de grau variado da mucosa e demais camadas da parede intestinal, com exsudação predominantemente neutrofílica aguda na lâmina própria na maioria dos casos (ACHESON & KEUSCH, 1988). Como resultado, o quadro clínico pode variar desde a condição de portador assintomático, passando por fase de diarreia aquosa com presença de leucócitos com ou sem febre, à famosa disenteria com passagem retal de muco e sangue e presença de tenesmo. Perfuração intestinal, desenvolvimento de megacólon tóxico e sepse podem mais raramente ocorrer como complicações (HORNICK, 1988; BUTLER, 1988; GUERRANT, 1988). As causas de diarreia inflamatória aguda de origem infecciosa são mostradas na tabela 1, a qual se encontra na página seguinte.

TABELA 1. Agentes Etiológicos Implicados em Diarréia Inflamatória Aguda

Bactérias

Shigella dysenteriae, flexneri, sonnei, boydii

Salmonella typhimurium, paratyphi, choleraesuis

Escherichia coli enteroinvasiva

Campylobacter jejuni

Vibrio parahaemolyticus

Yersinia enterocolitica

Clostridium difficile

Spirillum sp

Neisseria gonorrhoeae

Treponema pallidum

Protozoários

Entamoeba histolytica

Balantidium coli

Helmintos

Trichinella spiralis

Trichuris trichiura

Strongyloides stercoralis

Capillaria philippinensis

Schistosoma mansoni

A shigelose é uma colite infecciosa aguda causada por um dos membros do gênero *Shigella*. O espectro clínico da doença pode manifestar-se como estado de portador transitório assintomático, diarréia leve aquosa auto-limitada associada à febre

ou franca disenteria. Convulsões podem ocorrer em crianças com febre elevada. A forma disentérica severa é mais comumente causada por *S. dysenteriae* tipo I e *S. flexneri*, estando estas espécies também associadas a maior índice de complicações extra-intestinais como bacteremia em crianças desnutridas menores de 1 ano de idade. O uso de antibióticos está indicado em formas disentéricas da doença ou com presença de sangue, pois reduz a duração da doença e pode diminuir a duração do estado de portador (KEUSCH, 1991b). O padrão de resistência da região onde se encontra o paciente é de grande relevância. Há áreas geográficas onde já se desenvolveu resistência à ampicilina e ao sulfametoxazol-trimetoprim comumente utilizadas em países desenvolvidos. Há resistência inclusive ao ácido nalidíxico (BENNISH e col., 1992).

Infecções por organismos do gênero *Salmonella* incluem a febre tifóide, septicemias e gastroenterites. A febre tifóide é uma infecção sistêmica de fagócitos mononucleares causada por *S. typhi*, *S. paratyphi A* e *paratyphi B* e ocasionalmente *S. typhimurium*, caracterizando-se por uma doença de curso clínico prolongado que apresenta cefaléia, febre elevada e calafrios, porém doença leve e breve pode ocorrer. Complicações graves podem surgir. Há relatos de hepatite, meningite, nefrite, osteomielite e pneumonia por *Salmonella*. Diarréia leve com presença de neutrófilos e mononucleares pode ocorrer no início da febre tifóide (KEUSCH, 1991a).

Dentre outras formas de apresentação clínica, as salmoneloses não tifóides podem manifestar-se como diarréia aguda causada pelas espécies *S. choleraesuis* e *S. enteritidis*. A diarréia pode estar associada à febre baixa, náuseas, vômitos e dor abdominal, sendo frequentemente confundida com intoxicação alimentar na ausência de demonstração de microorganismos na cultura. Ocasionalmente pode conter sangue ou ser disentérica com muitos neutrófilos nas fezes. Como ocorre com a *S. typhi*, a patogênese da diarréia por *Salmonella* não tifóide é determinada por invasão da mucosa intestinal dependente de fatores de virulência do microorganismo e da

resistência do hospedeiro. Além da característica de patógeno invasor, há evidências de que toxinas termo-lábeis e termo-estáveis produzidas pela bactéria participam no processo patogenético. O tratamento da febre tifóide com cloranfenicol, amoxicilina ou sulfametoxazol-trimetoprim tem sido eficaz, respeitando-se a resistência da bactéria. Faz-se também o tratamento prolongado dos portadores crônicos. A diarreia provocada por *Salmonella* não tifóide não requer tratamento específico a menos que os pacientes sejam imunocomprometidos (KEUSCH, 1991a).

Campylobacter jejuni e *Campylobacter coli* são agentes etiológicos responsáveis por 5 a 10% das diarreias agudas de adulto em todo o mundo. Estes microorganismos provocam diarreia inflamatória que pode ser aquosa, apresentar-se com sangue ou ser disentérica. Infecções assintomáticas são mais frequentes em regiões tropicais. Febre e dor abdominal fazem parte do quadro clínico, o qual pode ter complicações graves como megacólon tóxico e hemorragia colônica. O *Campylobacter* é um patógeno invasor que provoca enterite exsudativa envolvendo íleo e cólon. Pode haver presença de microabscessos de crypta. Polimorfonucleares fecais são mais detectados em pacientes de países desenvolvidos (78-93%) que em países em desenvolvimento (22-46%). O tratamento específico da diarreia por *Campylobacter* com antibióticos é controverso (GUERRANT, 1988).

A diarreia causada por *Yersinia enterocolitica* caracteriza-se por ser semisólida, aquosa ou com sangue, sendo precedida de febre e dor abdominal. Esta última é marcante, podendo ser falsamente atribuída à apendicite. A *Y. enterocolitica* invade a mucosa do intestino delgado, particularmente a ileal, elicitando uma resposta inflamatória aguda que leva à ulceração mucosa e aparecimento de leucócitos nas fezes. O cólon é menos frequentemente afetado, porém têm sido descritas úlceras aftosas e colite hemorrágica. A doença é auto-limitada e não requer tratamento específico. É importante lembrar esta causa de diarreia com severa dor abdominal para evitar cirurgias desnecessárias por falsa apendicite (UTLER, 1988).

A *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI) é agente causal de diarreia que é indistinguível daquela causada por *Shigella sp.*, embora ocorra mais raramente. Por mecanismo invasor das células mucosas do cólon, a ECEI causa disenteria com muco e sangue nas fezes, acompanhada de febre, dor abdominal e sinais de toxicidade sistêmica. Geralmente o diagnóstico é de exclusão na prática clínica, pois o teste Sereny ou o uso de sondas de DNA é normalmente inviável na maioria dos laboratórios. Nenhuma terapêutica específica é requerida (WANKE e col., 1987).

Diarreia causada por *Vibrio parahaemolyticus* tem incidência mais restrita ao Japão, onde é causa de 1/4 de todas as diarreias de origem alimentar, e partes costeiras de zonas temperadas. Após a ingestão de mariscos crus ou mal cozidos (6 a 48h), o paciente desenvolve diarreia sem grandes perdas de fluidos, com dor abdominal moderada. Podem ocorrer vômitos e febre. As fezes geralmente apresentam numerosos polimorfonucleares e podem conter sangue macroscopicamente. A bactéria produz uma toxina que promove acúmulo de fluido intestinal, porém é incerta a sua participação na fisiopatologia da doença a qual mostra lesão mucosa do íleo distal e cólon (CARPENTER, 1991).

A amebíase, uma infecção do intestino grosso produzida pela *Entamoeba histolytica*, é mais frequentemente encontrada em portadores assintomáticos. A diarreia induzida na forma de doença intestinal crônica é leve, porém a amebíase pode apresentar-se na forma de disenteria fulminante. A invasão da *E. histolytica* como mecanismo patogênico correlaciona-se com sua capacidade fagocítica, produção de colagenase e de uma proteína citotóxica e indução de lesão tecidual que segue ao contato direto com células do hospedeiro. A lise local de neutrófilos pelos trofozoítas contribuem para a histólise. O tratamento específico deve ser realizado após o diagnóstico da doença intestinal com metronidazol (droga de escolha), tinidazol ou outro amebicida (PLORDE, 1991).

A balantidíase, o maior dos protozoários humanos, afeta o intestino grosso causando um processo inflamatório agudo. Clinicamente manifesta-se de forma similar à amebíase intestinal. Seu tratamento é realizado com tetraciclinas ou metronidazol (PLORDE, 1991).

Trichinella spiralis, *Trichuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis*, *Capillaria philippinensis* e *Schistosoma* (particularmente o *S. mansoni*) são helmintos capazes de determinar diarreia. Durante sua fase invasiva, na qual os vermes adultos, seus ovos ou larvas estabelecem íntimo contato com a mucosa intestinal do hospedeiro, há desencadeamento de forte reação inflamatória local que promove alterações estruturais e funcionais (GENTA, 1993).

A pesquisa de leucócitos com coloração pelo azul de metileno não é um procedimento novo. Foi inicialmente descrita por Willmore e Shearman em 1918. Idealizado para ser um exame rápido e prático, a pesquisa de leucócitos não tem tido grande evidência na prática médica, dado o pequeno número de publicações na literatura médica que possa ampliar a experiência clínica de utilização do método. O seu uso destina-se à detecção de diarreias inflamatórias agudas, patologias que apresentam variável quantidade de polimorfonucleares e em menor quantidade mononucleares a depender da etiologia. Em associação com o quadro clínico do paciente, a presença de leucócitos em fezes diarreicas fornece um bom indicador para o tratamento antibiótico específico presuntivo do agente etiológico quando houver indicação. É um bom teste de triagem de quais pacientes terão fezes enviadas para a cultura, a qual é um procedimento mais oneroso e mais demorado (HARRIS e col., 1972; ALVARADO, 1983).

A sensibilidade da pesquisa de leucócitos nas fezes coradas pelo azul de metileno é variável desde um percentual de 66% a 95% em shigelose experimental e naturalmente adquirida. Também é um bom método para detecção de inflamação

intestinal determinada por outros patógenos invasivos. Frequentemente é mais sensível que a cultura de patógenos entéricos (KORZENIOWSKI e col., 1979; JINDAL & ARORA, 1991).

Um outro método de detecção de diarreia inflamatória está sendo investigado por Guerrant e colaboradores (GUERRANT e col., 1992). Trata-se da determinação da quantidade da proteína lactoferrina nas fezes através de um método semi-quantitativo de aglutinação pelo látex, o qual é de mais fácil realização que a pesquisa de leucócitos. Ao sofrerem degranulação na luz intestinal, os granulócitos neutrófilos liberam a lactoferrina, a qual fica livre para reagir com as partículas de látex sensibilizadas pelo anticorpo anti-lactoferrina. A sensibilidade do método em demonstrar a presença de inflamação em diarreia por *Shigella sp.* e *C. difficile* foi 96 e 95%, respectivamente. A estabilidade da lactoferrina é significativamente maior que a meia vida dos neutrófilos quando preservados a 4°C ou quando recuperados de swabs embebidos com polimorfonucleares. Apesar das vantagens deste novo método de aglutinação pelo látex para detecção de lactoferrina fecal como marcador de diarreia inflamatória aguda, estudos com maior número de amostras de diarreia devem ser realizados para confirmar a aplicação clínica citada.

Doença entérica por *Clostridium difficile*

Desde que foi originalmente reconhecido como patógeno entérico em 1977 (BARTLETT, 1977), o *Clostridium difficile* tem sido objeto de numerosos estudos laboratoriais e clínicos (MULLIGAN e col., 1980; BOWMAN & RILEY, 1988; JOHNSON e col., 1989; TABAQCHALI, 1990; GRYBOSKI e col., 1991). Atualmente é o patógeno intestinal mais importante como causa de diarreia nosocomial nos países desenvolvidos pela sua prevalência e severidade da doença que causa, a diarreia e a colite associada a antibiótico (FEKETY e col., 1981; MCKAY e col., 1989;

ALBERTI-FLOR e col.,1989). A maioria dos pacientes tem história de exposição a antibióticos e/ou quimioterápicos nas últimas 6 a 8 semanas anteriores ao seu desencadeamento (ZIMMERMAN, 1991; KAMTHAN, 1992; CARMOLINGA e col., 1991). Todavia, há relatos de que possa ocorrer sem essa exposição (BARTLETT, 1992). O *C. difficile* está implicado em 15 a 25% de todos os casos de diarreia associada a antibióticos, em 50 a 70% dos casos de colite inespecífica e em aproximadamente 100% dos casos de pacientes com colite pseudomembranosa, de acordo com vários relatos de estudos endoscópicos (BARTLETT,1990). Como toda bactéria patogênica para o intestino, o *C. difficile* causa uma doença de largo espectro clínico, o qual varia desde o estado de portador assintomático até à colite pseudomembranosa. É bem conhecido que 3% dos adultos e 5 a 70% dos recém-nascidos saudáveis albergam o *C. difficile* em sua flora intestinal. O paciente com diarreia por *C. difficile* pode apresentar até 20 ou mais evacuações aquosas por dia, podendo ser acompanhada de dor abdominal em cólica, febre e leucocitose. Uma minoria dos casos complica-se com megacólon tóxico, hiperpirexia, reação leucemóide, hipoalbuminemia e diarreia crônica (BARTLETT, 1992).

A patogênese da diarreia causada por *C. difficile* tem sido amplamente pesquisada nos últimos dez anos, todavia muitos aspectos ainda permanecem por serem elucidados. A flora normal do trato gastrointestinal é a primeira barreira para o estabelecimento de colonização intestinal pelo *C. difficile*, levando alguns indivíduos a serem portadores assintomáticos do patógeno potencial (BORRIELLO, 1992). O uso de antibióticos ou quimioterápicos desregula qualitativa e quantitativamente a flora intestinal de maneira a permitir a quebra da resistência à colonização pelo *C. difficile* e seu crescimento subsequente (VAN DER WAAIJ,1989). A capacidade de produzir doença, entretanto, depende de potenciais fatores de virulência, quais sejam, aderência à mucosa, expressão de fimbria, produção de cápsula, secreção de enzimas degradativas teciduais e produção de toxinas pelo *C. difficile* (BORRIELO, 1990; SEDDON e col., 1990; GONZÁLEZ-VALENCIA e col.,1991).

Duas toxinas denominadas A e B são produzidas pelo *C. difficile* (TORRES e col., 1990; ROLFE, 1991). O modo de ação biológica dessas toxinas ainda é imperfeitamente compreendido, não obstante muitas publicações confirmem seu papel fundamental na patogênese da diarreia associada a antibiótico (FIORENTINI e col., 1989; POTHOUKAKIS e col., 1991; BETTE e col., 1991; BALDACINI e col., 1992). Fato notável é o de que cepas não toxigênicas não produzem diarreia. A toxina A (SAUERBORN & von EICHEL-STREIBER, 1990), uma enterotoxina, exerce maiores efeitos sobre o íleo de coelho onde promove secreção de fluido sanguinolento rico em proteínas e destruição das porções basais das células epiteliais absorptivas (LIMA e col., 1989). Menor susceptibilidade tem o cólon, visto que nesta região acumula-se fluido pobre em proteínas, além de menor penetração tecidual da enterotoxina. Pensa-se que a toxina A causa a maioria dos sintomas, pois promove grande destruição tecidual e perda de fluidos (BORRIELLO e col., 1990).

A característica patológica da doença causada pelo *C. difficile* é o desenvolvimento progressivo de colite aguda que pode ser inespecífica ou pseudomembranosa. A pseudomembrana consiste de fibrina, muco, células epiteliais necróticas e leucócitos aderentes aos tecidos inflamados subjacentes ao cólon, sendo mais proeminente no reto sigmoido e de aparecimento raro no íleo (FEKETY, 1990).

A associação de diarreia inexplicada pela ausência de outros patógenos entéricos ao uso de antibiótico é altamente sugestivo de se ter como agente causal o *C. difficile*. O teste laboratorial mais sensível é o ensaio em cultura de células para detecção do efeito citopático da toxina B. Embora a toxina A também seja citopática e possa provocar alterações nas células em cultura, seu efeito é mil vezes menor que o da toxina B (BARTLETT, 1990). Alternativamente, existem testes imuno-enzimáticos para detecção de toxinas A ou B e mais recentemente as duas toxinas conjuntamente, porém são menos sensíveis e específicos que o ensaio de cultura de células (DE BARBEYRAC e col., 1989). Uma vez feito o diagnóstico, o tratamento da diarreia ou

colite associada a antibióticos baseia-se na reposição hidro-eletrolítica, descontinuação do uso do antibiótico implicado quando possível ou substituição deste por outro menos provável de causar a doença. O tratamento específico com vancomicina ou metronidazol está indicado quando o antibiótico implicado no desencadeamento da doença não pode ser descontinuado, em caso de pacientes severamente doentes ou com diarreia crônica apesar da descontinuidade do antibiótico indutor (BARTLETT, 1992). A teicoplanina oral mostrou-se também eficaz no tratamento da diarreia associada a antibiótico, porém seu uso necessita de mais ensaios clínicos para padronização da dose diária (DE LALLA e col., 1992).

2- OBJETIVOS

1- Verificar se a lactoferrina é um marcador de inflamação intestinal aguda em diarreia infecciosa.

2- Determinar o ponto de corte ("cutoff") dos resultados da quantidade de lactoferrina fecal medida pelo teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina em amostras de diarreia infecciosa e controles.

3- MATERIAL E MÉTODO

Teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina

Materiais:

- Partículas de látex (Bacto-Latex 0.81) do laboratório Difco
- Tampão glicina preparado com 7.3g de glicina, 10g de NaCl, 1 litro de água destilada, com ajuste de pH para 8.2 - 8.3
- Anticorpo purificado anti-lactoferrina (Sigma L3262), policlonal, de coelho (do tipo IgG)
- Azida sódica
- Albumina bovina sérica
- Solução de proteína tamponada a 0.1% (diluyente padrão)

Preparação dos reagentes (adsorção do anticorpo anti-lactoferrina às partículas de látex)

Reagente 1. Inicialmente 5ml de partículas de látex ($0.8\mu\text{m}$) eram centrifugadas por 30 minutos a 3000 rpm, com posterior aspiração do sobrenadante e adição de 10ml de tampão glicina. Após agitação em vortex, nova centrifugação era feita por 30 minutos a 3000 rpm. Depois da aspiração do sobrenadante, as partículas eram ressuspensas em 10ml de tampão glicina. Seguiu-se a adição de 0.7 ml do anticorpo anti-lactoferrina (L3262), agitação em vortex e incubação a 37°C por 45 minutos, após os quais centrifugava-se as partículas de látex adsorvidas com o anticorpo a 3000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante com excesso de anticorpo era aspirado e as partículas de látex eram ressuspensas com 10ml de tampão glicina, adicionando-se 0.01g de azida e 0.1g de albumina bovina sérica. A obtenção de partículas de látex adsorvidas com

IgG não imune (reagente 2) seguia o mesmo procedimento. Os reagentes eram conservados a 4°C.

Teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina (Ensaio)

Em lâminas de vidro fino e transparente, 15µl da amostra teste diluída eram colocados em cada um dos 2 círculos de 2.1cm de diâmetro da lâmina (área de reação). Imediatamente adicionava-se e misturava-se 15µl do reagente 1 ao círculo da esquerda e 15µl do reagente 2 ao círculo da direita, promovendo rotação manual da lâmina durante 3 minutos, ao fim dos quais era feita a leitura. O diâmetro da área de reação foi determinado como a área de melhor visibilidade em que não ocorresse auto-aglutinação das partículas de látex com o diluente padrão. Resultado positivo ocorria se houvesse aglutinação no círculo da esquerda, e negativo, se persistisse a aparência leitosa, ou ausência de aglutinação. O controle negativo (círculo da direita) deveria sempre estar com aparência leitosa, sem aglutinação, caso contrário, a reação com a amostra não poderia ser interpretada. A intensidade da reação de aglutinação e preparo das diluições serão descritas posteriormente. A reação de quantidades equivalentes do reagente 1 com o diluente protéico padrão não promovia aglutinação. A visualização da leitura em lâmina de vidro era de boa qualidade na existência de boa iluminação. Alternativamente, o teste poderia ser feito em cartões de fundo de reação negro para contrastar com a cor branca dos reagentes. A desvantagem econômica era a de que se utilizava maior quantidade de cada reagente (50µl) para a mesma quantidade da amostra.

Determinação da sensibilidade do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina

Inicialmente foi avaliada a sensibilidade das partículas de látex em detectar o antígeno lactoferrina purificado de leite humano. Duas formas de lactoferrina foram testadas: lactoferrina L-0520, não saturada com íons de ferro, e lactoferrina L-3770,

saturada com íons de ferro. A partir da concentração 5 mg/ml de lactoferrina, foram realizadas diluições seriadas da proteína em PBS com obtenção das concentrações 5000, 2500, 250, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.4 e 0.1 $\mu\text{g/ml}$. O teste de aglutinação utilizando partículas de látex sensibilizadas de forma saturada com anticorpo anti-lactoferrina foi realizado para cada concentração de lactoferrina L-0520 e L-3770, em diferentes temperaturas (4 e 37°C). O experimento foi realizado em quadruplicata para cada concentração (Figura 1).

Determinação da concentração de lactoferrina fecal em amostras controles pelo teste de aglutinação pelo látex

Fezes sólidas de controles constituíram um problema na determinação das concentrações de lactoferrina por método diluicional. Seu peso não correspondia à medida volumétrica correlata como acontece com a água, pois tem menor densidade. Cem microgramas de fezes sólidas não ocupam exatamente o volume de 100 microlitros. Para saber se a variação de volume ocupado pelas fezes seria estatisticamente significativa, realizou-se o experimento descrito a seguir.

Onze amostras de 1 grama de fezes de consistência normal (sólidas) de indivíduos sadios foram pesadas em tubos Falcon de 15ml graduados, em balança analítica, após sofrerem congelamento a -40°C e descongelamento. Foram adicionados 4ml de água destilada a cada tubo, seguindo-se a homogeneização do conteúdo fecal através de leve agitação ao vortex. A sedimentação do material fecal foi realizada por centrifugação a 3000 rpm, por 30 minutos, resultando em um volume compactado no fundo do tubo com sobrenadante líquido. Com uma pipeta de 1ml foi adicionado, gota a gota, um volume de água variável (y_n) para cada amostra até completar 6ml, observando rigorosamente o nível do menisco formado pela água. Esse volume foi somado aos 4ml previamente adicionados, resultando em um volume total variável

(x_n) para cada amostra. A diferença volumétrica de x_n para 6ml correspondia ao volume ocupado pelas amostras de fezes (v_n), o qual sempre se mostrou igual ou superior a 1ml. Os resultados são demonstrados na Tabela 2. Comparando-se os volumes v_n (Grupo I) com o volume constante de 1ml ocupado pela água (Grupo II), observou-se que a variação de v_n em relação a 1ml é estatisticamente significativa ao se aplicar um teste t para uma extremidade ("one tail") considerando $\alpha=0.05$.

TABELA 2. Distribuição dos valores dos volumes de água adicionados a 1g de fezes (x_n) e o valor do volume complementar para 6ml (v_n).

x_n (ml)	Grupo I v_n (ml)	Grupo II (ml)
4.90	1.10	1.00
4.92	1.08	1.00
4.94	1.06	1.00
4.95	1.05	1.00
5.00	1.00	1.00
4.99	1.01	1.00
4.94	1.06	1.00
4.90	1.10	1.00
4.92	1.08	1.00
5.00	1.00	1.00
4.94	1.06	1.00
$\bar{y} = 1.0545$		

O segundo problema se resumia em encontrar um peso médio para fezes sólidas que ocupasse o volume de 1ml, sabendo que o volume médio (\bar{y}) ocupado por 1g das 11 diferentes amostras de fezes foi de 1.0545ml. Esse peso médio foi calculado por regra de três simples dado que o peso médio pode ser considerado como massa média em um ambiente de gravidade não variável. Assim, o valor do peso médio foi de 0.948g (aproximadamente 0.95g). Utilizando um peso menor, 0.095g de fezes ocuparia um volume de 100 μ l, podendo-se, então, realizar-se as diluições com precisão.

Diluições seriadas, obedecendo uma progressão geométrica de razão 2, foram utilizadas no estabelecimento de um espectro quantitativo para expressar os resultados do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina. Com a finalidade de determinação da concentração de lactoferrina fecal em amostras controles, utilizou-se a diluição inicial 1/6.25, conseguida ao se pesar 0.095g de cada amostra e diluí-la em 525 μ l do diluente padronizado para o teste. Seguiu-se a homogeneização em vortex por 1 minuto, com ulterior centrifugação durante 30 minutos (3000 rpm). Com esse procedimento evitava-se que o debris fecal interferisse na leitura da aglutinação. Logo após, o sobrenadante era aspirado para realização do teste de aglutinação pelo látex no próprio sobrenadante (diluição de 1/6.25) e em suas diluições seriadas. O resultado da leitura era expresso como o maior título no qual ocorria aglutinação à discriminação ocular (+1). Considerava-se como resultado negativo a ausência de aglutinação na menor diluição da série (1/6.25 em controles). Fenômeno pós-zona (excesso de antígeno) era evitado ao se fazer uma diluição 8 vezes maior que a inicial quando esta se apresentava negativa. A caracterização da leitura do teste é definida na tabela 3 (CALICH & VAZ, 1989).

Determinação da concentração de lactoferrina fecal em amostras de diarreia utilizando o teste de aglutinação pelo látex

Em amostras diarréicas, a diluição inicial para realização do teste era de 1/50, baseando-se em nossos estudos preliminares com o mesmo teste (GUERRANT e col., 1992). Quando a amostra era pipetável (líquida ou semilíquida), 50 microlitros eram diluídos em 2.45ml do diluente padronizado. Fezes pastosas, não pipetáveis, eram processadas segundo o mesmo método descrito para as amostras controles. A leitura do teste de aglutinação pelo látex para amostras diarréicas segue o mesmo procedimento descrito para as amostras controles.

Determinação da concentração de lactoferrina fecal em amostras de diarreia infantil

A concentração de lactoferrina fecal expressa em títulos foi determinada em 191 amostras de um estudo caso-controle preservadas sob congelação a -40°C por no máximo 5 anos. Esse estudo foi realizado no período de agosto de 1988 a outubro de 1991, no Hospital Infantil Albert Sabin em Fortaleza, estado do Ceará, tendo por objetivo a caracterização clínica e laboratorial das diarreias infantis. Participaram do estudo crianças com idade de até 5 anos, atendidas em consultórios por pediatras daquele hospital público. A característica predominante dos pacientes ali atendidos é a de que possuem baixo nível sócio-econômico.

O critério de definição de diarreia estabelecido para o estudo foi o de 3 ou mais evacuações líquidas em 24 horas (BOWIE e col., 1992), enquanto os controles deveriam estar sem diarreia há pelo menos 15 dias. Considerou-se diarreia aguda um episódio com duração inferior a 14 dias e diarreia persistente, um episódio com duração de 14 ou mais dias. As crianças controles tinham como motivo de visita

ambulatorial acompanhamento do crescimento. Foram excluídos os controles que apresentavam parasitoses e os que tinham patógenos entéricos isolados por cultura.

Após serem coletadas, as fezes eram enviadas dos consultórios dentro de um período de no máximo 4 horas para o laboratório da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará. As 191 amostras fecais examinadas pelo teste de aglutinação pelo látex em lâminas de vidro foram previamente examinadas à época da colheita das amostras, a fresco, para visualização de parasitas e leucócitos, bem como para isolamento de patógenos entéricos pelos métodos citados a seguir. Esses exames foram realizados por três farmacêutico-bioquímicas daquele laboratório.

A coloração pelo azul de metileno a 1% foi utilizada para determinar a presença de leucócitos. A visualização de leucócitos íntegros, apenas o núcleo íntegro ou na forma de piócitos era anotada em três categorias: 0, 1 a 5 e mais de 5 leucócitos por campo, avaliando-se 10 campos em maior aumento (40X). A pesquisa de sangue oculto foi feita pelo teste Hemocult. A pesquisa de helmintos e protozoários intestinais (exceto *Cryptosporidium spp.*) foi feita por método direto corado pela solução de lugol preparada a partir de cristais de iodo e iodeto de potássio.

Procedeu-se o isolamento bacteriológico através de semeadura das fezes em meio MacConkey para enterobacteriácias e bacilos gram-negativos relacionados, XLD (xilose-lisina-desoxicolato) para *Shigella* e *Salmonella*, ASA (ágar-sangue-ampicilina) para *Aeromonas*, Campy-BAP para *C. jejuni* e em caldo GN para posterior semeadura em MacConkey e XLD. Inoculação em PBS com preservação a 4°C por três semanas e posterior semeadura em MacConkey foi o método utilizado para isolamento de *Y. enterocolitica*. A leitura em placas de MacConkey classificava as colônias em fermentadoras de lactose (LF) e não fermentadoras de lactose (NLF). Se estas últimas fossem oxidase negativas, prosseguiam para serem testadas pelo sistema API. Após serem classificadas como *Shigella*, estas eram sorotipadas para confirmação. As

colônias LF inoculadas em glicerol com TSB seguiram para um laboratório de pesquisa da Universidade de Virginia (EUA), onde as *E. coli* foram classificadas por padrões de aderência às células HEp-2. *E. coli* que exibisse padrão de aderência localizado foi classificada como enteropatogênica. A caracterização da presença de toxina termo-lábil e termo-estável de *E. coli* nas amostras fecais foi feita usando sondas de oligonucleotídeos neste último laboratório.

Amostras fecais descongeladas foram examinadas para detecção de antígenos de Rotavirus por um teste ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay ou ensaio imuno-enzimático) de leitura visual (Rotaclone, Cambridge BioScience). O diagnóstico da presença de antígenos de Adenovirus também foi realizado por ELISA. A coloração álcool-ácido (Ziehl-Nielsen modificado) foi o método usado para determinação da presença de *Cryptosporidium spp.* nas amostras fecais fixadas.

Adicionalmente foram coletadas e congeladas amostras fecais de 49 crianças controles saudáveis, assintomáticas, de uma creche-escola de médio a elevado nível sócio-econômico em Fortaleza, com idades inferiores a 5 anos. A mesma rotina laboratorial anterior à congelação das amostras, previamente descrita, foi realizada para essas amostras, exceto coprocultura e ELISA para vírus. A pesquisa de leucócitos, sangue oculto e patógenos entéricos detectável pelos métodos citados deveria ser negativa em todos os controles como critério de inclusão no estudo de detecção de lactoferrina fecal em crianças.

Determinação da concentração de lactoferrina fecal em amostras de diarreia em adultos

Trezentas e quarenta e sete amostras fecais de diarreia nosocomial foram analisadas quanto à presença de lactoferrina e toxinas do *C. difficile* em estudo

realizado no laboratório de pesquisa de diarreia infecciosa da Divisão de Medicina Geográfica do Hospital da Universidade de Virginia (EUA) no período de julho a outubro de 1991. Adicionalmente, foram utilizados como controles 65 amostras fecais de adultos saudáveis, sem doença entérica (34 americanos e 31 brasileiros).

Dados sobre a presença de patógenos e parasitas entéricos, bem como de leucócitos, nas amostras analisadas foram cedidas pelo laboratório de análises clínicas de rotina daquele hospital. A solicitação da realização desses exames era feita conforme o critério do médico assistente dos pacientes. Os métodos para determinação de patógenos entéricos são similares aos descritos no item anterior, porém a pesquisa de leucócitos fecais diferia no critério de leitura. Apenas os leucócitos íntegros eram contados em campo de maior aumento, fazendo inclusive a contagem diferencial entre leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, a fresco e/ou fixadas com metanol.

Chegando as amostras fecais ao laboratório de pesquisa, estas eram descongeladas para realização simultânea do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina e detecção de toxinas do *C. difficile* por ensaio de células CHO (fibroblastos de ovário de hamster chinês) e por ELISA para toxina A. O teste de aglutinação pelo látex foi realizado em cartões conforme descrito anteriormente. O ELISA para detecção de toxina A, produzido pelo laboratório Techlab, utilizava um anticorpo monoclonal conjugado à peroxidase. O teste era positivo se o resultado em densidade óptica fosse maior que 0.200 na leitura espectrofotométrica em 450 nm.

O ensaio de células CHO foi realizado conforme o seguinte procedimento: (1) as amostras fecais eram diluídas 1/10 em PBS e centrifugadas por 20 minutos a 3000 rpm; (2) os sobrenadantes eram filtrados em filtros de 0.22 μ m, com posterior diluição para 1/100, 1/1000, 1/10000 e 1/100000; (3) os filtrados fecais eram incubados com igual volume de anti-soro para *C. difficile* por 30 minutos a 22°C (controle); (4) os filtrados e as suspensões filtrado-antisoro eram adicionadas a uma placa com células

CHO com 92 divisões. As placas eram incubadas por 12 horas em uma estufa de gás carbônico, a 5%. (5) o resultado era considerado positivo se 50% ou mais das células sofressem arredondamento em uma diluição específica e na sua divisão complementar, como resultado da ação da toxina B principalmente.

Revisão da história clínica de parte dos pacientes, cujas amostras foram analisadas, foi feita através de pesquisa retrospectiva em prontuários. A menor idade registrada para os pacientes foi de 16 anos. Utilizou-se como critério de diarreia inflamatória aguda a presença de leucócitos polimorfonucleares nas fezes examinadas pela coloração azul de metileno. O critério de diarreia associada a antibiótico estabelecido para a análise dos dados clínicos dos pacientes foi categorizado em:

- Uso de antibióticos ou quimioterápicos nos últimos 2 meses;
- Três ou mais episódios de evacuações de fezes amolecidas por 2 ou mais dias consecutivos;
- Ausência de outro patógeno intestinal ou outra causa medicamentosa;
- Resposta ao tratamento específico para diarreia associada ao *C. difficile* (metronidazol oral ou IV, vancomicina ou colestiramina oral ou parada do uso do antibiótico implicado);
- Evidência de produção de toxina A ou B detectada na amostra do episódio diarreico ou de dias próximos ao estabelecimento da diarreia;
- O diagnóstico de colite associada a antibiótico foi realizado por endoscopia (retossigmoidoscopia ou colonoscopia) em correlação com os achados clínico-laboratoriais citados anteriormente.

Análise Estatística

A determinação do ponto de corte ("cutoff") do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina foi realizada através da comparação dos resultados do teste em amostras controles e em amostras de diarréia com presença ou ausência de leucócitos. O melhor ponto de corte seria aquele para o qual a soma de falsos negativos e falsos positivos fosse a menor possível, quando calculada para as diferentes linhas de corte (FEINSTEIN, 1985). Para o estabelecimento do ponto de corte do teste de detecção de lactoferrina como marcador de diarréia inflamatória em crianças, utilizou-se os resultados do teste em amostras fecais de crianças controles e com diarréia no estudo realizado na cidade de Fortaleza (Hospital Infantil Albert Sabin e creche-escola). Os resultados do teste em amostras fecais de pacientes do Hospital da Universidade de Virginia e em amostras fecais de adultos americanos e brasileiros foram usados no cálculo do ponto de corte do método para adultos. A classificação das amostras de diarréia como inflamatória aguda ou não inflamatória aguda foi estabelecido pela presença ou ausência de leucócitos polimorfonucleares nas fezes, respectivamente. Amostras controles não apresentavam leucócitos nas fezes.

A comparação da acurácia diagnóstica entre o teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina e a pesquisa de leucócitos nas fezes como método padrão ouro ("gold standard") foi avaliada pelo cálculo da sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo. Os resultados do teste em estudo também foram correlacionados com doenças causadas por agentes etiológicos sabidamente invasivos e não invasivos, responsáveis respectivamente por diarréia inflamatória e não inflamatória (ILSTRUP, 1990). Outros métodos estatísticos utilizados incluíram teste *t* para dados emparelhados e não emparelhados (SOARES e BARTMAN, 1983).

4- RESULTADOS

Determinação da sensibilidade do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina

Concentração crescente de lactoferrina foi capaz de induzir crescente intensidade de reação de aglutinação até 25 μ g/ml (Figura 1). As características da intensidade da aglutinação são mostradas na tabela 3 que se encontra na página seguinte. A menor concentração de lactoferrina detectada pelo teste foi de 1 μ g/ml. A pré-zona de excesso de anticorpo é evidenciada no intervalo de concentração de lactoferrina de 0.1 a 10 μ g/ml, a zona de equivalência de antígeno e anticorpo de 10 a 50 μ g/ml e a pós-zona de excesso de antígeno em concentrações superiores a 50 μ g/ml. Não houve diferença de intensidade de reação quando os reagentes aglutinaram a 4°C ou 37°C. Os resultados apresentados na figura 1 foram os mesmos para os quatro testes de cada concentração.

Determinação do ponto de corte do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina

O cálculo do ponto de corte foi realizado de forma a minimizar a soma de falsos positivos e falsos negativos como mostram as tabelas 4 e 5, nas páginas seguintes, para crianças e adultos, repectivamente. A menor soma de falsos positivos e falsos negativos está identificada com asterisco e o ponto de corte está representado pela linha divisória dessas tabelas. Foi feita a comparação dos resultados do teste em estudo expressos em títulos de amostras controles com os resultados das amostras de diarreia inflamatória e não inflamatória, tanto para adultos quanto para crianças.

TABELA 3. Caracterização da resposta do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina.

Intensidade de resposta	Caracteres discriminatórios da intensidade de aglutinação
negativa	nenhuma aglutinação visível
+1	aglutinação definida, fina, com fundo leitoso
+2	aglutinação definida, com formação de pequeno anel periférico no perímetro do círculo de leitura, fundo menos leitoso
+3	maior aglutinação de ocorrência imediata ao contato dos reagentes, fundo claro, maior anel periférico no perímetro de leitura.
+4	forte aglutinação de ocorrência imediata ao contato dos reagentes, rápida formação de grande anel periférico no círculo de leitura.

Observou-se que o ponto de corte para crianças foi estabelecido em 1/100 tanto para diarreia inflamatória quanto não inflamatória, ou seja, considera-se que os níveis de lactoferrina nas fezes estejam elevados acima da normalidade quando o título for maior ou igual a 1/200 (Figura 2). Convencionou-se chamar um resultado com título maior ou igual a 1/200 para crianças de lactoferrina positiva. Para adultos, o ponto de corte foi estabelecido em $<1/50$ (Tabela 5). Desta forma, os níveis de anormalidade da lactoferrina nas fezes em adultos com diarreia inflamatória ou não inflamatória foi considerado igual ou superior a 1/50. Convencionou-se chamar um

resultado com título maior ou igual a 1/50 de lactoferrina positiva (em adultos). Não existiu um ponto de corte entre os títulos de lactoferrina comparando-se os dois grupos, diarreia inflamatória e não inflamatória, quando calculado pelo mesmo método.

TABELA 4. Determinação do ponto de corte por comparação entre os resultados do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina em amostras controles (C), em diarreia inflamatória (DI) e não inflamatória (DNI) em crianças. O ponto de corte está representado pela linha divisória.

Título de lactoferrina	Número de amostras			Soma de falsos positivos e falsos negativos	
	C (n=72)	DI (n=101)	DNI (n=67)	DI	DNI
< 1/50	23	5	7	54	56
1/50	25	10	6	39	37
1/100	15	7	9	31*	31*
1/200	8	23	19	46	42
1/400	1	20	9	65	50
1/800	0	18	8	83	58
1/1600	0	9	4	92	62
1/3200	0	5	5	97	67
1/6400	0	4	0	101	67

TABELA 5. Determinação do ponto de corte por comparação entre os resultados do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina em amostras controles (C) e de diarreia inflamatória (DI) e não inflamatória (DNI) em adultos. O ponto de corte está representado pela linha divisória.

Título de lactoferrina	Número de amostras			Soma de falsos positivos e falsos negativos	
	C (n=65)	DI (n=48)	DNI (n=184)	DI	DNI
$< 1/50$	61	16	121	20*	125*
$1/50$	3	8	23	25	145
$1/100$	1	7	20	31	164
$1/200$	0	6	8	37	172
$1/400$	0	6	7	43	179
$1/800$	0	2	2	45	181
$1/1600$	0	1	3	46	184
$1/3200$	0	2	0	48	184

Resultados do teste de aglutinação pelo látex realizado no estudo caso-controle de diarreia infantil em Fortaleza

Cento e oitenta e uma amostras de fezes de 181 crianças (23 controles e 168 de diarreia) do estudo caso-controle de diarreia do Hospital Infantil Albert Sabin e 49 amostras de 49 crianças controles de uma creche-escola de Fortaleza foram examinadas quanto ao conteúdo de lactoferrina pelo teste de aglutinação pelo látex em estudo. Das 72 amostras controles, 63 apresentaram títulos $\leq 1/100$ e apenas 9, títulos $\geq 1/200$. As 168 amostras diarreicas foram classificadas como inflamatórias (101) ou

não inflamatórias (67), como está representado na tabela 4, conforme presença ou ausência de leucócitos.

A correlação dos resultados do teste para detecção de lactoferrina pode ser efetuada com os resultados da pesquisa de leucócitos nas fezes em todas as amostras diarreicas. A figura 2 mostra que das 67 amostras com ausência de leucócitos (diarréia não inflamatória), haveria correlação entre a ausência de leucócitos e títulos de normalidade da lactoferrina ($\leq 1/100$) em apenas 22 amostras (33%), considerando o ponto de corte calculado. Se títulos $\geq 1/200$ fossem considerados inflamatórios, haveria 27% (45/168) de falsos positivos. Na figura 3 estão representados os resultados dos títulos de lactoferrina das 101 amostras com presença de leucócitos, tomando como base o ponto de corte 1/100. Haveria correlação entre a presença de leucócitos com títulos de lactoferrina $\geq 1/200$ em 70% das 33 amostras com leucócitos 1 a 5 por campo (Figura 3a) e em 82% das 68 amostras com mais de 5 leucócitos por campo (Figura 3b), se esses títulos fossem considerados inflamatórios. Os falsos negativos do teste representariam 13% (22/168) das amostras diarreicas.

A sensibilidade do teste para detecção de lactoferrina foi significativamente maior que a sensibilidade da pesquisa de leucócitos ($p < 0.05$) ao se comparar os resultados desses testes nas 168 amostras de diarréia do estudo (Figura 4). Diferença significativa de sensibilidade não ocorreu quando as amostras diarreicas foram classificadas segundo a duração da diarréia em aguda ($n=79$) ou persistente ($n=65$), como mostram as figuras 5 e 6.

A distribuição dos títulos de lactoferrina de amostras de diarréia causada por um único agente etiológico está apresentada na figura 7. A lactoferrina foi positiva (títulos $\geq 1/200$) nas diarreias causadas por *Shigella sp.*, *E. coli* enteropatogênica (ECEP), *E. coli* enterotoxigênica (ECET), Rotavírus, *Cryptosporidium spp.* e *Giardia lamblia*. nas proporções respectivas de 88, 60, 60, 75, 68 e 100%. Nessas amostras

houve correlação com a presença de leucócitos em 100% (7/7), 67% (4/6), 67% (2/3), 73% (11/15), 80% (12/15) e 75% (3/4) dos casos de diarreia por *Shigella*, ECEP, ECET, Rotavirus, *Cryptosporidium spp.* e *Giardia*, respectivamente. A tabela 6 mostra a sensibilidade do teste anti-lactoferrina comparada à da pesquisa de leucócitos em amostras que tinham um único agente etiológico isolado, uma combinação deles ou em amostras em que não foi isolado patógeno entérico. Conforme demonstrado na figura 7 e tabela 6, não apenas as amostras de diarreias causadas por patógenos entéricos invasivos (*Shigella*) e não invasivos (*Cryptosporidium*, Rotavirus, ECEP, ECET, *Giardia*) apresentaram títulos elevados ($\geq 1/200$) de lactoferrina e pesquisa positiva para leucócitos, mas também as amostras sem etiologia definida (ausência de patógenos) foram positivas pelos dois testes.

TABELA 6. Distribuição dos resultados do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina e da pesquisa de leucócitos realizados em 168 amostras fecais de diarreia infantil.

Patógeno		Número de amostras	
		Positivas para lactoferrina	Positivas para leucócitos
<i>Shigella sp.</i>	8	7 (88%)	8 (100%)
<i>Cryptosporidium spp.</i>	22	15 (68%)	16 (73%)
Rotavirus	20	15 (75%)	13 (65%)
Adenovirus	2	2 (100%)	1 (50%)
ECEP	10	6 (60%)	6 (60%)
ECET	5	3 (60%)	3 (60%)
<i>Giardia</i>	4	4 (100%)	3 (75%)
Mais de um patógeno (3 amostras com <i>Shigella</i>)	10	8 (80%)	7 (70%)
Nenhum patógeno	87	64 (74%)	44 (51%)

Algumas prováveis variáveis merecem ser citadas nesse estudo. Apenas 24 crianças com diarreia e 2 controles do Hospital Infantil Albert Sabin estavam sendo amamentadas em aleitamento misto à época da colheita das fezes. As duas amostras controles apresentaram lactoferrina 1/50. Das 24 amostras diarreicas de crianças em aleitamento misto, 22 apresentaram lactoferrina $\geq 1/200$, 13 das quais se correlacionava com a presença de leucócitos.

A proporção de falsos negativos no estudo de detecção de lactoferrina fecal em crianças, considerando que títulos $\geq 1/200$ fossem inflamatórios, foi de 13% (22/168). Observou-se que em todas as 22 amostras com lactoferrina negativa ($\leq 1/100$) e presença de leucócitos foram isoladas uma ou mais colônias de bactérias lactofermentadoras, embora fosse variável o isolamento de bactérias não fermentadoras de lactose.

Resultados do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina realizado no estudo de diarreia em adultos no Hospital da Universidade de Virginia

Trezentas e quarenta e sete amostras de fezes diarreicas foram analisadas quanto à presença de toxinas do *C. difficile*, leucócitos, patógenos entéricos e lactoferrina. Noventa e três pacientes tiveram história clínica revisada para as características dos episódios diarreicos referentes a 165 amostras .

Segundo os critérios citados por McFarland, foi considerado haver diarreia associada a antibiótico em 79 episódios diarreicos e em 3 episódios de colite associada a antibiótico nesses pacientes. A lactoferrina positiva ($\geq 1/50$) contribuiu para fortalecer o diagnóstico desses 82 episódios de diarreia associada ao *C. difficile* em 50%. Em 3 desses episódios a alteração do nível de lactoferrina fecal precedeu o diagnóstico laboratorial de diarreia por *C. difficile*. Todos os pacientes com diagnóstico de colite

associada a antibiótico apresentaram títulos excessivamente elevados de lactoferrina nas 3 amostras fecais ($\geq 1/800$), enquanto os títulos de toxina B foram variáveis (1/10, 1/100, 1/1000). Em todas as 5 amostras fecais de um paciente com pancreatite aguda, a lactoferrina foi positiva ($\geq 1/100$), havendo correlação com a presença de leucócitos em apenas uma das amostras.

Procedeu-se à comparação dos resultados do conteúdo da lactoferrina fecal com os resultados quantitativos das toxinas A e B do *C. difficile* nas 347 amostras de fezes diarréicas. A correlação com a pesquisa de leucócitos só pode ser feita em um número menor de amostras.

Maior sensibilidade do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina (74%) foi observada em 34 amostras fecais com presença simultânea de toxinas A e B (Figura 8a). Sua sensibilidade foi significativamente maior ($p < 0.05$) que a pesquisa de leucócitos nas fezes (Figura 8b) nas amostras em que foram realizados ambos os testes. Menor sensibilidade do teste em estudo foi detectada em 107 amostras fecais positivas para toxina B (38%), em 19 amostras positivas para toxina A pelo ELISA (53%) e em 166 amostras negativas para toxinas A e B (38%), como mostram as figuras 9a, 10a e 11a. Comparando-se a sensibilidade do teste de aglutinação pelo látex com a pesquisa de leucócitos nas mesmas amostras, observou-se ser o primeiro teste mais sensível que o segundo ($p < 0.05$) em amostras positivas para toxina B e negativas pelo ELISA e em amostras sem toxina detectável pelos dois métodos (Figuras 9b e 11b). A figura 10b evidencia uma diferença não significativa de sensibilidade entre os dois métodos em amostras positivas para toxina A pelo ELISA.

Considerando apenas um dos métodos (ou ensaio CHO ou ELISA), observou-se que a sensibilidade do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina correlaciona-se melhor com a presença de toxina A em 60% das amostras (35/53) que com a presença da toxina B em 44% das amostras (88/200), como mostram as figuras 12a e

13a. A comparação da sensibilidade do teste de aglutinação pelo látex e a pesquisa de leucócitos revelou maior sensibilidade do primeiro em relação ao segundo ($p < 0.05$), conforme está demonstrado nas figuras 12b e 13b.

A figura 14 evidencia a correlação entre a sensibilidade do teste de aglutinação pelo látex e a presença de toxina B do *C. difficile* em diferentes títulos em 200 amostras. Observa-se crescente sensibilidade (40%, 58%, 92%) em amostras com títulos de toxina B progressivamente mais elevados (1/10, 1/100, 1/1000).

Avaliação da acurácia diagnóstica do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina

A sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo do teste realizado nas 168 amostras do estudo de diarréia infantil em Fortaleza foi de 0.74, 0.88 e 0.93, respectivamente. A figura 15, curva "Receiver Operator Characteristic", construída a partir do percentual de verdadeiros positivos ou sensibilidade (eixo dos y) e percentual de falsos positivos ou 1- especificidade (eixo dos x), mostra que o melhor ponto de corte do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina para crianças é o de 1/100.

A sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo do teste de aglutinação pelo látex foi de 0.43, 0.94 e 0.97, respectivamente, utilizando-se o ponto de corte estabelecido para os resultados do teste realizado em 347 amostras fecais de adultos com diarréia nosocomial no Hospital da Universidade de Virginia.

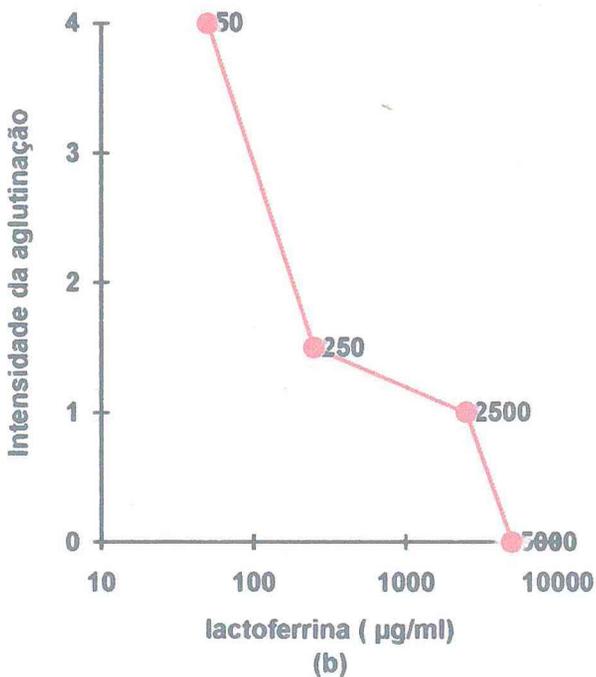
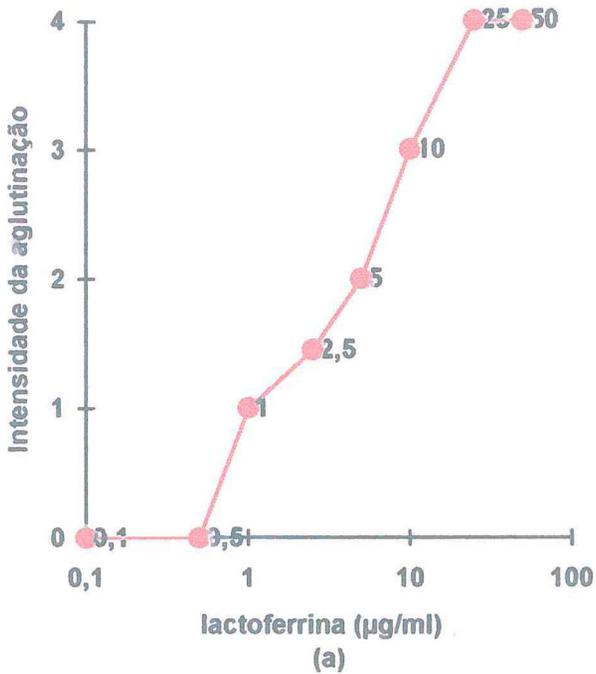


Figura 1. Determinação da sensibilidade do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina, utilizando dois tipos de lactoferrina (L-0520 e L-3770), para ambos os experimentos das figuras (a) e (b). Os resultados estão expressos em escala logarítmica (eixo dos x). (a) Zona de excesso de anticorpo e zona de equivalência. (b) Zona de excesso de antígeno. O intervalo de concentração de lactoferrina onde ocorre aglutinação visível varia de 1 a 2500 µg/ml.

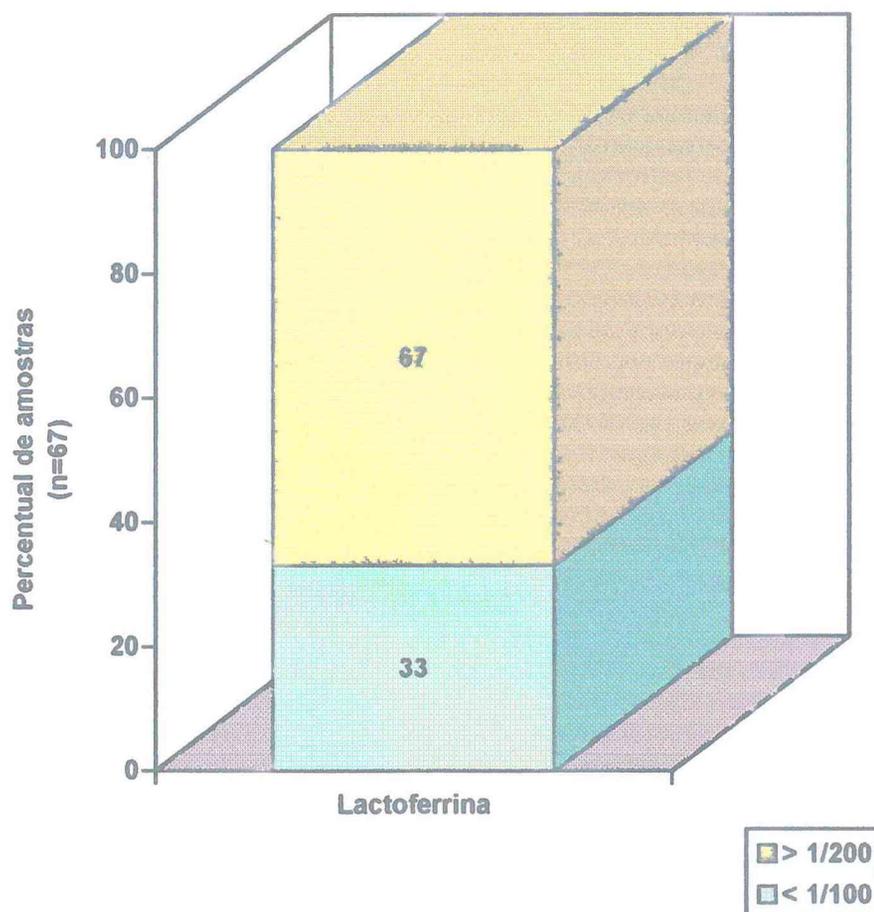


Figura 2. Distribuição dos resultados do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina (em título) realizado em 67 amostras fecais de diarreia infantil com pesquisa negativa para leucócitos.

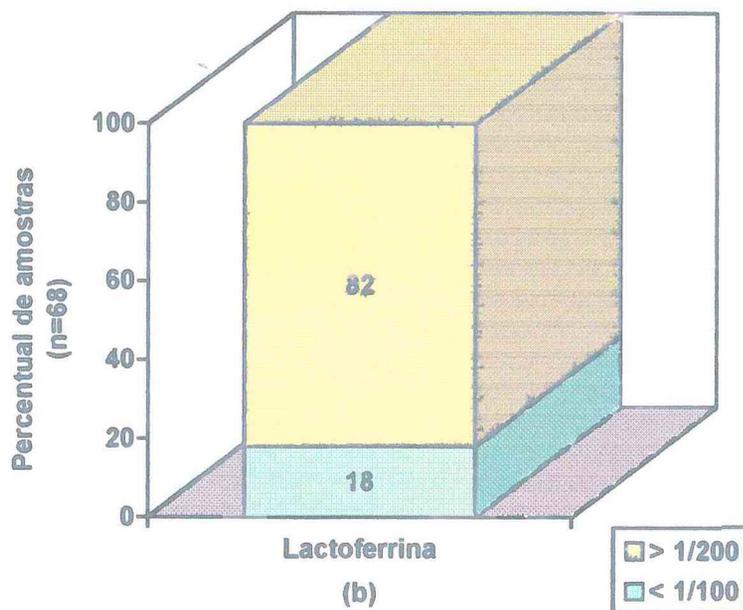
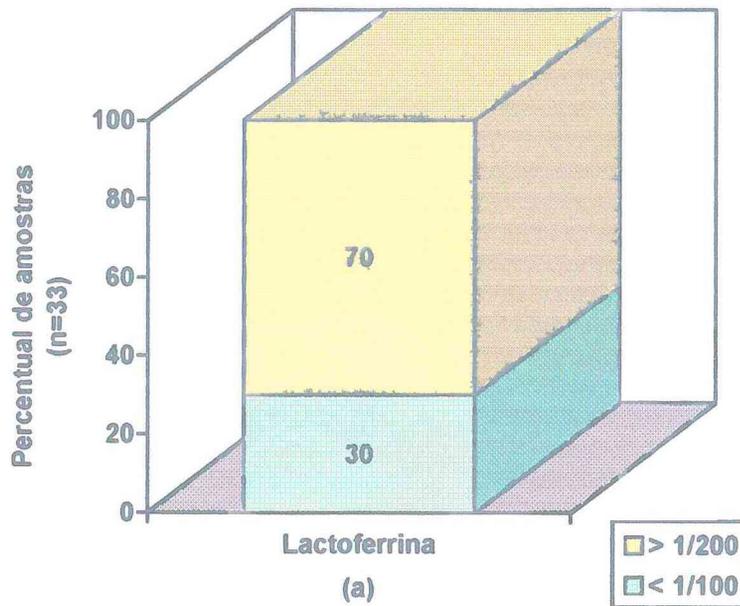


Figura 3. Distribuição dos resultados do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina (em título) realizado em 101 amostras fecais de diarreia infantil com pesquisa positiva para leucócitos. (a) Presença de 1 a 5 leucócitos por campo. (b) Presença de mais de 5 leucócitos por campo.

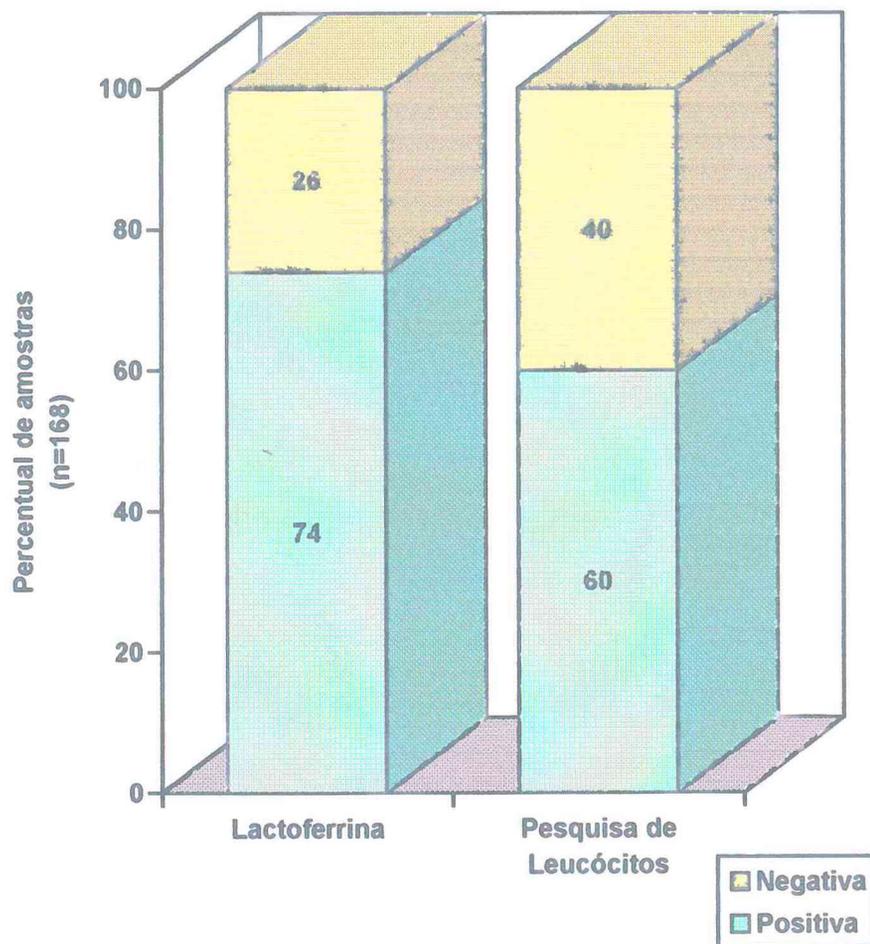


Figura 4. Comparação entre a sensibilidade do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina e a sensibilidade da pesquisa de leucócitos em 168 amostras fecais de diarreia infantil. ($p < 0.05$)

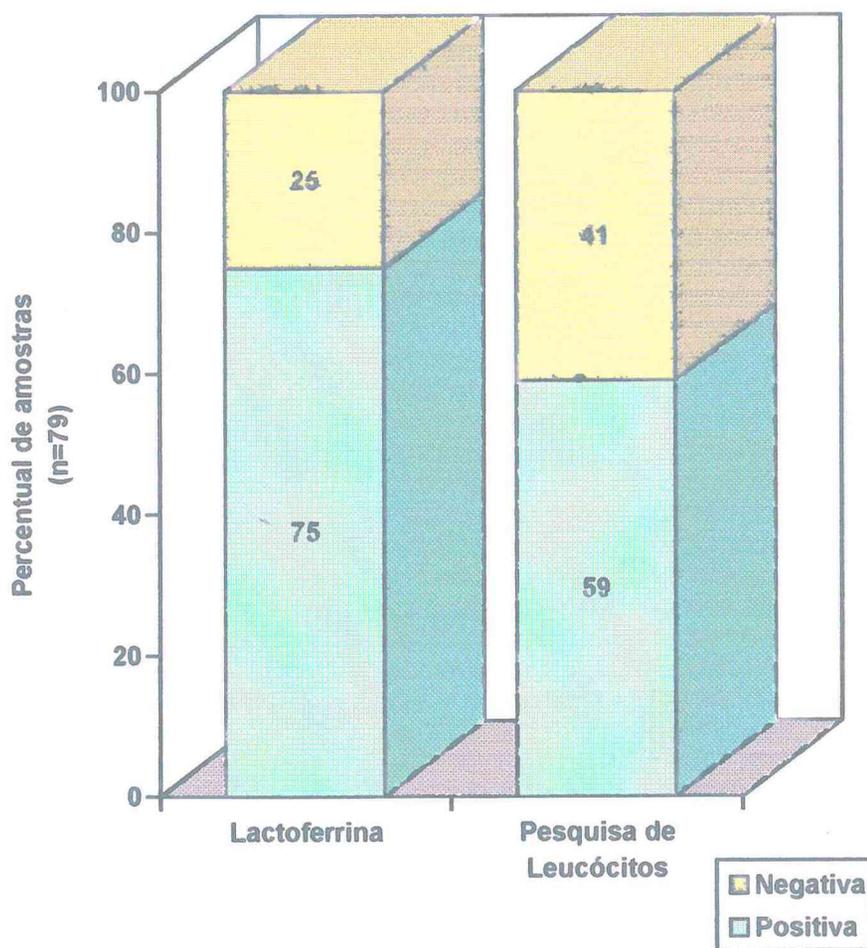


Figura 5. Comparação entre a sensibilidade do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina e a sensibilidade da pesquisa de leucócitos em 79 amostras fecais de diarreia aguda.

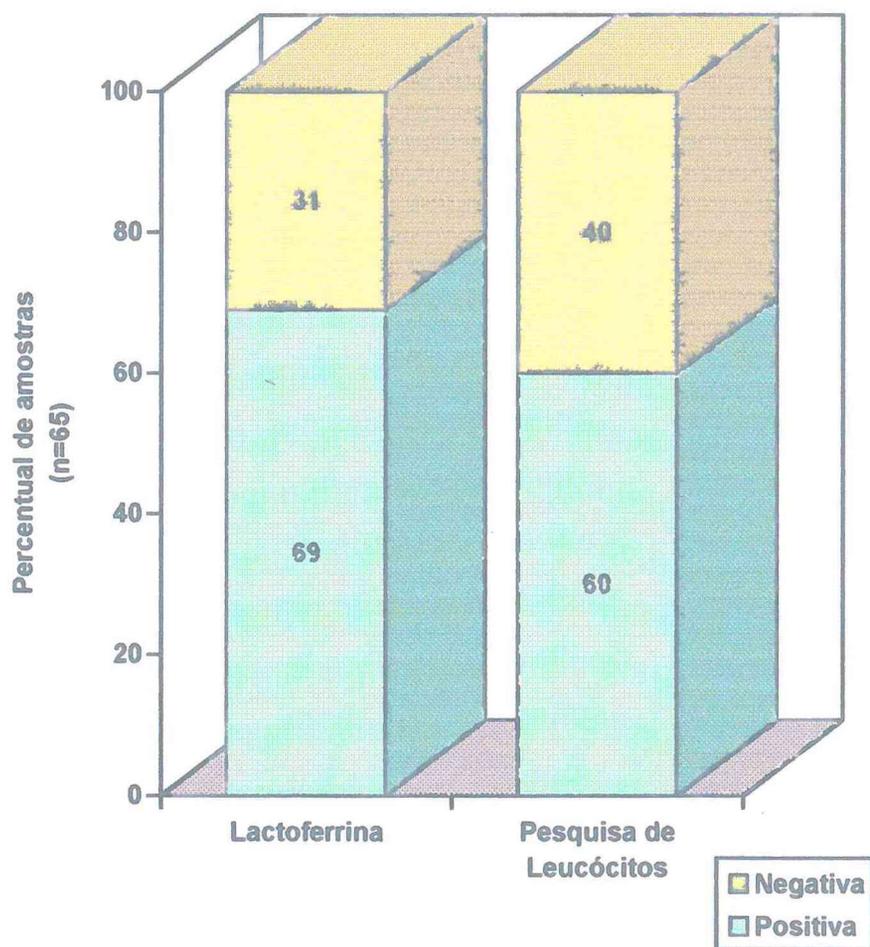


Figura 6. Comparação entre a sensibilidade do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina e a sensibilidade da pesquisa de leucócitos em 65 amostras fecais de diarreia persistente.

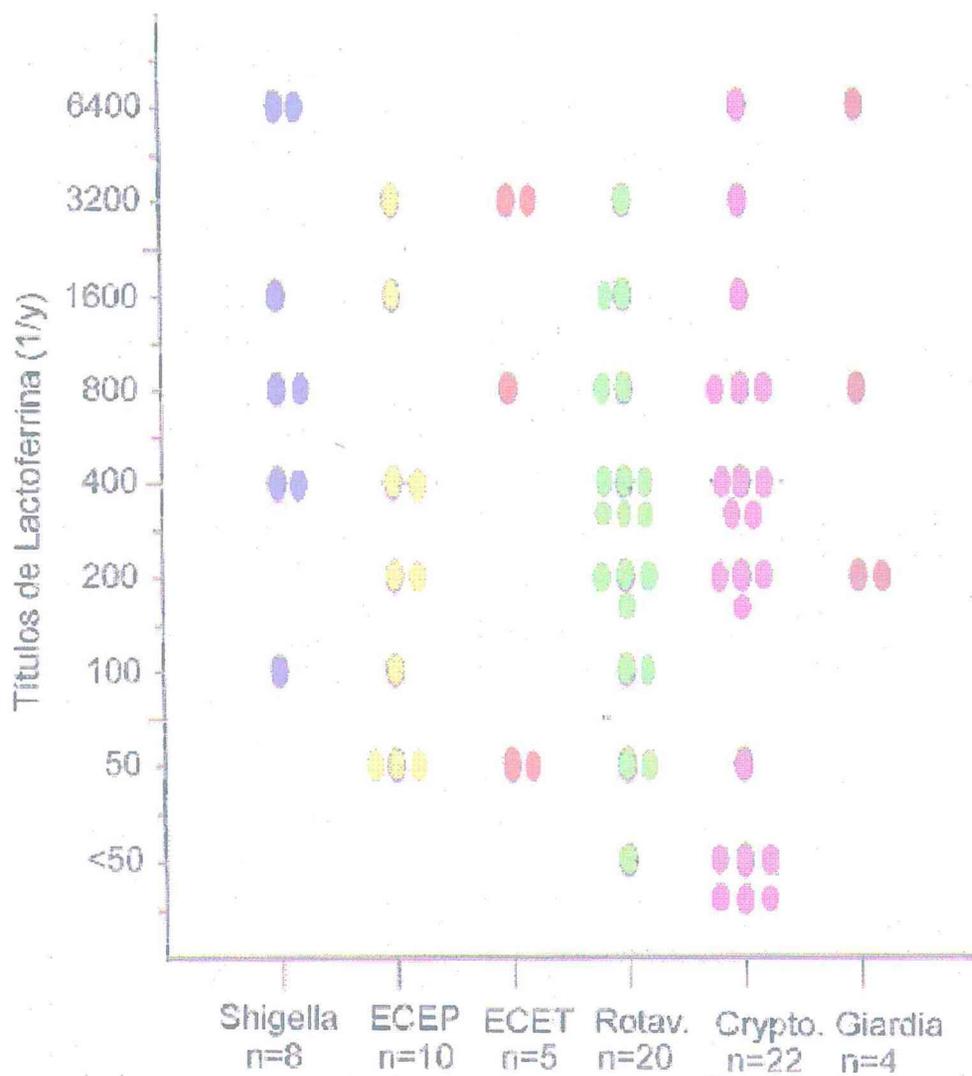


Figura 7. Distribuição dos resultados do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina (em títulos) conforme agente etiológico isolado em diarreias infantis.

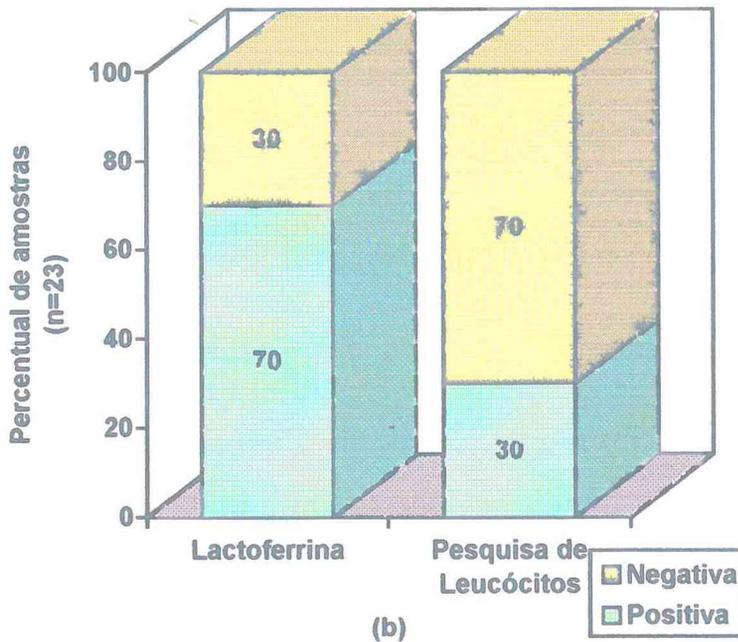
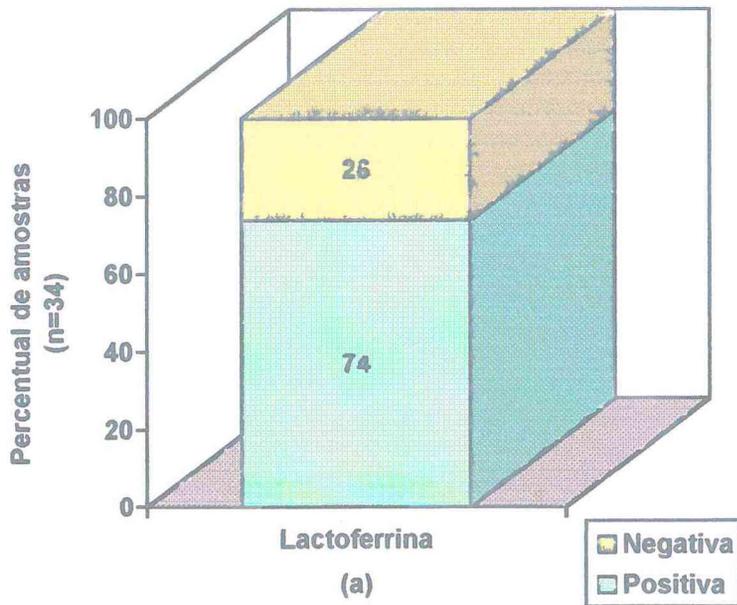


Figura 8. Sensibilidade do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina em 34 amostras fecais de adultos positivas para toxinas do *C. difficile* pela cultura de células (CHO) e ELISA (a) e sensibilidade comparada à pesquisa de leucócitos em 23 dessas amostras (b). ($p < 0.05$)

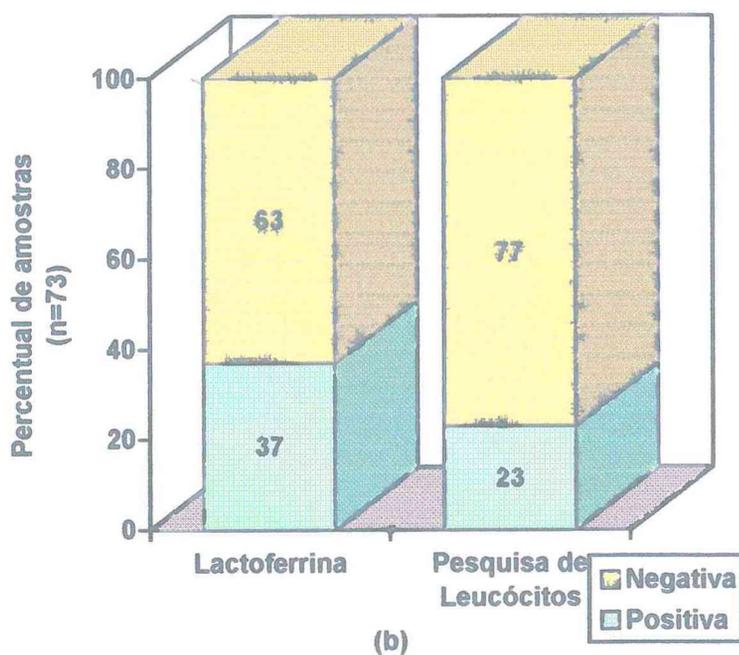
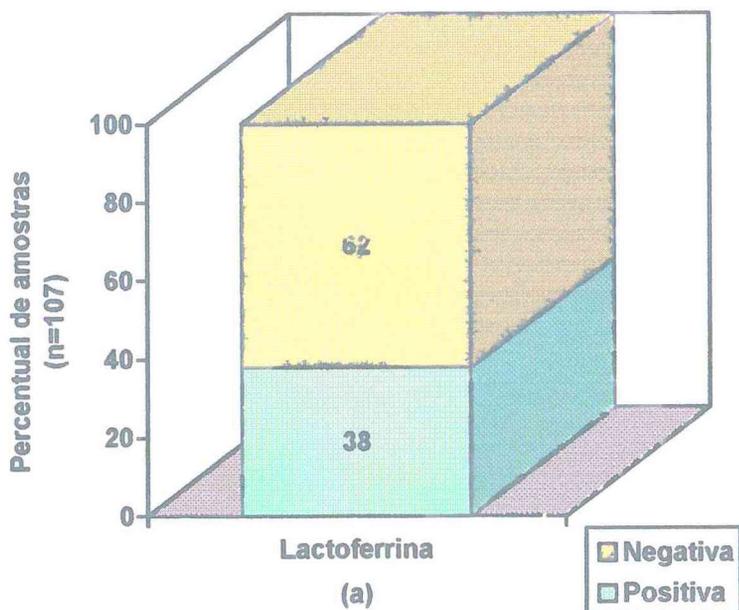


Figura 9. Sensibilidade do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina em 107 amostras fecais de adultos positivas para toxina B do *C. difficile* pela cultura de células (CHO) e negativas pelo ELISA (a) e sensibilidade comparada à pesquisa de leucócitos em 73 dessas amostras (b). ($p < 0.05$)

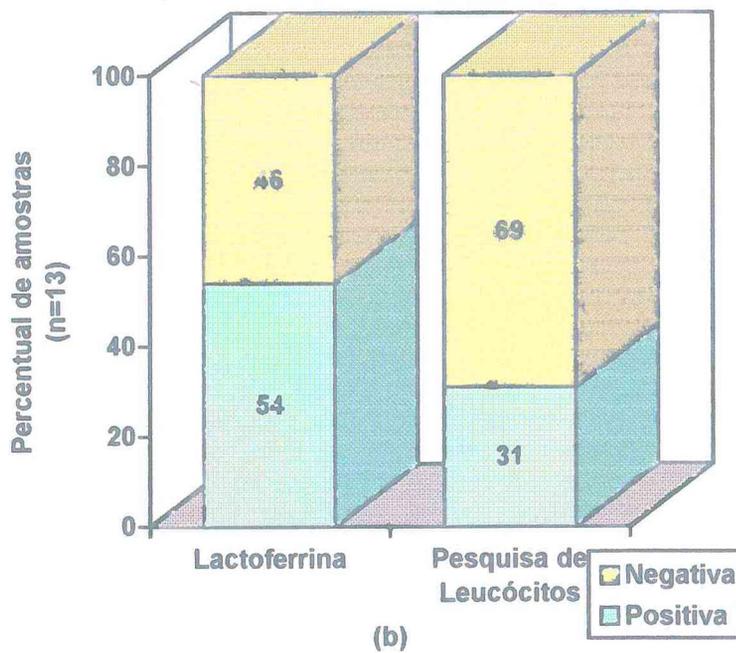
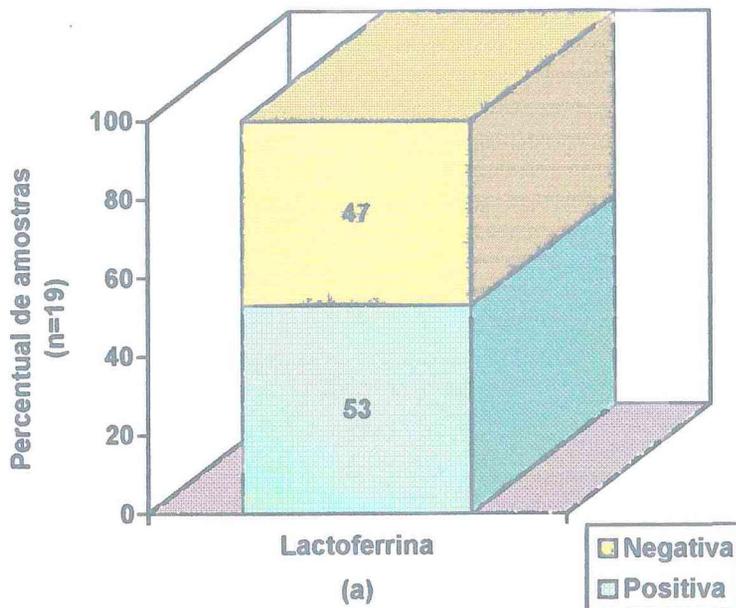


Figura 10. Sensibilidade do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina em 19 amostras fecais de adultos positivas para toxina A do *C. difficile* pelo ELISA e negativas pela cultura de células (CHO) (a) e sensibilidade comparada à pesquisa de leucócitos em 13 dessas amostras (b).

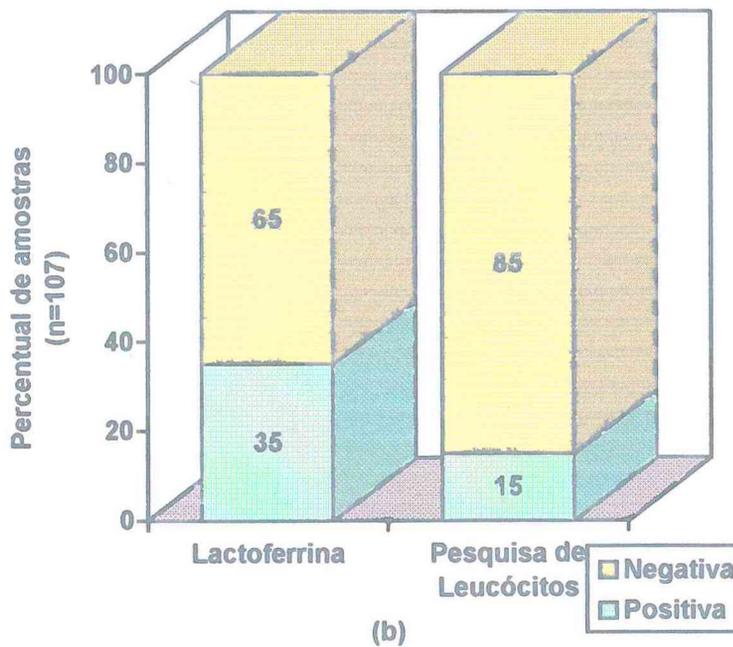
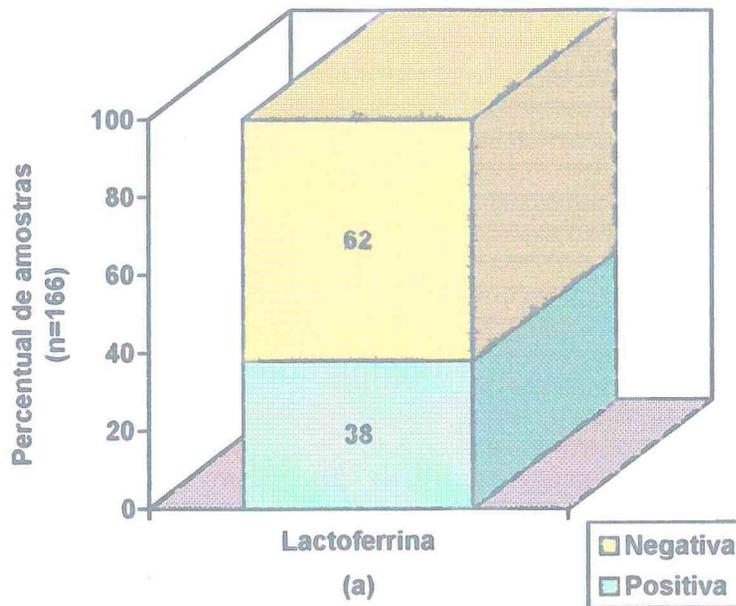


Figura 11. Sensibilidade do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina em 166 amostras fecais de adultos negativas para toxinas do *C. difficile* pela cultura de células (CHO) e ELISA (a) e sensibilidade comparada à pesquisa de leucócitos em 107 dessas amostras (b). ($p < 0.05$)

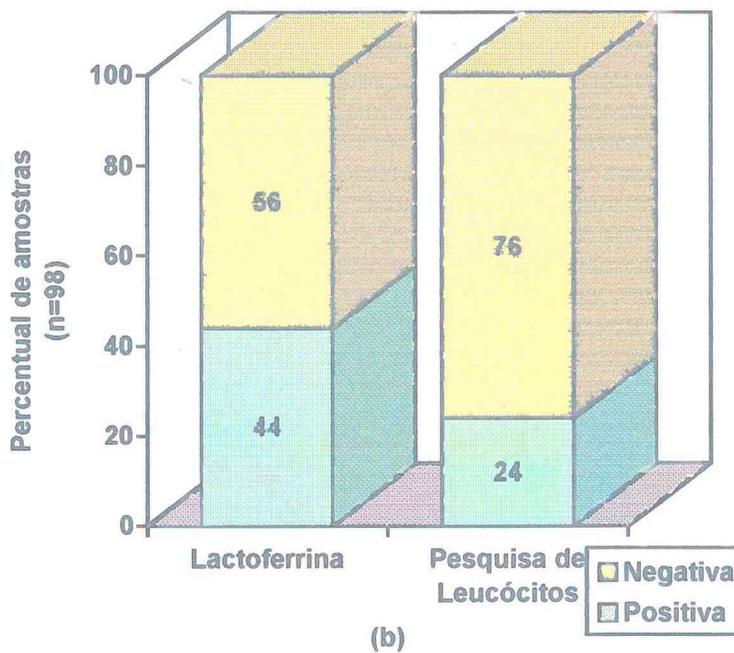
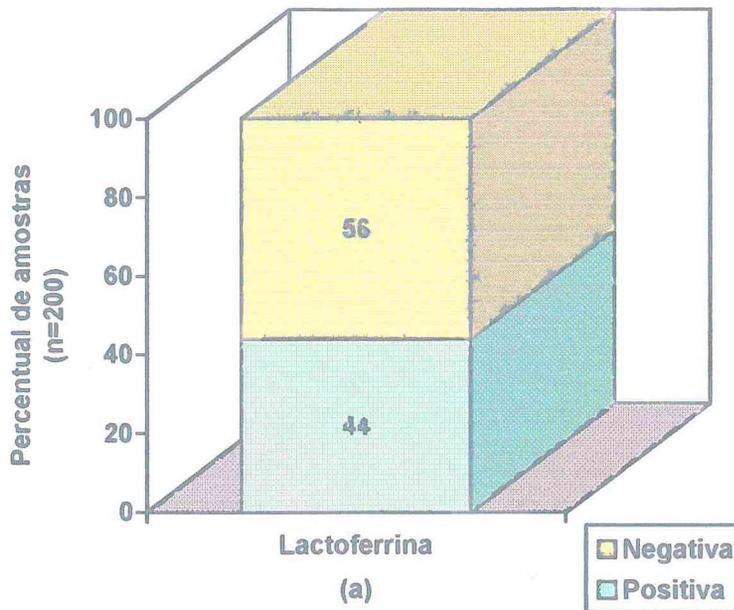


Figura 12 Sensibilidade do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina em 200 amostras fecais de adultos positivas para toxina B do *C. difficile* pela cultura de células (CHO) (a) e sensibilidade comparada à pesquisa de leucócitos em 98 dessas amostras (b). ($p < 0.05$)

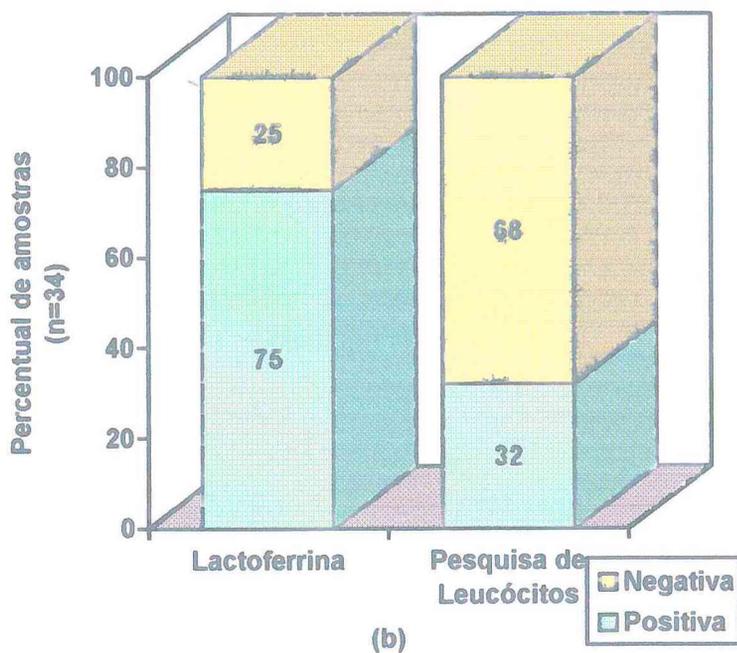
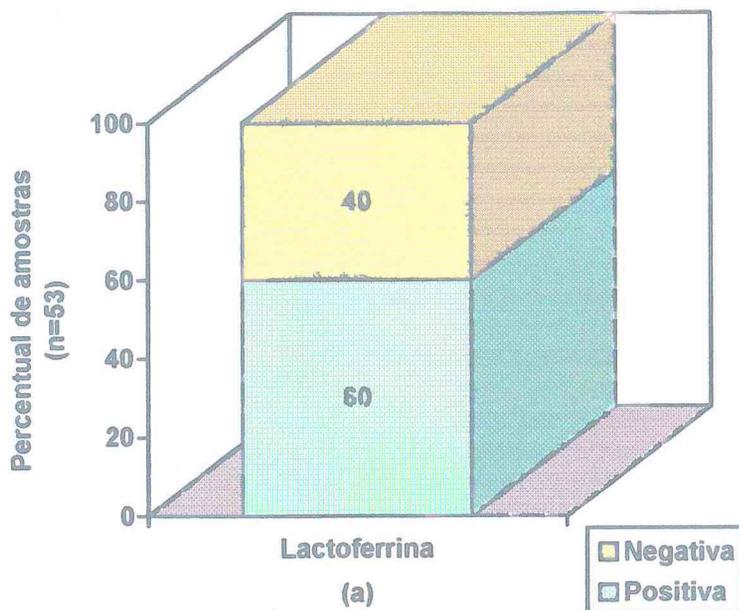


Figura 13. Sensibilidade do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina em 53 amostras fecais de adultos positivas para toxina A do *C. difficile* pelo ELISA (a) e sensibilidade comparada à pesquisa de leucócitos em 34 dessas amostras (b). ($p < 0.05$)

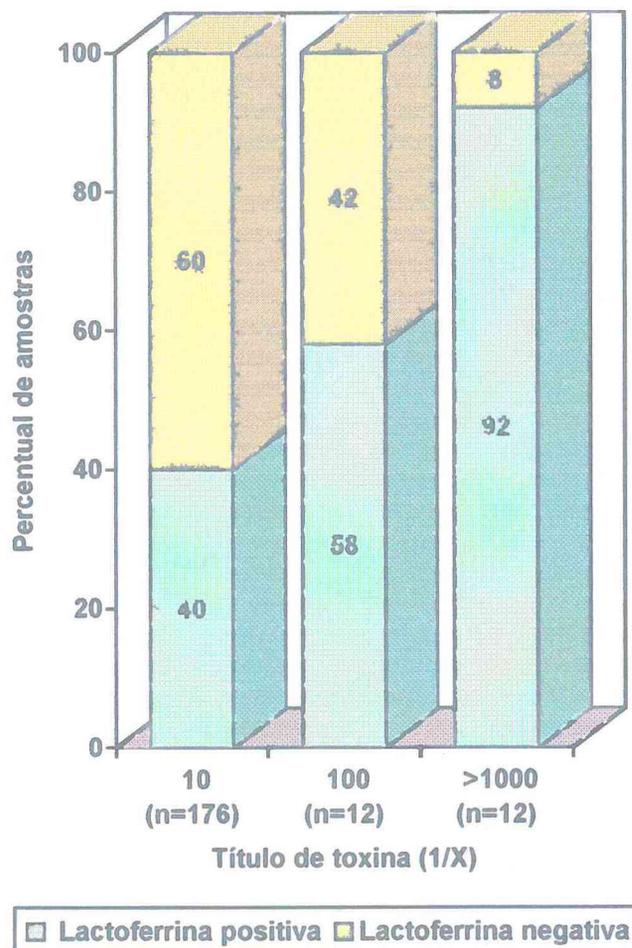


Figura 14. Correlação da sensibilidade do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina em amostras fecais de adultos positivas pelo método de cultura de células (CHO) com os títulos de toxina do *C. difficile*.

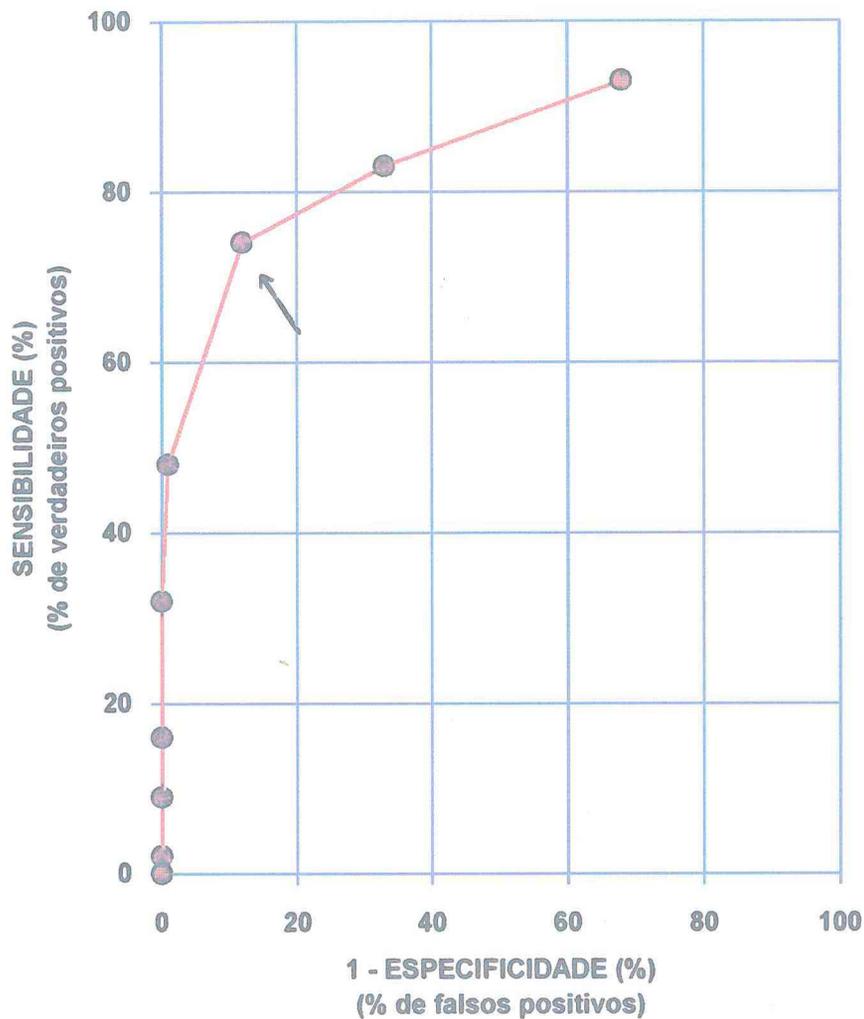


Figura 15. Curva "Receiver Operator Characteristic" (ROC), construída pela representação da taxa de verdadeiros positivos (sensibilidade) contra a taxa de falsos positivos (1-especificidade). Utilizou-se a comparação dos resultados do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina em 72 amostras fecais de controles infantis e 168 amostras fecais de crianças de diarreia inflamatória e não inflamatória.

5- DISCUSSÃO

No presente trabalho, avaliamos a hipótese de a lactoferrina ser um marcador de inflamação entérica aguda em diarreias de aquisição natural em crianças e adultos, utilizando amplo número de amostras fecais. Dados de uma publicação anterior sugeriam que a lactoferrina seria um marcador indireto da presença de neutrófilos nas fezes, vez que amostras fecais de adultos humanos com shigelose experimental e de shigelose de aquisição natural em crianças apresentaram títulos de lactoferrina anormalmente elevados (GUERRANT e col., 1992).

Nossos experimentos iniciais para determinação da sensibilidade das partículas de látex adsorvidas com anticorpo anti-lactoferrina demonstraram que o teste de aglutinação pelo látex é capaz de detectar um mínimo de $1\mu\text{g/ml}$ de lactoferrina, concentração aproximada contida no maior título positivo de cada amostra testada (zona de leitura do teste). Essa sensibilidade é mil vezes inferior que o mais sensível ELISA para medir concentração de lactoferrina em fluidos orgânicos (HEGNHOJ & de MUCKADELL, 1985; OTNAESS e col., 1983). Considerando que em diarreia por *Shigella sp.* a média da contagem de leucócitos fecais de um estudo foi $28700/\mu\text{l}$ (SPEELMAN e col., 1987) e que o conteúdo de lactoferrina aproximado de 1 milhão de polimorfonucleares é de 4 a $8\mu\text{g}$ (LEHER & GANZ, 1990), a zona de excesso de antígenos dificilmente ocorreria usando $50\mu\text{l}$ da amostra diarreica na reação de aglutinação pelo látex. Esta alíquota da amostra diarreica conteria aproximadamente 1500000 polimorfonucleares, os quais sofrendo degranulação liberariam uma quantidade de lactoferrina que reagiria com as partículas de látex na zona de equivalência da reação antígeno-anticorpo.

O estabelecimento do ponto de corte de um novo teste, limite entre normalidade e anormalidade, é imprescindível quando os resultados se apresentam numa série de valores contínuos ou intervalares (SACKETT e col., 1985). Esperar-se-ia que existisse diferença entre o ponto de corte de diarreia inflamatória e não inflamatória, uma vez que nesta última não haveria lactoferrina adicional de neutrófilos degranulados no intestino. Para que isso fosse admissível seria necessário que existissem outras fontes de lactoferrina no intestino além da bile, suco pancreático e leite materno ingerido.

Apesar da fisiologia da lactoferrina no trato gastrintestinal até hoje não estar esclarecida, alguns estudos revelam a sua presença nessa barreira mucosa. Elevados níveis de expressão de RNAm para lactoferrina foram encontrados nas células do cardia, no estômago por LUQMANI e colaboradores em 1991. Esse estudo veio confirmar prévios achados de lactoferrina citoplasmática em metaplasia incompleta, adenomas e carcinomas do tipo intestinal no estômago por técnicas imuno-histoquímicas (TUCCARI e col., 1989). Produção autóctone de lactoferrina foi evidenciada nos enterócitos da mucosa duodeno-jejunal de crianças normais, com doença celíaca e síndrome pós-enterite por técnica imuno-histoquímica por não se correlacionar com os níveis de lactoferrina medidos no suco duodenal (TEDESCHI e col., 1987). Os mecanismos que regulam essa produção intestinal de lactoferrina não são conhecidos até o momento.

Análise dos resultados da concentração de lactoferrina fecal em amostras de diarreia infantil (estudo caso-controle)

Houve boa correlação dos títulos de lactoferrina $\geq 1/200$ com presença de leucócitos (78%) nas 101 amostras consideradas inflamatórias pela presença de

leucócitos (Figura 3), entretanto títulos de normalidade correlacionaram-se com a ausência de leucócitos em apenas 33% das amostras (Figura 2).

A elevada quantidade de falsos positivos (27%), quando se compara a lactoferrina com o "padrão ouro", ou seja, presença de neutrófilos em fezes diarreicas como marcador de diarreia inflamatória e ausência de lactoferrina, nos faz considerar a hipótese de que a lactoferrina possa estar elevada devido a outras fontes produtoras dessa proteína além dos neutrófilos. Os falsos negativos (13%) poderiam ser explicados pela possibilidade de reação cruzada do anticorpo policlonal anti-lactoferrina com uma proteína componente do *M. leprae* e *M. tuberculosis* com peso molecular de 65-Kd (ESAGUY e col., 1991; ÁGUAS e col., 1990), entretanto essas bactérias são raras no trato gastrointestinal de crianças.

A tentativa de correlação entre presença de leucócitos com agentes etiológicos específicos apresentou resultados discordantes da literatura. A tabela 6 do nosso estudo mostra elevados percentuais de leucócitos para diarreia causada por Rotavirus, Adenovirus, *E. coli* enteropatogênica e enterotoxigênica, *Cryptosporidium spp.* e *Giardia*, patógenos sabidamente produtores de diarreia sem exsudação neutrofilica na mucosa do intestino. Os percentuais de leucócitos encontrados em outros estudos de diarreias causadas por diferentes agentes etiológicos variam de 0 a 2.3%, 0 a 25%, 0 a 10.7%, 0 a 18.7% para Rotavirus, Adenovirus, *E. coli* enteropatogênica e enterotoxigênica respectivamente (ALVARADO, 1983; PICHERING e col., 1977; JINDAL & ARORA, 1991). Adicionalmente, nas diarreias em que nenhum patógeno foi isolado, os percentuais de leucócitos fecais encontrados (51%) diferem do maior percentual (18.4%) relatado em outros estudos (ALVARADO, 1983). A sensibilidade de 59% e 60% da pesquisa de leucócitos para diarreias aguda e persistente mostradas nas figuras 5 e 6 é superior aos achados de 24% e 12% para as respectivas categorias de diarreia em outro estudo realizado em Fortaleza (SCHORLING e col., 1990).

Essa excessiva sensibilidade da pesquisa de leucócitos deve-se provavelmente aos critérios de leitura usados no estudo caso-controle de diarreia. É bem verdade que os critérios variam muito nos diferentes estudos de pesquisa de leucócitos nas fezes, entretanto, todos são unânimes em visualizar o neutrófilo íntegro, de forma a distingui-lo de mononucleares e de núcleos de células epiteliais descamadas para a luz intestinal. Esse diagnóstico diferencial não é possível de ser realizado quando os piócitos também são incluídos na contagem de leucócitos fecais (KORZENIOWSKI e col., 1979; HARRIS e col., 1972). A grande experiência de Alvarado no exame citológico de amostras fecais normais com sangue e de amostras fecais de diarreia inflamatória demonstrou que o melhor critério de leitura em diarreia inflamatória seria considerar dois ou mais leucócitos por campo de grande aumento (ALVARADO, 1983).

Assim, se as concentrações de lactoferrina eram mais sensíveis que a pesquisa de leucócitos (figura 4), e considerando que estes foram superestimados na contagem, a diferença de sensibilidade, na realidade, torna-se ainda maior. A lactoferrina revelou-se positiva (título $\geq 1/200$) tanto para diarreias causadas por *Shigella*, quanto para outras causadas por patógenos entéricos não invasivos e naquelas sem etiologia definida. As dimensões destas observações são avaliadas pela elevada sensibilidade da lactoferrina em todos os casos de diarreia mostrados na tabela 6.

Não há correlação estratificada entre concentração de lactoferrina (em títulos) e agentes etiológicos específicos, já que tanto o patógeno invasivo da mucosa entérica (*Shigella*) quanto os não invasivos se distribuem em todos os títulos sem diferenças significativas. Variar o ponto de corte para 1/200, 1/400, 1/800 ou títulos superiores seria um artifício ineficaz na tentativa de encontrar um ponto de corte inflamatório, como ilustra a figura 7. Mesmo havendo boa correlação com a presença de leucócitos, o critério de leitura usado neste último método atenua as evidências.

A variável aleitamento misto parece não ter influenciado na análise dos dados, já que representam um pequeno percentual de amostras e não interferiu nos títulos de normalidade (1/50) apresentados por duas crianças controles em amamentação. A presença constante de bactérias lactofermentadoras nas amostras que apresentavam leucócitos nas fezes e títulos de normalidade de lactoferrina leva a se pensar que haja alguma interação entre essas bactérias e a lactoferrina liberada de neutrófilos, de forma a bloquear a sua ligação com o anticorpo anti-lactoferrina nas amostras. A elaboração de sideróforos por bactérias e a ligação específica da lactoferrina a receptores de membrana bacterianos foram bem demonstradas em vários ensaios de interação entre lactoferrina e bactérias presentes no trato intestinal (NAIDU e col., 1991; KISHORE e col., 1991; NAIDU e col., 1991).

Vários estudos mostram a falta de correlação entre a quantidade de lactoferrina e a quantidade de neutrófilos na árvore respiratória de pacientes com asma brônquica ou com bronquite crônica. A elevação da lactoferrina no lúmen respiratório seria devida à sua produção pelas células epiteliais das vias aéreas. Os mediadores dessa estimulação são desconhecidos (THOMPSON e col., 1990; van de GRAAF e col., 1991; KALLENBACH e col., 1992). Embora possa haver correlação entre a lactoferrina e a presença de neutrófilos no nosso estudo, títulos elevados de lactoferrina fecal ($\geq 1/200$) ocorreram também em elevada proporção de amostras com ausência de leucócitos (27%). Evidência maior de que a lactoferrina não reflete apenas a degranulação neutrofílica no trato intestinal está na presença de elevados títulos fecais dessa proteína em diarreia de etiologia não invasiva, a qual até a presente data não se reconhece como desencadeadora de infiltração neutrofílica aguda da mucosa intestinal. Assim, as evidências favorecem que a elevação de lactoferrina se deva à sua produção pelos enterócitos ou outras células da mucosa intestinal, em resposta a estímulos lesivos à mucosa entérica. Além dessa provável fonte, a degranulação neutrofílica contribui para a elevação da lactoferrina fecal nas diarreias inflamatórias.

Análise dos resultados do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina em amostras de diarreia em pacientes adultos do Hospital da Universidade de Virginia

A avaliação dos dados laboratoriais e clínicos de 93 pacientes com diarreia internados no referido hospital sugere alta prevalência de diarreia associada a antibiótico naquele nosocômio. Até o presente, o diagnóstico dessa patologia envolve análise de muitos fatores clínicos e laboratoriais, já que é uma doença de amplo espectro de manifestações e gravidade. A presença do organismo ou suas toxinas (A e B) nas amostras fecais não garante um diagnóstico de certeza absoluto, uma vez que amostras de portadores assintomáticos podem conter toxinas A e B (McFARLAND, 1992).

Comumente recorre-se a recursos como a pesquisa de leucócitos nas fezes para fortificar a possibilidade de lesão inflamatória entérica causada pelo *C. difficile*. A sensibilidade desse método está em torno de 50% nos casos de diarreia associada a antibiótico (BARTLETT, 1992). A lactoferrina apresentou a mesma sensibilidade (50%) nos 82 episódios diarreicos associados a antibiótico do nosso estudo quando foram analisados os dados clínicos juntamente com os dados laboratoriais. O achado de elevados títulos de lactoferrina fecal em todos os 3 casos de colite associada a antibiótico sugere que altos títulos possam se correlacionar com a gravidade da lesão tissular entérica, embora o número de casos seja pequeno. A interessante observação de que todas as 5 amostras fecais de um paciente com pancreatite apresentavam lactoferrina positiva pode dever-se também ao fato de que em pancreatites ocorre hipersecreção de lactoferrina no suco pancreático (HAYAKAWA e col., 1993).

A maior sensibilidade do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina comparada à da pesquisa de leucócitos em amostras com diagnóstico laboratorial de *C.*

difficile por cultura de células CHO e/ou ELISA, ilustrados nas figuras 8, 9, 10, 12 e 13, sugere que o teste em estudo possa servir como um bom marcador de lesão entérica nessa patologia, algumas vezes podendo ser positivo antes da presença detectável de toxina pela cultura de células.

Naqueles casos em que a cultura de células e o ELISA para detecção de *C. difficile* são negativos, a detecção de títulos elevados de lactoferrina fecal pode servir como método de seleção para a indicação da pesquisa de toxinas do *C. difficile* em um hospital onde há elevada prevalência da doença, já que esses testes são onerosos (BOWMAN e col., 1992).

Apesar da quantidade de toxinas do *C. difficile* nas fezes não se correlacionar com a gravidade dos sintomas apresentados pelo paciente portador de *C. difficile* (BARTLETT, 1990), encontramos boa correlação entre a sensibilidade do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina e títulos positivos de toxina B progressivamente maiores detectados pela cultura de células CHO, como mostra a figura 14. Essa observação favorece a idéia de que a lactoferrina possa ser produzida pelos enterócitos em resposta a estímulos lesivos.

Avaliação da acurácia diagnóstica do teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina

O teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina apresentou uma boa sensibilidade (0.74) para o estudo de diarreia em crianças, porém uma baixa sensibilidade para diarreia em adultos (0.42). Essa discrepância provavelmente pode ser devida à diferença de reatividade das células da mucosa intestinal de crianças e adultos a diferentes patógenos entéricos, assim como existe diferença nos títulos de normalidade entre crianças e adultos, ou refletir apenas a diferença de agentes

etiológicos entre os dois estudos. No estudo realizado na Universidade de Virginia a etiologia foi uniformemente *C. difficile* enquanto no estudo de diarreia em crianças brasileiras os agentes causais foram múltiplos. O significado de um teste positivo ($\geq 1/200$ em crianças e $\geq 1/50$ em adultos) não implica que a diarreia seja inflamatória, apenas que há uma resposta da mucosa intestinal aos patógenos entéricos na qual ocorre aumento da liberação de lactoferrina, seja por produção autóctone por células da mucosa intestinal, seja por degranulação neutrofílica.

A especificidade do teste foi boa tanto no estudo de diarreia infantil (0.88), quanto no estudo de diarreia em adultos (0.94). Isso reflete o fato de que poucos controles tiveram valores acima do ponto de corte. Por esta última razão, o valor preditivo positivo também apresentou elevados percentuais em ambos os estudos.

Um novo teste diagnóstico é geralmente visto no início das pesquisas com muito entusiasmo, porém estudos clínicos com grande número de amostras são necessários para a comprovação de sua utilidade na prática clínica. Grande valor foi dado inicialmente ao antígeno carcinoembrionário no diagnóstico do câncer de cólon, mas posteriormente esse antígeno começou a aparecer em outras patologias (FLETCHER e col., 1989). Consideramos a lactoferrina inicialmente como provável marcador de diarreia inflamatória aguda (GUERRANT e col., 1992), porém os resultados deste estudo levantam evidências de que esta hipótese não é verdadeira.

6- CONCLUSÕES

1- A lactoferrina fecal não é um marcador de inflamação intestinal aguda determinada por patógenos entéricos em diarreias.

2- Os níveis de normalidade de lactoferrina fecal expresso em títulos foram estabelecidos em até 1/100 para crianças e menor que 1/50 em adultos, quando medidos pelo teste de aglutinação pelo látex.

3- Títulos de lactoferrina fecal acima dos níveis de normalidade constituem evidência de agressão da mucosa entérica por patógenos intestinais em diarreias infantis e de adultos, quando medidos pelo teste de aglutinação pelo látex anti-lactoferrina nos dois estudos realizados. É provável que a elevação dos títulos de lactoferrina ocorra devido à estimulação da produção autóctone pelas células da mucosa intestinal além da degranulação neutrofilica.

4- Lactoferrina fecal acima do nível de normalidade pode servir como indicador de lesão entérica por *C. difficile* e como teste de seleção das amostras fecais de diarreia nosocomial a serem avaliadas para detecção deste patógeno ou de seus produtos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHESON, D. & KEUSCH, G.T. Invasive enteropathies. **Baillière's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases: international practice and research**, 3(3): 463-87, 1988.
- ACHESON, D.W.K. Enterotoxins in acute infective diarrhoea. **J. Infection**, 24: 225-45, 1992.
- ÁGUAS, A.P.; ESAGUY, N.; SUNKEL, C.E.; SILVA, M.T. Cross-reactivity and sequence homology between the 65-kilodalton mycobacterial heat shock protein and human lactoferrin, transferrin, and DR_β subsets of major histocompatibility complex class II molecules. **Infect. Immun.**, 58(5): 1461-1470, 1990.
- ALBERTI-FLOR, J. J.; HERNANDEZ, M. E.; FERRER, J. P.; HOWELL, S. Fulminant idiopathic pseudomembranous colitis. **Am. Fam. Physician**, 179-82 1989.
- ALVARADO, T. Faecal leucocytes in patients with infectious diarrhoea. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 77(3): 316-20, 1983.
- AVERY, R.M.; SHELTON, A.P.; BEARDS, G.M.; OMOTADE, O.O.; OYEJIDE, O.C.; OLALEYE, D.O. Viral agents associated with infantile gastroenteritis in Nigeria: relative prevalence of Adenovirus Serotypes 40 and 41, Astrovirus, and Rotavirus Serotypes 1 to 4. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, 10(2): 105-108, 1992.

BALDACINI, O.; GIRARDOT, R.; GREEN, G.A.; RIHN, B.; MONTEIL, H.

Comparative study of immunological properties and cytotoxic effects of *Clostridium difficile* toxin B and *Clostridium sordellii* toxin L. **Toxicon**, 30(2): 129-40, 1992.

BARBEYRAC, B.; GUINET, R.; QUENTIN, C.; CANTET, P.; BEBEAR, C.

Clostridium difficile and its cytotoxin in diarrhoeic stools of hospitalized patients. **Ann. Biol. Clin.**, 47(2): 67-70, 1989.

BARTLETT, J.G. Antibiotic-associated diarrhea. **Clin. Infect. Dis.**, 15: 573-81, 1992.

BARTLETT, J.G. *Clostridium difficile*: clinical considerations. **Rev. Infect. Dis.**, 12(2): 243-51, 1990.

BEDROSSIAN, C.W.M. Lactoferrin demonstration in thyroid follicular and papillary carcinomas. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, 112: 1176-77, 1988.

BELLAMY, W.; TAKASE, M.; WAKABAYASHI, H.; KAWASE, K.; TOMITA, M.

Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. **J. Appl. Bacteriol.**, 73: 472-79, 1992.

BENNISH, M.L.; SALAM, M.A.; HOSSAIN, M.A.; MYAUX, J.; KHAN, E.H.;

CHAKRABORTY, J.; HENRY, F.; RONSMANS, C. Antimicrobial resistance of *Shigella* isolates in Bangladesh, 1983-1990: increasing frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole and nalidixic acid. **Clin. Infect. Dis.**, 14: 1055-60, 1992.

- BERN, C.; MARTINES, J.; de ZOYSA, I.; GLASS, R.I. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. **Bull. World Health Organ.**, 70(6): 705-14, 1992.
- BETTE, P.; OKSCHE, A.; MAULER, F.; V. EICHEL-STREIBER, C.; POPOFF, M. R.; HABERMANN, E. A comparative biochemical, pharmacological and immunological study of *Clostridium novyi* α -toxin, *C. difficile* toxin B and *C. sordellii* lethal toxin. **Toxicon**, 29(7): 877-87, 1991.
- BIRGENS, H.S. The interaction of lactoferrin with human monocytes. **Dan. Med. Bull.**, 38(3): 244-52, 1991.
- BLANTON, K.J.; BISWAS, G.D.; TSAI, J.; ADAMS, J.; DYER, D.W.; DAVIS, S.M.; KOCH, G.G.; SEN P.K.; SPARLING, P.F. Genetic evidence that *Neisseria gonorrhoeae* produces specific receptors for transferrin and lactoferrin. **J. Bacteriol.**, 172(9): 5225-35, 1990.
- BOBAK, D.A. & GUERRANT, R.L. New developments in enteric bacterial toxins. **Adv. Pharmacol.**, 23: 85-108, 1992.
- BORRIELLO, S. P. Possible mechanisms of action of anti-microbial agent-associated gastrointestinal symptoms. **Postgrad. Med. J.**, 68(suppl. 3): 38-41, 1992.
- BORRIELLO, S.P. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection of the gut. **J. Med. Microbiol.**, 33: 207-15, 1990.
- BORRIELLO, S. P.; DAVIES, H. A.; KAMIYA, S.; REED, P. J.; SEDDON, S. Virulence factors of *Clostridium difficile*. **Rev. Infect. Dis.**, 12(2): 185-91, 1990.

- BOWIE, M.D.; MMED, M.D.M; HILL, I.D. A descriptive terminology of diarrhoeal disease in infants and young children. **J. Trop. Pediatr.**, 38: 55-56, 1992.
- BOWMAN, R. A.; RILEY, T.V. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 7(4):476-84, 1988.
- BOWMAN, R.A. & RILEY, T.V. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 7(4): 476-84, 1988.
- BOWMAN, R.A.; BOWMAN, J.M.; ARROW, S.A.; RILEY, T.V. Selective criteria for the microbiological examination of faecal specimens. **J. Clin. Pathol.**, 45: 838-39, 1992.
- BRAEGGER, C.P.; NICHOLLS, S.; MURCH, S.H.; STEPHENS, S.; MacDONALD, T.T. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. **Lancet**, 339: 89-91,1992.
- BROXMEYER, H.E. Suppressor cytokines and regulation of myelopoiesis: biology and possible clinical uses. **Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, 14(1): 22-30, 1992.
- BURKE, D.; Al JUMAILI, B.J.; Al MARDINI, H.; RECORD, C.O. Culture negative cytotoxin positive stools in community acquired diarrhoea. **Gut**, 34: 192-93, 1993.
- BUTLER, T. Shigellosis. In: WYNGAARDEN, J.B. & SMITH, L.H.. **Cecil Textbook of Medicine**, 18. ed., U.S.A.: W. B. Saunders Company, 1988. cap. 285, p.1646-48.

BUTLER, T. Yersinia infections. In: WYNGAARDEN, J.B. & SMITH, L.H.. **Cecil Textbook of Medicine**, 18. ed., U.S.A., W. B. Saunders Company, 1988. cap. 291, p.1661-64.

BUTLER, T.W.; GROSSI, C.E.; CANESSA, A.; PISTOIA, V.; BARTON, J.C. Immunoreactive lactoferrin in resting, activated and neoplastic lymphocytes. **Leuk. Res.**, 14(5): 441-47, 1990.

CAMORLINGA, M.; MUÑOZ, O.; GUISCAFRE, H.; TORRES, J. Colonization by *Clostridium difficile* in hospitalized children: risk factors and typification of the isolated strains. **Arch. Invest. Med.**, 22(1): 19-26, 1991.

CAMPBELL, T.; SKILTON, R.A.; COOMBES, R.C.; SHOUSHA, S.; GRAHAM, M.D.; LUQMANI, Y.A. Isolation of a lactoferrin cDNA clone and its expression in human breast cancer. **Br. J. Cancer**, 65: 19-26, 1992.

CARPENTER, C.C.J. Acute infectious diarrheal diseases and bacterial food poisoning. In: WILSON, J.D.; BRAUNWALD, E.; ISSELBACHER, K.J.; PETERSDORF, R.G.; MARTIN, J.B.; FAUCI, A.S.; ROOT, R.K. **Harrison's Principles of Internal Medicine**, 12 ed., U.S.A., McGraw-Hill, Inc., 1991. cap. 92, p.519-24.

CHOMETTE, G.; AURIOL, M.; VAILLANT, J.-M.; KASAI, T.; NIWA, M.; MORI, M. An immunohistochemical study of the distribution of lysozyme, lactoferrin, α_1 -antitrypsin e α_1 -antichymotrypsin in salivary adenoid cystic carcinoma. **Pathol. Res. Pract.**, 187: 1001-08, 1991.

COHER, M.S.; BRITIGAN, B.E.; FRENCH, M.; BEAN K. Preliminary observations on lactoferrin secretion in human vaginal mucus: variation during the menstrual

cycle, evidence of hormonal regulation, and implications for infection with *Neisseria gonorrhoeae*. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, 157(5): 1122-25, 1987.

CZIRÓK, É.; MILCH, H.; NÉMETH, K.; GADÓ, I. In vitro and in vivo (LD₅₀) effects of human lactoferrin on bacteria. **Acta Microbiol. Hung.**, 37(1): 55-71, 1990.

DAVIDSON, L.A. & LÖNNERDAL, B. Fe-saturation and proteolysis of human lactoferrin: effect on brush-border receptor-mediated uptake of Fe and Mn. **Am. J. Physiol.**, 257: 930-34, 1989.

DE LALLA, F.; NICOLIN, R.; RINALD, E.; SCARPELLINI, P.; RIGOLO, R.; MANFRIN, V.; TRAMARIN, A. Prospective study of oral teicoplanin versus oral vancomycin for therapy of pseudomembranous colitis and *Clostridium difficile*-associated diarrhea. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 36(10): 2192-96, 1992.

de SILVA, D.G.H.; MENDIS, L.N.; SHERON, N.; ALEXANDER, G.J.M.; CANDY, D.C.A.; CHART, H.; ROWE, B. TNF α in stool as marker of intestinal inflammation. **Lancet**, 340: 372, 1992.

DESCHI, A.; TUCCARI, G.; MAGAZZÙ, G.; ARENA, F.; RICCIARDI, R.; BARRESI, G. Immunohistochemical localization of lactoferrin in duodenojejunal mucosa from celiac children. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, 6(3): 328-34, 1987.

DONANGELO, C.M.; TRUGO, N.M.F.; MESQUITA, V.L.V.; ROSA, G.; SILVA, V.L.A. Lactoferrin levels and unsaturated iron-binding capacity in colostrum of Brazilian women of two socioeconomic levels. **Br. J. Med. Biol. Res.**, 24: 889-93, 1991.

- DONNENBERG, M.S. & KAPER, J.B. Enteropathogenic *Escherichi coli*. **Infect. Immun.**, 60: 3953-61, 1992.
- ELLISON III, R.T. & GIEHL, T.J. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. **J. Clin. Invest.**, 88: 1080-1091, 1991.
- ELLISON III, R.T.; LUO, Q.; RELLER, L.B. Enhancement of the activity of cefotaxime by iron-binding proteins. **J. Antimicrob. Chemother.**, 25(3): 479-81, 1990.
- ELLISON III, R.T.; GIEHL, T.J.; LaFORCE, F.M. Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. **Infect. Immun.**, 56(11): 2774-81, 1988.
- ESAGUY, N.; ÁGUAS, A.P.; van EMBEDEN, J.D.A.; SILVA, M.T. Mycobacteria and human autoimmune disease: direct evidence of cross-reactivity between human lactoferrin and the 65-kilodalton protein of tubercle and leprosy bacilli. **Infect. Immun.**, 59(3): 1117-25, 1991.
- FAYER, R. & UNGAR, B.L.P. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. **Microbiol. Rev.**, 50: 458-83, 1986.
- FEINSTEIN, A.R. Diagnostic and spectral markers. In: ---. **Clinical Epidemiology**, U.S. A.: W. B. Saunders Company, 1985. cap. 25, p. 597-631.
- FEKETY, R. Antibiotic-associated colitis. In: MANDELL, G.L.; DOUGLAS Jr., R.G.; BENETT, J.E. **Principles and Practice of Infections Diseases**, 3. ed., U.S.A.: Churchill Livingston, 1990. cap.83, p.863-68.

- FEKETY, R.; KIM, K.; BROWN, D.; BATTS, D. H.; CUDMORE, M.; SILVA, J.
Epidemiology of antibiotic-associated colitis: isolation of *Clostridium difficile* from hospital **Am. J. Med.**, 70: 906-908, apr.1981.
- FIELD, M.; RAO, M.C.; CHANG, E.B. Intestinal electrolyte transport and diarrheal disease. **N. Engl. J. Med.**, 321(13): 879-83, 1989.
- FIorentini,C; ARANCIA, G.; PARADISI, S.; DONELLI,G.; PIEMONT, F.;
MASTRANTONIO, P. Effects of *Clostridium difficile* toxins A and B on cytoskeleton organization in HEp-2 cells: a comparative morphological study. **Toxicon**, 27(11):1209-18,1989.
- FLETCHER, R.H.; FLETCHER, S.W.; WAGNER, E.H. Diagnóstico. In: ---, **Epidemiologia clínica**, 2. ed., Brasil: Artes Médicas, 1989. cap.3, p.68-107.
- FULLARD, R.J. & TUCKER, D.L. Changes in human tear protein levels with progressively increasing stimulus. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, 32(8): 2290-2301, 1991.
- FURMANSKI, P. & LI, Z.P. Multiple forms of lactoferrin in normal and leukemic human granulocytes. **Exp. Hematol.**, 18: 932-35, 1990.
- FURMANSKI, P.; LI, Z.P; FORTUNA, M.B.; SWAMY, V.B.; DAS, M.R. Multiple molecular forms of human lactoferrin. **J. Exp. Med.**, 170: 415-29, 1989.
- GAHR, M.; SPEER, C.P.; DAMERAU, B.; SAWATZKI, G. Influence of lactoferrin on the function of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, 49: 427-33, 1991.
- GENTA, R.M. Diarrhea in helminthic infections. **Clin. Infect. Dis.**, 16: 122-29, 1993.

- GLICKMAN, R.M. Inflammatory bowel disease. In: WILSON, J.D.; BRAUNWALD, E.; ISSELBACHER, K.J.; PETERSDORF, R.G.; MARTIN, J.B.; FAUCI, A.S.; ROOT, R.K. **Harrison's Principles of Internal Medicine**, 12. ed., U.S.A.: McGraw-Hill, Inc., 1991. cap. 241, p.1268-81.
- GONZALEZ-VALENCIA, G.; MUNOZ, O.; TORRES, J. F. Toxigenicity and adherence in *Clostridium difficile* strains isolated from patients with and without diarrhoea. **Arch. Invest. Med.**, 22(2): 189-95,1991.
- GUERRANT, R.L. & McAULIFFE, J.F. Special problems in developing countries. In: GORBACH, S.L. **Infectious Diarrhea**, U.S.A.: Blackwell Scientific Publications, 1986. cap. 19, p.287-307.
- GUERRANT, R.L. Campylobacter enteritis. In: WYNGAARDEN, J.B. & SMITH, L.H.. **Cecil Textbook of Medicine**, 18. ed., U.S.A.: W. B. Saunders Company, 1988. cap. 286, p.1648-50.
- GUERRANT, R.L. Nausea, vomiting and noninflammatory diarrhea. In: MANDELL, G.L.; DOUGLAS Jr., R.G.; BENETT, J.E. **Principles and Practice of Infections Diseases**, 3. ed., U.S.A.: Churchill Livingstone, 1990a. cap.82, p.851-62.
- GUERRANT, R.L.; ARAUJO, V.; SOARES, E.; KOTLOFF, K.; LIMA, A.A.M.; COOPER, W.H.; LEE, A.G. Measurement of fecal lactoferrin as a marker of fecal leukocytes. **J. Clin. Microbiol.**, 30(5): 1238-42, 1992.
- GUERRANT, R.L. Inflammatory enteritides. In: MANDELL, G.L.; DOUGLAS Jr., R.G.; BENETT, J.E. **Principles and Practice of Infections Diseases**, 3. ed., U.S.A., Churchill Livingstone, 1990b. cap.84, p.870-78.

- GUTTEBERG, T.J.; FLÆGSTAD, T.; JORGENSEN, T. Lactoferrin, C-reactive protein, α -1-antitrypsin and immunoglobulin G in cerebrospinal fluid in meningitis. *Acta Paediatr. Scand.*, 75: 569-72, 1986.
- HAMILTON, J.R. Viral enteropathies. *Baillière's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases: international practice and research*, 3(3): 489-501, 1988.
- HARRIS, J.C.; DuPONT, H.L.; HORNICK, R.B. Fecal leukocytes in diarrheal illness. *Ann. Intern. Med.*, 76: 697-703, 1972.
- HAYAKAWA, T.; KONDO, T.; SHIBATA, T.; MURASE, T.; HARADA, H.; OCHI, K. TANAKA, J. Secretory component and lactoferrin in pure pancreatic juice in chronic pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.*, 38(1): 7-11, 1993.
- HEGNHOJ, J. & de MUCKADELL, O.B.S. An enzyme linked immunosorbent assay for measurements of lactoferrin in duodenal aspirates and other biological fluids. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 45: 498-95, 1985.
- HIRAI, Y.; KAWAKATA, N.; SATOH, K.; IKEDA, Y.; HISAYASU, S.; ORIMO, H.; YOSHINO, Y. Concentrations of lactoferrin and iron in human milk at different stages of lactation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 36: 531-44, 1990.
- HORNICK, R.B. Salmonella infections other than typhoid fever. In: WYNGAARDEN, J.B. & SMITH, L.H.. *Cecil Textbook of Medicine*, 18. ed., U.S.A.: W. B. Saunders Company, 1988. cap. 284, p.1643-46.
- ILSTRUP, D.M. Statistical methods in microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, 3(3): 219-26, 1990.

- JINDAL, N. & ARORA, S. Role of faecal leucocytes in the diagnostic evaluation of acute diarrhoea. **Indian J. Med. Sci.**, 45(10): 261-64, 1991.
- JOHNSON, S.; ADELMANN, A.; CLABOTS, C. R.; PETERSON, L. R.; GERDING, D. N. Recurrences of *Clostridium difficile* diarrhea not caused by the original infecting organism. **J. Infect. Dis.**, 159(2): 340-43, 1989.
- KALLENBACH, J.; BAYNES, R.; FINE, B.; DAJEE, D.; BEZWODA, W. Persistent neutrophil activation in mild asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 90(2): 272-74, 1992.
- KANTHAN, A. G.; BRUCKNER, H. W.; HIRSCHMAN, S. Z.; AGUS, S. G. *Clostridium difficile* diarrhea induced by cancer chemotherapy. **Arch. Intern. Med.**, 152(8):1715-17, 1992.
- KAWAKAMI, H. & LÖNNERDAL, B. Isolation and function of a receptor for human lactoferrin in human fetal intestinal brush-border membranes. **Am. J. Physiol.**, 261: 841-46, 1991.
- KEUSCH, G.T. Salmonellosis. In: WILSON, J.D.; BRAUNWALD, E.; ISSELBACHER, K.J.; PETERSDORF, R.G.; MARTIN, J.B.; FAUCI, A.S.; ROOT, R.K. **Harrison's Principles of Internal Medicine**, 12. ed., U.S.A.: McGraw-Hill, Inc., 1991a. cap. 113, p.609-13.
- KEUSCH, G.T. Shigellosis. In: WILSON, J.D.; BRAUNWALD, E.; ISSELBACHER, K.J.; PETERSDORF, R.G.; MARTIN, J.B.; FAUCI, A.S.; ROOT, R.K. **Harrison's Principles of Internal Medicine**, 12. ed., U.S.A.: McGraw-Hill, Inc., 1991b. cap. 114, p.613-16.

- KISHORE, A.R.; ERDEI, J.; NAIDU, S.S.L FALSEN, E.; FORSGREN, A.; NAIDU, A.S. Specific binding of lactoferrin to *Aeromonas hydrophila*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 83: 115-20, 1991.
- KLEBANOFF, S.J. & WALTERSDORPH A.M. Prooxidant activity of transferrin and lactoferrin. **J. Exp. Med.**, 172: 1293-1303, 1990.
- KORZENIOWSKI, O.M.; BARADA, F.A.; ROUSE, J.D.; GUERRANT, R.L. Value of examination for fecal leukocytes in the early diagnosis of shigellosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 28(6): 1031-35, 1979.
- LEHRER, R.I. & GANZ, T. Antimicrobial polypeptides of human neutrophils. **Blood**, 76(11): 2169-81, 1990.
- LIMA, A.A.M.; INNES Jr., D.J.; CHADEE, K.; LYERLY, D.M.; WILKINS, T.D.; GUERRANT, R.L. *Clostridium difficile* toxin A: Interactions with mucus and early sequential histopathologic effects in rabbit small intestine. **Lab. Invest.**, 61(4): 419-25, 1989.
- LUQMANI, Y.A.; CAMPBELL, T.A.; BENNETT, C.; COOMBES, R.C.; PATERSON, I.M. Expression of lactoferrin in human stomach. **Int. J. Cancer**, 49: 684-87, 1991.
- MASSON, P.L.; HEREMANS, J.F.; SCHONNE, E. Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. **J. Exp. Med.**, 130: 643-58, 1969.
- MASSON, P.L.; HEREMANS, J.F.; DIVE, CH. An iron-binding protein common to many external secretions. **Clin. Chim. Acta**, 14: 735-39, 1966.

- MATA, L. & GUERRANT, R.L. Magnitude and impact of diarrhoeal disease. **Baillière's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases: international practice and research**, 3(3): 447-62, 1988.
- McKAY, I.; COIA, J. E.; POXTON, I.R. Typing of *Clostridium difficile* causing diarrhoea in an orthopaedic ward. **J. Clin. Pathol.**, 42(5): 511-515, 1989.
- MULLIGAN, M. E.; GEORGE, W. L.; ROLFE, R. D.; FINEGOLD, S. M. Epidemiological aspects of *Clostridium difficile*-induced diarrhea and colitis. **Am. J. Clin. Nutr.**, 33: 2533-38. nov. 1990.
- NAIDU, A.S.; MIEDZOBRODZKI, J.; MUSSER, J.M.; ROSDAHL, V.T.; HEDSTRÖM, S-Å.; FORSGREN, A. Human lactoferrin binding in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **J. Med. Microbiol.**, 34: 323-28, 1991.
- NAIDU, S.S.; ERDEI, J.; CZIRÓK, E.; KALFAS, S.; GADÓ, I.; THORÉN, A.; FORSGREN, A.; NAIDU, A.S. Specific binding of lactoferrin to *Escherichia coli* isolated from human intestinal infections. **APMIS**, 99: 1142-50, 1991.
- NAIDU, S.S.; SVENSSON, U.; KISHORE, A.R.; NAIDU, A.S. Relationship between antibacterial activity and porin binding of lactoferrin in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 37(2): 240-45, 1993.
- NUIJENS, J.H.; ABBINK, J.J.; WACHTFOGEL, Y.T.; COLMAN, R.W.; EERENBERG, A.J.M.; DORS, D.; KAMP, A.J.M.; Van SCHIJNDEL, R.J.M.S; THIJS, L.G.; HACK, C.E.; Plasma elastase α_1 -antitrypsin and lactoferrin in sepsis: evidence for neutrophils as mediators in fatal sepsis. **J. Lab. Clin. Med.**, 119: 159-68, 1992.

- OTNAESS, A.B.K.; MEBERG, A.; SANDE, H.A. Plasma lactoferrin measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Scand. J. Hematol.**, 31: 325-40, 1983.
- PAGE, D.J.; GILBERT, R.J.; BOWEN, W.H.; STEPHEN, K.W. Concentration of antimicrobial proteins in human saliva. **Caries Res.**, 24: 216-19, 1990.
- PICKERING, L.K.; DuPONT, H.L.; OLARTE, J.; CONKLIN, R.; ERICSSON, C. Fecal leukocytes in enteric infections. **Am. J. Clin. Pathol.**, 68: 562-65, 1977.
- PLORDE, J.J. Amebiasis. In: WILSON, J.D.; BRAUNWALD, E.; ISSELBACHER, K.J.; PETERSDORF, R.G.; MARTIN, J.B.; FAUCI, A.S.; ROOT, R.K. **Harrison's Principles of Internal Medicine**, 12. ed., U.S.A.: McGraw-Hill, Inc., 1991. cap. 158, p.778-82.
- PLORDE, J.J. Trichomoniasis and other protozoan infections. In: WILSON, J.D.; BRAUNWALD, E.; ISSELBACHER, K.J.; PETERSDORF, R.G.; MARTIN, J.B.; FAUCI, A.S.; ROOT, R.K. **Harrison's Principles of Internal Medicine**, 12. ed., U.S.A.: McGraw-Hill, Inc., 1991. cap. 167, p.805-07.
- POTHOULAKIS, C.; LaMONT, J. T.; EGLOW, R.; GAO, N.; RUBINS, J.B.; THEOHARIDES, T. C.; DICHEY, B. F. Characterization of rabbit ileal receptors for *Clostridium difficile* toxin A: evidence for a receptor-coupled protein. **J. Clin. Invest.**, 88(1):119-25, 1991.
- POWELL, M.J. & OGDEN, J.E. Nucleotide sequence of human lactoferrin cDNA. **Nucleic Acids Res.**, 18(13): 4013, 1990.
- RAPHAEL, G.D.; DAVIS, J.L.; FOX, P.C.; MALECH, H.L.; GALLIN, J.I.; BARANIUK, J.N.; KALINER, M.A. Glandular secretion of lactoferrin in patient

- OTNAESS, A.B.K.; MEBERG, A.; SANDE, H.A. Plasma lactoferrin measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Scand. J. Hematol.**, 31: 325-40, 1983.
- PAGE, D.J.; GILBERT, R.J.; BOWEN, W.H.; STEPHEN, K.W. Concentration of antimicrobial proteins in human saliva. **Caries Res.**, 24: 216-19, 1990.
- PICKERING, L.K.; DuPONT, H.L.; OLARTE, J.; CONKLIN, R.; ERICSSON, C. Fecal leukocytes in enteric infections. **Am. J. Clin. Pathol.**, 68: 562-65, 1977.
- PLORDE, J.J. Amebiasis. In: WILSON, J.D.; BRAUNWALD, E.; ISSELBACHER, K.J.; PETERSDORF, R.G.; MARTIN, J.B.; FAUCI, A.S.; ROOT, R.K. **Harrison's Principles of Internal Medicine**, 12. ed., U.S.A.: McGraw-Hill, Inc., 1991. cap. 158, p.778-82.
- PLORDE, J.J. Trichomoniasis and other protozoan infections. In: WILSON, J.D.; BRAUNWALD, E.; ISSELBACHER, K.J.; PETERSDORF, R.G.; MARTIN, J.B.; FAUCI, A.S.; ROOT, R.K. **Harrison's Principles of Internal Medicine**, 12. ed., U.S.A.: McGraw-Hill, Inc., 1991. cap. 167, p.805-07.
- POTHOULAKIS, C.; LaMONT, J. T.; EGLow, R.; GAO, N.; RUBINS, J.B.; THEOHARIDES, T. C.; DICHEY, B. F. Characterization of rabbit ileal receptors for *Clostridium difficile* toxin A: evidence for a receptor-coupled protein. **J. Clin. Invest.**, 88(1):119-25, 1991.
- POWELL, M.J. & OGDEN, J.E. Nucleotide sequence of human lactoferrin cDNA. **Nucleic Acids Res.**, 18(13): 4013, 1990.
- RAPHAEL, G.D.; DAVIS, J.L.; FOX, P.C.; MALECH, H.L.; GALLIN, J.I.; BARANIUK, J.N.; KALINER, M.A. Glandular secretion of lactoferrin in patient

OTNAESS, A.B.K.; MEBERG, A.; SANDE, H.A. Plasma lactoferrin measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Scand. J. Hematol.**, 31: 325-40, 1983.

PAGE, D.J.; GILBERT, R.J.; BOWEN, W.H.; STEPHEN, K.W. Concentration of antimicrobial proteins in human saliva. **Caries Res.**, 24: 216-19, 1990.

PICKERING, L.K.; DuPONT, H.L.; OLARTE, J.; CONKLIN, R.; ERICSSON, C. Fecal leukocytes in enteric infections. **Am. J. Clin. Pathol.**, 68: 562-65, 1977.

PLORDE, J.J. Amebiasis. In: WILSON, J.D.; BRAUNWALD, E.; ISSELBACHER, K.J.; PETERSDORF, R.G.; MARTIN, J.B.; FAUCI, A.S.; ROOT, R.K. **Harrison's Principles of Internal Medicine**, 12. ed., U.S.A.: McGraw-Hill, Inc., 1991. cap. 158, p.778-82.

PLORDE, J.J. Trichomoniasis and other protozoan infections. In: WILSON, J.D.; BRAUNWALD, E.; ISSELBACHER, K.J.; PETERSDORF, R.G.; MARTIN, J.B.; FAUCI, A.S.; ROOT, R.K. **Harrison's Principles of Internal Medicine**, 12. ed., U.S.A.: McGraw-Hill, Inc., 1991. cap. 167, p.805-07.

POTHOULAKIS, C.; LaMONT, J. T.; EGLow, R.; GAO, N.; RUBINS, J.B.; THEOHARIDES, T. C.; DICHEY, B. F. Characterization of rabbit ileal receptors for *Clostridium difficile* toxin A: evidence for a receptor-coupled protein. **J. Clin. Invest.**, 88(1):119-25, 1991.

POWELL, M.J. & OGDEN, J.E. Nucleotide sequence of human lactoferrin cDNA. **Nucleic Acids Res.**, 18(13): 4013, 1990.

RAPHAEL, G.D.; DAVIS, J.L.; FOX, P.C.; MALECH, H.L.; GALLIN, J.I.; BARANIUK, J.N.; KALINER, M.A. Glandular secretion of lactoferrin in patient

with neutrophil lactoferrin deficiency. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 84(6): 914-919, 1989.

RAPHAEL, G.D.; JENEY, E.V.; BARANIUK, J.N.; KIM, I.; MEREDITH, S.D.; KALINER, M.A. Pathophysiology of rhinitis: lactoferrin and lysozyme in nasal secretions. **J. Clin. Invest.**, 84: 1528-35, 1989.

RAVDIN, J.I.; WEIKEL, C.S.; GUERRANT, R.L. Protozoal enteropathies: cryptosporidiosis, giardiasis, and amoebiasis. **Baillière's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases**, 3(3): 503-36, 1988.

REY, M.W.; WOLOSHUK, S.L.; BOER, H.A.; PIEPER, F.R. Complete nucleotide sequence of human mammary gland lactoferrin. **Nucleic Acids Res.**, 18(17): 5288, 1990.

ROLFE, R. D. Binding kinetics of *Clostridium difficile* toxins A and B to intestinal brush border membranes from infant and adult hamsters. **Infect. Immun.**, 59(4): 1223-1230, 1991.

RUBINOFF, M.J. & FIELD, M. Infectious diarrhea. **Annu. Rev. Med.**, 42: 403-10, 1991

SACKETT, D.L.; HAYNES, R.B.; TUGWELL, P. A basic science for clinical medicine. In: ---. **Clinical Epidemiology**, U.S.A.: Little, Brown and Company, 1985. cap 4, p.59-138.

SANCHEZ, L.; CALVO, M.; BROCK, J.H. Biological role of lactoferrin. **Arch. Dis. Child.**, 67: 657-661, 1992.

- SAURBORN, M.; von EICHEL-STREIBER, C. Nucleotide sequence of *Clostridium difficile* toxin A. **Nucleic Acids Res.**, 18(6): 1629-1630, feb. 1990.
- SCHORLING, J.B.; McAULIFFE, J.F.; SOUSA, M.A.; GUERRANT, R.L. Malnutrition is associated with increased diarrhoea incidence and duration among children in an urban Brazilian slum. **Int. J. Epidemiol.**, 19(3):728-35, 1990.
- SEDDON, S. V.; HEMINGWAY, I.; BORRIELO, S. P. Hydrolytic enzyme production by *Clostridium difficile* and its relationship to toxin production and virulence in the hamster model. **J. Med. Microbiol.**, 31(3): 169-74, 1990.
- SNYDER, J.D. & MERSON, M.H. The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. **Bull. World Health Organ.**, 64(4): 605-13, 1982.
- SOARES, J.F. & BARTMAN, F.C. **Métodos estatísticos em medicina e biologia**, Brasil, IMPA, 1983, 151p.
- SPEELMAN, P.; McGLAUGHLIN, R.; KABIR, I.; BUTLER, T. Differential clinical features and stool findings in shigellosis and amoebic dysentery. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 81: 549-51, 1987.
- SULLIVAN, P.B.; LUNN, P.G.; NORTHROP-CLEWES, C.; CROWE, P.T.; MARSH, M.N.; NEALE, G. Persistent diarrhea and malnutrition - the impact of treatment on small bowel structure and permeability. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, 14(2): 208-15, 1992.

- SULLIVAN, P.B.; MARSH, M.N.; MIRAKIAN, R.; HILL, S.M.; MILLA, P.J.; NEALE, G. Chronic diarrhea and malnutrition - histology of small intestinal lesion. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, 12(2): 195-203, 1991.
- TABAQCHALI, S. Epidemiologic markers of *Clostridium difficile*. **Rev. Infect. Dis.**, 12(suppl. 2): 192-99, 1990.
- THALER, C.J.; VANDERPUYE, O.A.; McINTYRE, J.A.; FAULK, W.P. Lactoferrin binding molecules in human seminal plasma. **Biol. Reprod.**, 43: 712-17, 1990.
- THOMPSON, A.B.; BOHLING, T.; PAYVANDI, F.; RENNARD, S.I. Lower respiratory tract lactoferrin and lysozyme arise primarily in the airways and are elevated in association with chronic bronchitis. **J. Lab. Clin. Med.**, 115(2): 148-58, 1990.
- TIGYI, Z.; KISHORE, A.R.; MÆLAND, J.A.; FORSGREN, A.; NAIDU, A.S. Lactoferrin-binding proteins in *Shigella flexneri*. **Infect. Immun.**, 60(7): 2619-26, 1992.
- TOMAI, H.; GAGINELLA, T.S.; KACHUR, J.F.; MUSCH, M.W.; CHANG, E.B. Mechanisms of inflammatory diarrhea. **Gastroenterology**, 103(2): 710-11, 1992.
- TORRES, J.; JENNISCHE, E.; LANGE, S.; LONNROTH, I. Enterotoxins from *Clostridium difficile* toxin A; diarrhoeogenic potency and morphological effects in rat intestine. **Gut**, 31(7): 781-85, 1990.
- TUCCARI, G.; BARRESI, G.; ARENA, F.; INFERRERA, C. Immunocytochemical detection of lactoferrin in human gastric carcinomas and adenomas. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, 113(8): 912-15, 1989.

- van de GRAAF, E.A.; OUT T.A.; KOBESSEN, A.; JANSEN, H.M. Lactoferrin and secretory IgA in the bronchoalveolar lavage fluid from patients with a stable asthma. **Lung**, 169: 275-283, 1991.
- van der WAAIJ, D. The ecology of the human intestine and its consequences for overgrowth by pathogens such as *Clostridium difficile*. **Ann. Rev. Microbiol.**, 43: 69-87, 1989.
- VAZ, C.A.C. Interação antígeno-anticorpo in vitro. In: CALICH, V.L.G & VAZ, C.A.C. **Imunologia Básica**, Brasil: Artes Médicas, 1988. cap. 7, p.123-75
- VICTORA, C.G.; HUTTLY, S.R.; FUCHS, S.C.; NOBRE, L.C.; BARROS, F.C. Deaths due to dysentery, acute and persistent diarrhoea among Brazilian infants. **Acta Pædiatr. Suppl**, 381:7-11, 1992.
- WANKE, C.A.; LIMA, A.A.M.; GUERRANT, R.L. Infectious diarrhea in subtropical regions. **Baillière's Clin. Gastroenterol.**, 1(2): 335-59, 1987.
- WICHMANN, L.; VAALASTI, A.; VAALASTI, T.; TUOHIMAA, P. Localization of lactoferrin in the male reproductive tract. **Int. J. Androl.**, 12: 179-86, 1989.
- ZIMMERMAN, R. K. Risk factors for *Clostridium difficile* cytotoxin-positive diarrhea after control for horizontal transmission. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, 12(2): 96-100, 1991.