

Universidade Federal do Espírito Santo – UFES

Núcleo de Doenças Infecciosas

Mestrado em Doenças Infecciosas

Ana Daniela Izoton de Sadovsky

**“AGENTES INFECCIOSOS ASSOCIADOS À DIARRÉIA AGUDA EM
CRIANÇAS ATÉ TRÊS ANOS DE IDADE: ESTUDO EM UM
HOSPITAL DE REFERÊNCIA NO MUNICÍPIO DE VITÓRIA – ES”**

Vitória - Espírito Santo

2005

Ana Daniela Izoton de Sadovsky

“AGENTES INFECCIOSOS ASSOCIADOS À DIARRÉIA AGUDA EM CRIANÇAS ATÉ TRÊS ANOS DE IDADE: ESTUDO EM UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA NO MUNICÍPIO DE VITÓRIA – ES”

Dissertação apresentada ao programa de Pós- Graduação em Doenças Infecciosas do Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientadora : Prof. Dra. Lílíana Cruz Spano

Co-Orientador: Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira

Vitória – Espírito Santo

2005




UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestranda ANA DANIELA IZOTON DE SADOVSKY, apresentou dissertação intitulada: “AGENTES INFECCIOSOS ASSOCIADOS À DIARRÉIA AGUDA EM CRIANÇAS ATÉ TRÊS ANOS DE IDADE: ESTUDO EM UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA NO MUNICÍPIO DE VITÓRIA-ES” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos e a dissertação, a Comissão Examinadora da Dissertação decidiu, aprovar sem restrições, a dissertação e habilitar a médica ANA DANIELA IZOTON DE SADOVSKY, a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória-ES, 14 de outubro de 2005


Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite


Prof. Dr. Mauro Batista de Moraes


Prof. Dra. Liliana Cruz Spano
(Orientadora)

Sadovsky, Ana Daniela Izoton de
Agentes infecciosos associados à diarreia aguda em crianças até três anos de idade: estudo em um hospital de referência no município de Vitória – ES.
Ana Daniela Izoton de Sadovsky. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, Núcleo de Doenças Infecciosas – Centro Biomédico, 2005.
137 f.

Dissertação de Mestrado apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Núcleo de Doenças Infecciosas - NDI.

1. Gastroenterite infantil 2. Diarreia Aguda Infecciosa 3. Enterobactérias 4. Rotavírus
I. Universidade Federal do Estado do Espírito Santo. II. Centro Biomédico. Núcleo de Doenças Infecciosas. III. Título

Ao meu querido Esteban, minhas filhas Isabella e Carolina e meu filho Gabriel, razões de minha felicidade diária.

Aos meus pais Olívio e Lena, razões de minha existência e dedicação aos estudos.

Aos meus sogros Oscar e Martha, razões para meu intenso questionamento e curiosidade.

A todas as mulheres que amam sua profissão e que são mães....

AGRADECIMENTOS

- A minha orientadora, Liliana Cruz Spano, incansável pesquisadora, pela paciência e confiança, além do principal incentivo de meu desenvolvimento nesta área apaixonante da Virologia;
- Ao meu co-orientador e coordenador do Mestrado em Doenças Infecciosas, Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, admirável exemplo desde minha graduação, pelo seu carinho de mestre e oportunidade de aprender a realizar pesquisa;
- Ao Dr. José Paulo Gagliardi Leite, pela viabilização da pesquisa de Rotavirus pelo treinamento em seu laboratório da metodologia EIERA, por todo apoio científico e disponibilização de recursos para finalização do estudo viral;
- À Dra. Sônia Maria de Souza Kitagawa, pela disponibilização de seu material que possibilitou a realização do estudo, além do enriquecimento da discussão sobre os enteropatógenos bacterianos;
- Ao Dr. Reynaldo Dietze, coordenador do Núcleo de Doenças Infecciosas.
- Ao Dr Mauro Batista de Moraes, pelos conhecimentos e apoio desde minha residência médico e, sobretudo, incentivo acerca do tema da minha tese.
- À Dra. Isabel C A. Scaletsky, Universidade Federal do Estado de São Paulo (UNIFESP), pela realização dos testes de hibridização nas amostras enviadas.
- À Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues, Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ – RJ, pela determinação dos sorotipos de Salmonella;
- Ao Sr. Alexandre Madi Fialho, pelos ensinamentos na realização da eletroforese em gel de poliacrilamida na pesquisa do ácido nucléico viral;
- Dra Maria da Penha Herkenhof, laboratório de Microbiologia do LACEN, por reencaminhar kit de Biomanguinhos para detecção de ags de RV e de Ad.
- À Dra. Elizabeth Gobbi, diretora clínica HINSG pelo consentimento da pesquisa;
- Ao Laboratório de Análises Clínicas Quintão Ltda., na pessoa da Dra. Wânia Quintão Coimbra, Unidade do HINSG, que gentilmente auxiliou na obtenção de amostras fecais de pacientes assintomáticos;

- As minhas amigas de trabalho (e de coração) farmacêuticas Ketene W. Saick e Paula N. Segui, sem as quais eu não teria um trabalho tão completo e enriquecedor;
- As minhas queridas técnicas de laboratório Heloisa, Erica e Lia, pela dedicação à minha pesquisa;
- A todos os plantonistas do Pronto socorro do HINSG, que apesar de todo cansaço imposto por um dia exaustivo de trabalho, recebiam-me com sorrisos e boa vontade para que eu continuasse minha pesquisa;
- A todos os funcionários (enfermeiras, técnicas e auxiliares de enfermagem, e outros), sempre dispostos a me auxiliar no Pronto Socorro do HINSG;
- Aos meus pequenos pacientes e seus pais, que possibilitaram a pesquisa;
- Aos meus colegas de mestrado, professores e funcionários do NDI pela torcida;
- À Sra. Fátima Aparecida Pereira, amiga e fiel secretária do Curso de Pós-Graduação em Doenças infecciosas, pelos inúmeros auxílios;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), COLAB/MS e FIOCRUZ pelo suporte financeiro deste trabalho;
- Aos meus amigos que, mesmo não tendo sido mencionados, foram importantes pela amizade e incansável apoio;
- A minha irmã, meus cunhados e cunhadas, aos meus sobrinhos e sobrinha e familiares pelo cuidado com meus filhos quando minha presença não era possível;
- Aos meus pais e sogros, por todos os inúmeros auxílios e sobretudo, pelo amor fraternal e incentivo, tornando possível finalizar mais esta etapa de minha vida;
- Ao meu marido, pela paciência, amor e companheirismo que tornaram minha tarefa um pouco menos cansativa;
- Aos meus filhos, pelo amor, pelo aprendizado diário que me concedem sob todos os aspectos e pela aceitação de minhas incontáveis ausências ao seu lado;
- Ao Senhor, infinitamente bondoso e sábio, que sempre me conduziu durante todos os dias de minha Vida e à Maria, mãe do Céu, que me fez encontrar forças iguais às minhas tarefas.

RESUMO

A diarreia aguda é uma causa importante de mortalidade infantil, nos países em desenvolvimento (OMS). A prevalência de rotavírus (RV), adenovírus (Ad), categorias diarreio gênicas de *E. coli* (DEC), *Salmonella*, *Shigella*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*, foi pesquisada em crianças até 3 anos de idade. De fevereiro de 2003 a junho de 2004, foram obtidas 253 amostras fecais de crianças com diarreia aguda e 78 sem diarreia, atendidas no Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória (HINSG), Vitória – ES. O estudo das bactérias foi feito em 241 amostras fecais (12 excluídas por uso de antimicrobiano) com isolamento de colônias caracterizadas bioquimicamente como *E.coli* em 219 e 68 casos com diarreia e sem diarreia, respectivamente. Estes casos foram submetidos à sorologia com anti-soros polivalentes (EPEC e EIEC) e testes de hibridização (Hibr) para pesquisa de genes de virulência para detecção de EPEC, ETEC, EIEC, EHEC, EAEC e DAEC. RV foram pesquisados em 147 casos por ensaio imunoenzimático (EIERA) e em 230, através da eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), e Ad em 147 casos, por ensaio imunoenzimático (EIERA). Os protozoários foram pesquisados 88 amostras por ensaio Imunoenzimático (EIE). As crianças com diarreia foram divididas em: Grupo I (88 casos = todos os agentes pesquisados), Grupo II (147 casos = bactérias, RV e Ad - EIERA) e Grupo III (230 casos = bactérias e RV - EGPA) e as crianças sem diarreia compuseram o Grupo IV (78 casos = bactérias e RV - EGPA). Mais de 60% das amostras colhidas de crianças com diarreia aguda foram positivas para enteropatógenos, sendo as bactérias, os mais prevalentes, seguidos pelos vírus. DEC foram detectadas em 41,1% dos casos de diarreia aguda: EPEC em 3,6% (sorologia) e 9,1% (Hibr); EPEC típica (0,9 %); EPEC atípica (8,2%); EAEC (9,1%); DAEC (20,6%); EIEC (0,9%); ETEC (4,2%). Nas crianças sem diarreia, detectou-se EPEC (10,3%); EAEC (20,6%); DAEC (16,2%); ETEC (1,5%). EHEC não foi detectada. Nas crianças com diarreia aguda foram detectados *Shigella* (4,6%), *Salmonella* (2,9%), RV em 35,2% (EGPA) e 50% (EIERA); Ad (8,2%) e *E. histolytica* (8%), *Cryptosporidium* spp. (11,4%) e *G. lamblia* (14,8%). Concluindo, EPEC típica, EIEC e ETEC foram detectadas apenas ou predominantemente nas crianças com diarreia. EPEC atípica, EAEC e DAEC não estiveram relacionadas com diarreia aguda, exceto

EAEC nas crianças acima dos dois anos de idade ($p = 0,026$). RV foi agente infeccioso mais prevalente considerando somente DEC classicamente patogênicas (EPEC típica, ETEC, EIEC, Shigella e Salmonella), nos menores de 18 meses de vida e nos meses de março a setembro de 2003. As associações entre enteropatógenos foram freqüentes, sendo os protozoários, o grupo de enteropatógenos com o maior número de associações. Dos protozoários avaliados, apenas *G. lamblia* parece ser agente etiológico isolado de diarréia aguda.

ABSTRACT

Acute diarrhea is one of the main causes of infantile mortality worldwide (WHO), mainly in developing countries. In the present work, the prevalence of Rotavirus (RV), adenovirus (Ad), diarrheogenic *E. coli* (EPEC, ETEC, EIEC, EHEC, EAEC, DAEC), *Salmonella*, *Shigella*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* was studied among children up to 3 years old with acute diarrhea. From February 2003 to June 2004, stools samples were obtained prospectively from 253 children with acute diarrhea and 78 without diarrhea attending to the emergency room in a pediatric hospital - Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória (HINSG), in Vitória – Espírito Santo state, Brazil. Bacterial detection was done in 241 stools samples (12 were excluded because were in use of antimicrobial drugs) and *E. coli* were isolated in 219 and 68 cases with and without diarrhea, respectively. These cases were submitted to serology with policlonal anti-seros (EPEC e EIEC) and hybridization tests (Hybr) to detect virulence genes of EPEC, ETEC, EIEC, EHEC, EAEC e DAEC. RV were studied in 147 cases for immune enzymatic assay (EIARA) and in 230 cases by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and Ad, only in 147 cases for immune enzymatic assay (EIARA). Protozoan infection was studied in 88 cases for immune enzymatic assay (EIA). Children with diarrhea were divided in Group I (88 cases = all enteropathogens studied), Group II (147 cases = bacterias, RV e Ad - EIARA) and Group III (230 cases = bacterias and RV - PAGE) and children without diarrhea were Group IV (78 cases = bacterias and RV - PAGE). Enteropathogens were detected in more than 60% in children with acute diarrhea and bacterial infection was the most prevalent: DEC were detected in 41,1%; EPEC in 3,6% (serology) e 9,1% (Hybr); Typical EPEC (0,9%); Atypical EPEC (8,2%); EAEC (9,1%); DAEC (20,6%); EIEC (0,9%); ETEC (4,2%). In stools samples from children without diarrhea, we found Atypical EPEC (10,3%); EAEC (20,6%); DAEC (16,2%); ETEC (1,5%). EHEC was not detected in the studied population. *Shigella* and *Salmonella* were detected in 4,6% e 2,9%, respectively, only in children with acute diarrhea. RV were detected in 35,2% (GEPa) and 50% (EIARA); Ad, in 8,2% and *E. histolytica*, *Cryptosporidium* spp. and *G. lamblia* in 8%, 11,4% and 14,8% of cases with diarrhea, respectively. In conclusion, Typical EPEC, EIEC and ETEC were detected only or predominantly in children with

acute diarrhea. Atypical EPEC, EAEC and DAEC were not causes of acute diarrhea, except for EAEC in children more than two years old ($p = 0,026$). RV was the most prevalent agent when the classic enteropathogen DEC (Typical EPEC, ETEC, EIEC and Shigella e Salmonella) was considered in this study. RV was more frequent in children below 18 months of life and in a period of March, 2003 up September, 2003. Associations among enteropathogens were frequent in the studied population and protozoa were the most of them. Comparing all of protozoa detected, only *G. lamblia* suggesting being a cause of acute diarrhea, isolately.

Listas de Abreviaturas

Ac – Anticorpos
Ad – Adenovirus
Ag - Antígenos
BFP - *bundle-forming pilus*
BM - banho Maria
DAEC - *E. coli* de adesão difusa
DEC –*E. coli* diarreio gênica
DO - densidade ótica
EAEC - *E. coli* enteroagregativa
EAF - EPEC Adherence Factor
EGPA - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
EHEC - *E. coli* enterohemorrágica
EIEC - *E. coli* enteroinvasora
EIERA - Ensaio Imunoenzimático para RV e Ad
EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica clássica
ETEC - *E. coli* enterotoxigênica
HINSG - Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória
IV – Intravenosa
LEE – *locus enterocyte effacement*
LT - enterotoxina termolábil
min. - minutos
OMS - Organização Mundial da Saúde/WHO – World Health Organization
OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde
PS - Pronto Socorro
RNA df – RNA de dupla fita
RV – Rotavírus
s. - segundos
SHU – Síndrome Hemolítica Urêmica
ST - enterotoxina termoestável
TA - temperatura ambiente
TMB - cromógeno tetrametilbenzidina
UFES – Universidade Federal do Espírito Santo
UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo

LISTA DE DIAGRAMAS, FIGURAS, GRÁFICOS, TABELAS E QUADROS

Diagramas:	Página
Diagrama 1: Associação inter e intracategorias de patógenos detectados em 88 amostras fecais de diarréia aguda (Grupo I)	71
Diagrama 2: Associação entre bactérias, RV e Ad detectados em 147 amostras fecais de diarréia aguda (Grupo II)	72
Diagrama 3: Associação entre bactérias e RV detectados em 230 amostras fecais de diarréia aguda (Grupo III)	73
Figuras:	
Figura 1: Distribuição das 331 amostras fecais colhidas de acordo com seu fracionamento para detecção dos enteropatógenos	42
Figura 2: Sumário dos procedimentos realizados para detecção bacteriana nas 331 amostras colhidas	43
Figura 3: Distribuição dos casos de diarréia aguda e sem diarréia de acordo com a pesquisa simultânea de enteropatógenos	50
Figura 4: Mapa da região metropolitana da Grande Vitória demonstrando a localização dos municípios que a compõem: Vitória, Vila Velha, Serra, Cariacica e Viana com o respectivo número de amostras colhidas	52
Figura 5: A) Agar McConkey com col. Lac (+) e Lac (-) de <i>E. coli</i> ; B) Transferência das colônias Lac (+) e Lac (-) para membrana de nitrocelulose; C) Membrana de nitrocelulose com amostras positivas e negativas para fermentação de lactose. Sequência superior e inferior correspondem, respectivamente, a filtros não tratados e tratados com solução de lise bacteriana; D) Hibridização em membrana após revelação. Resultado positivo com sonda genética para o plasmídeo EAF (EPEC típica) pode ser observado em duas amostras no disco central inferior. Controle positivo e negativo para a referida sonda se encontra no quadrado central. Fotos obtidas no Laboratório de Microbiologia da Dra. Isabel C. Scaletsky (UNIFESP)	60
Figura 6: Eletroferotipos de RNAdf do RV após EGPA corado pela impregnação pela prata. Colunas 1-3 e 6: padrão 4-2-3-2; Coluna 4: amostra	67

negativa; Coluna 5: genoma com rearranjo 5-1-3-2

Gráficos:

Gráfico 1: Número total de consultas por gastroenterite aguda e de amostras fecais obtidas de crianças menores de três anos atendidas no Pronto Socorro do HINSG no período de 2003 a 2004	40
Gráfico 2: Distribuição da idade das crianças com diarréia aguda estudadas. Estão representados os percentis 25 (6 meses) e 75 (18 meses) e a mediana de 11 meses	53
Gráfico 3: Tempo de aleitamento materno exclusivo nas crianças com diarréia aguda	54
Gráfico 4: Época de introdução de outros alimentos (leites e alimentos sólidos) nos primeiros seis meses de vida das crianças com diarréia aguda	55
Gráfico 5: Amostras positivas e negativas para diversas categorias de DEC pesquisadas em crianças com e sem diarréia aguda	63
Gráfico 6: Correlação das amostras positivas para RV, <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , ETEC, EIEC e EPEC típica com as estações dos anos de 2003 e de 2004	65
Gráfico 7 – Distribuição dos casos positivos para RV (EIERA e EGPA) e de diarréia aguda nos menores de três anos conforme meses do período estudado	66
Gráfico 8: Distribuição do número total de amostras colhidas e de amostras positivas para RV de acordo com os municípios	68
Gráfico 9: Distribuição mensal dos casos de diarréia aguda positivos para RV e variações da temperatura média, número de dias de chuva, no período de fevereiro de 2003 a junho de 2004	69
Gráfico 10: Número total de amostras positivas para <i>Cryptosporidium</i> , <i>E. histolytica</i> e <i>G.lambliá</i> e suas associações com bactérias e vírus (RV e Ad) identificados nas amostras fecais de crianças com diarréia aguda	71

Tabelas:

Tabela 1a: Prevalência de enteropatógenos por grupos, identificados isoladamente ou associados, em crianças com diarréia aguda, de acordo com algumas variáveis relacionadas com a idade, hábitos e condições de vida, alguns sinais e sintomas e terapia de hidratação IV. Grupo I – os três agentes pesquisados	56
Tabela 1b: Prevalência de enteropatógenos por grupos, identificados isoladamente ou associados, em crianças com diarréia aguda, de acordo com algumas variáveis relacionadas com a idade, hábitos e condições de vida, alguns sinais e sintomas e terapia de hidratação IV. Grupo II – bactérias, RV e Ad (EIERA) pesquisados	57
Tabela 1c: Prevalência de enteropatógenos por grupos, identificados isoladamente ou associados, em crianças com diarréia aguda, de acordo com algumas variáveis relacionadas com a idade, hábitos e condições de vida, alguns sinais e sintomas e terapia de hidratação IV. a - Grupo I – os três agentes pesquisados; b - Grupo II – bactérias, RV e Ad (EIERA) pesquisados; c -	58
Tabela 2: Agentes patógenos e possivelmente patógenos bacterianos em amostras fecais de crianças com e sem diarréia aguda	62
Tabela 3: Distribuição de categorias de <i>Escherichia coli</i> (EPEC atípica e típica, ETEC, EAEC e DAEC) de acordo com a estratificação de idade em crianças com e sem diarréia aguda	63
Tabela 4: Identificação de amostras positivas para <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> correlacionadas com a faixa etária de 241 crianças com diarréia aguda	64
Tabela 5: Agentes enteropatogênicos virais detectados em amostras fecais de crianças com diarréia aguda	65
Tabela 6: Distribuição das amostras positivas para RV e Ad por EIERA (Grupo II) e para RV por EGPA (Grupo III) de acordo com faixa etária das crianças com diarréia aguda	68
Tabela 7: Antígenos de protozoários detectados em 88 amostras fecais de crianças com diarréia aguda (Grupo I) através do EIE para <i>G. lamblia</i> ,	70

E.histolytica e *Cryptosporidium* spp.

Tabela 8: Amostras positivas para protozoários de acordo com a faixa etária das 88 crianças com diarréia aguda (Grupo I) 70

Tabela 9: Sinais e sintomas clínicos das crianças com diarréia aguda 74

Tabela 10: Sinais e sintomas clínicos das crianças com diarréia aguda em amostras positivas para *Shigella*, *Salmonella* e DEC 76

Tabela 11: Sinais e sintomas clínicos das crianças com diarréia aguda nas amostras positivas com RV (EGPA e EIERA), Ad (EIERA) e associação de ambos (EIERA) 77

Tabela 12: Sinais e sintomas clínicos das crianças com diarréia aguda em amostras positivas para *Cryptosporidium* ou *E. histolytica* ou *G. lamblia* 78

Quadros

Quadro 1. Anti-soros utilizados na confirmação e/ou triagem de bactérias patógenas intestinais 45

Quadro 2. Sondas genéticas específicas para as categorias de DEC 45

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1. CONCEITOS BÁSICOS SOBRE DIARRÉIA E PRINCIPAIS FATORES DE RISCO	23
2.2. ETIOLOGIA INFECCIOSA DAS DIARRÉIAS	24
3. OBJETIVOS	37
3.1. OBJETIVOS GERAIS	38
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. TIPO DE ESTUDO E LOCAL	40
4.2. AMOSTRAGEM	41
4.3. COLETA DOS DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS	41
4.4. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	42
4.5. COLETA, ARMAZENAMENTO E PROCESSAMENTO DAS FEZES	42
4.5.1. Detecção de bactérias	43
4.5.1.1. Caracterização bioquímica e identificação de enterobactérias	44
4.5.1.1.1. <i>Escherichia coli</i>	44
4.5.1.1.2. <i>Shigella</i> e <i>Salmonella</i>	46
4.5.2. Detecção de vírus	46
4.5.2.1. Preparo de suspensões fecais	46
4.5.2.2. Ensaio Imunoenzimático para Rotavírus e Adenovírus (EIERA)	47
4.5.2.3. Extração de RNA	47
4.5.2.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA)	48

4.5.3. Detecção de protozoários	48
4.5.3.1. Ensaio Imunoenzimático para <i>Cryptosporidium</i> spp., <i>Entamoeba histolytica</i> e <i>Giardia lamblia</i> (EIE)	49
4.5.4 Detecção de mais de um enteropatógeno nas amostras fecais	49
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
5. RESULTADOS	51
5.1. DADOS DEMOGRÁFICOS	52
5.2. AGENTES INFECCIOSOS NA AMOSTRA ESTUDADA	58
5.2.1. Bactérias	59
5.2.1.1. <i>E. coli</i> diarreiogênica (DEC)	59
5.2.1.1.1. Sorologia para DEC	59
5.2.1.1.2. Testes de Hibridização para pesquisa de genes de virulência de DEC	60
5.2.1.2. <i>Shigella</i> e <i>Salmonella</i>	64
5.2.2. Vírus	65
5.2.2.1 EIERA	65
5.2.2.2 EGPA	66
5.2.3. Protozoários	70
5.2.4. Associações entre bactérias, vírus e protozoários	71
5.2.5. Quadro clínico das crianças com diarréia e associação com dados sócio-demográficos	74
6. DISCUSSÃO	79
6.1. CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA ESTUDADA	80
6.2. ENTEROPATÓGENOS DETECTADOS	81

6.3. BACTÉRIAS	82
6.4. VÍRUS	89
6.5. PROTOZOÁRIOS	94
7. CONCLUSÕES	98
8. PERSPECTIVAS	101
9. TRABALHOS APRESENTADOS	103
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
11. ANEXOS	126
Anexo 1: Carta de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do Centro Biomédico - UFES	127
Anexo 2: Ficha de dados clínico-epidemiológicos	128
Anexo 3: Termo de consentimento livre e esclarecido	129
Anexo 4: Procedimentos realizados nas amostras fecais colhidas em Vitória – ES	130
Anexo 5: Meios de Cultura e Soluções usadas:	131
1. Meios de cultura para isolamento e caracterização bioquímica das bactérias	131
2. Soluções e reagentes utilizados para detecção dos RV	133
Anexo 6: Organograma resumindo o destino das amostras fecais após coleta	136

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O trato gastrintestinal, com sua grande superfície, representa um importante alvo para agentes infecciosos que, uma vez conseguindo suplantar as condições adversas à sua colonização, desenvolverão um processo infeccioso que pode se traduzir em uma diarreia (Tomar, 2001).

As doenças diarreicas são comuns na infância e se encontram associadas à importante morbidade e mortalidade, sobretudo nos menores de três anos de idade. As diarreias apresentam diversas causas, mas as de natureza infecciosa são as mais frequentes, principalmente nos países em desenvolvimento (Snyder & Merson, 1982; Guandalini, 2000; Carré *et al.*, 2001; Casburn-Jones *et al.*, 2004). Estima-se que ocorram 1,5 bilhões de episódios de diarreia por ano em crianças menores de cinco anos e que destes, resultem de 1,7 a 3 milhões de mortes a cada ano, no mundo (Parashar *et al.*, 2003 a, b).

O Brasil ocupa o sexto lugar em números de mortes infantis em menores de cinco anos com índices de 42 mortes/1000 nascidos vivos (OMS, 2002), sendo as doenças diarreicas responsáveis pelo segundo lugar quando relacionadas a causas específicas de mortalidade infantil (OPAS, 2002). Em 1997, Szwarcwald *et al.* demonstraram diferença significativa de coeficientes de mortalidade infantil e de mortalidade proporcional por diarreia em diferentes regiões brasileiras com variações de 5,1% no Rio Grande do Sul até 27,6% no Ceará relacionados ao coeficiente de mortalidade proporcional por diarreia de acordo com indicadores de saúde por unidade de federação (1991). Esta diferença poderia ainda ser maior, decorrente de índices subestimados nas áreas com grandes percentuais de mortes por causas não definidas. Estados considerados com maior nível de desenvolvimento, como Santa Catarina e Paraná, ainda apresentaram altas proporções de óbitos por diarreia, de 9,2% e 13,7, respectivamente. No Espírito Santo, o coeficiente de mortalidade proporcional por diarreia nos menores de cinco anos apresentou queda importante de 8,67% (1990) para 2,36% (2000), chegando atualmente a 2,71 % (2002) (DATASUS, 2004).

Nos diversos estados brasileiros, a diarréia é uma queixa freqüente em consultas nos pronto-socorros e ambulatórios da rede de saúde pública municipal e estadual. A desidratação é responsável por um grande número de internações hospitalares e de alto custo para o município ou para o estado (Ribeiro, 2000). Sabe-se que a população que usufrui da rede do Sistema Único de Saúde, de baixo nível sócio-econômico, tem um maior risco de adoecimento por diarréia com conseqüentes agravos nutricionais e morte, sobretudo, crianças oriundas de famílias que vivem em situação de pobreza e miséria (Toporovski *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2002).

Com relação à etiologia infecciosa da diarréia, é descrita uma importante associação de pobreza e de higiene precária com presença de agentes infecciosos, agravada pela introdução precoce de alimentos administrados através de mamadeiras em detrimento ao leite materno (Elegbe *et al.*, 1982; Feachem, 1984; Esrey *et al.*, 1985; Tomasi *et al.*, 1994). No Brasil, vários relatos descrevem a *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC) como o mais importante agente bacteriano causador de diarréia aguda, em especial nos menores de um ano de idade, causando transtornos nutricionais e morte nos menores de seis meses (Guerrant *et al.*, 1983; Scaletsky *et al.*, 1984, 1999; Trabulsi *et al.*, 1988, 2002; Kitagawa *et al.*, 1989; Andrade *et al.*, 1999; Fagundes-Neto & Andrade, 1999; Fagundes-Neto & Scaletsky, 2000; Souza *et al.*, 2002). O agente infeccioso viral mais importante é o rotavírus (RV) (Linhares *et al.*, 1977, 1994; Toporovski *et al.*, 1999; Fernandes *et al.*, 2000; Linhares, 2000; da Rosa e Silva *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2002, Cardoso *et al.*, 2003) sabidamente associado com diarréia grave e com altas taxas de internação hospitalar (Kapikian *et al.*, 2001; Parashar *et al.*, 2003 a, b). Os protozoários mais envolvidos com diarréias em crianças são: i) *Cryptosporidium* spp., ii) *Giardia lamblia* e iii) *Entamoeba histolytica*, sendo os dois últimos mais implicados com diarréia persistente (Cordell & Addiss, 1994; Gennari-Cardoso *et al.*, 1996; Marshall *et al.*, 1997; Newman *et al.*, 1999, 2001; Toporovski *et al.*, 1999; Orlandi *et al.*, 2001; Scaletsky *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2002).

Estudos regionais sobre a etiologia das diarréias são importantes para o planejamento de ações preventivas e terapêuticas. No Espírito Santo não há publicações sobre a etiologia das diarréias infantis, especialmente as de causa infecciosa. Então, o objetivo desta pesquisa foi investigar, durante 17 meses, os

diversos agentes infecciosos de natureza bacteriana, viral e parasitária, nas amostras fecais de crianças de até três anos de idade, atendidos com queixa de diarréia aguda em um hospital de referência, que atende à população de baixa renda, na região metropolitana da Grande Vitória, Espírito Santo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. CONCEITOS BÁSICOS SOBRE DIARRÉIA E PRINCIPAIS FATORES DE RISCO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) conceitua “diarréia” como uma alteração de hábito intestinal caracterizada por aumento do número de evacuações e/ou diminuição da consistência das fezes devido à presença de água e eletrólitos. Sob o ponto de vista clínico, ela pode ser classificada em: i) “diarréia aguda”, de início abrupto e duração máxima de 14 dias, potencialmente autolimitada; ii) “diarréia persistente”, que ultrapassa 15 dias de duração, freqüente em lactentes com desnutrição e; iii) “diarréia crônica”, com duração superior a 30 dias; iv) “disenteria”, com presença de sangue associado a muco e/ou pus.

Os principais fatores de risco para ocorrência das diarréias são:

a) Ausência de Amamentação: o risco de óbito por diarréia para crianças desmamadas é 14,2 vezes maior do que o de crianças em aleitamento materno sem outros suplementos lácteos. A simples introdução de água e chás está associada a um aumento significativo na morbidade e mortalidade de lactentes (Victora *et al.*, 1987). Escuder *et al.* (2003) demonstraram que a amamentação foi um dos principais fatores de redução significativa das principais causas de óbito em São Paulo, como a pneumonia e a diarréia. Também foi observado em crianças menores de três meses, com aleitamento misto ou em uso exclusivo de leite de vaca, risco de adoecimento por diarréia 4,1 e 15,1 vezes maior, respectivamente, do que nas com aleitamento materno exclusivo. Além da proteção contra a infecção, crianças em aleitamento materno exclusivo, que apresentam diarréia aguda, têm uma probabilidade de 16,7 vezes menor de evoluir para diarréia persistente, evitando os agravos nutricionais conseqüentes deste processo (Victora *et al.*, 1987; Sazawal *et al.*, 1992; Long *et al.*, 1999; Betrán *et al.*, 2001; Fuchs & Victora, 2002; Escuder *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2003; Newburg *et al.*, 2005)

b) Ausência de água tratada, de saneamento ou higiene: os hábitos de higiene doméstica e pessoal estão intimamente ligados à disponibilidade de água potável, correspondendo a uma redução de 20% a 30% na morbidade e mortalidade por diarréia (Feachem, 1984; Esrey *et al.*, 1985). A lavagem das mãos é o componente de higiene pessoal que mantém maior relação com a redução da incidência de diarréia (Feachem, 1984; Esrey *et al.*, 1985; Barros *et al.*, 1999 a, b; Vazquez *et al.*, 1999; Lins & Silva, 2000; Curtis, 2001; Leclerc *et al.*, 2002);

c) Prematuridade e ausência de realização de pré-natal: as crianças nascidas antes de 37 semanas de gestação (prematuros) têm risco duas vezes maior de apresentarem episódios de diarréia do que aquelas nascidas a termo. Além disso, em São Paulo, Waldman *et al.* (1997) encontraram um risco três vezes maior e a incidência mais alta de gastroenterites no grupo de filhos de mães que não fizeram o pré-natal, apesar do nascimento a termo. Neste grupo, a mortalidade infantil por diarréia também foi duas vezes maior, mesmo após levar em conta as diferenças sócio-econômicas da população estudada (Waldman *et al.*, 1997; Fuchs & Victora, 2002);

d) Desnutrição proteico-energética: a relação entre estado nutricional e diarréia é complexa, mas a incidência de diarréia é maior, os episódios são mais graves nas crianças desnutridas, com maior letalidade e repercussão importante no seu desenvolvimento (Black *et al.*, 1987; Fagundes-Neto & Andrade, 1999; Lins & Silva, 2000; Moore *et al.*, 2001).

2.2 ETIOLOGIA INFECCIOSA DAS DIARRÉIAS

Nos últimos anos, avanços foram alcançados no reconhecimento de novos agentes etiológicos causadores de diarréia aguda, assim como na elucidação dos mecanismos pelos quais as infecções entéricas produzem efeitos disabsortivos. O emprego de técnicas laboratoriais biomoleculares de detecção rápida, como a soroaglutinação em látex e o ensaio imunoenzimático, resultaram na identificação de patógenos intestinais em até 84% dos casos de crianças e adultos com doença diarréica aguda (Guerrant *et al.*, 1985; Gomes *et al.*, 1989, 1991; Prado & O’Ryan,

1994; Scaletsky *et al.* 1999, 2002 a, b; Trabulsi *et al.*, 2002). O conhecimento da etiologia da diarréia infecciosa pode levar a intervenção terapêutica precoce, prevenindo a desidratação (Larrosa-Haro *et al.*, 2001).

2.2.1 Bactérias

Uma ampla variedade de patógenos é descrita como causa de diarréia, sendo eles de natureza bacteriana, viral ou parasitária. Dentre os patógenos intestinais bacterianos mais importantes temos: i) Categorias diarreiogênicas de *Escherichia coli* (DEC); ii) *Shigella*; iii) *Salmonella*; iv) *Campylobacter*; v) *Yersinia enterocolitica*; vi) *Vibrio*; vii) *Aeromonas*.

As *E. coli* são os microrganismos anaeróbios facultativos predominantes na microbiota colônica humana. Esta bactéria coloniza o trato gastrointestinal do lactente em poucas horas após o nascimento e mantém uma relação de benefício mútuo com o seu hospedeiro. Algumas cepas estão envolvidas com infecções extra-intestinais, e outras, comumente não associadas à microbiota normal, no próprio trato gastrointestinal. As três principais síndromes clínicas resultantes de infecções produzidas por *E. coli* são: i) infecção do trato urinário, ii) sepse ou meningite e iii) doença diarreica.

As *E. coli* que acometem o trato gastrointestinal são de particular importância em saúde pública e são denominadas *E. coli* diarreiogênicas (DEC). São descritas seis categorias de DEC: i) *E. coli* enteropatogênica (EPEC), ii) *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), iii) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), iv) *E. coli* enteroinvasora (EIEC), v) *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e vi) *E. coli* de adesão difusa (DAEC) (Nataro & Kaper, 1998).

A EPEC é uma categoria diarreiogênica importante nos países em desenvolvimento, com maior prevalência em crianças de até dois anos, sobretudo nos menores de 12 meses (Guerrant *et al.*, 1983, 1986; Gomes *et al.*, 1991; Prado & O’Ryan, 1994; Kaper, 1996; Fagundes-Neto & Scaletsky, 2000; Torres *et al.*, 2001).

No Brasil, a EPEC é o mais importante agente bacteriano causador de diarréia aguda nas crianças menores de cinco anos e detectadas em 20 a 40% dos casos, com tendência à redução de sua prevalência nos últimos anos. É um enteropatógeno implicado como um fator de risco importante para diarréia de maior duração (diarréia persistente), com maiores índices de hospitalização e de mortes Fagundes-Neto & Scaletsky (2000) relataram 42% de EPEC numa população constituída na sua maioria por pacientes menores de 12 meses e hospitalizados. (Guerrant *et al.*, 1983; Queiroz *et al.*, 1987; Trabulsi *et al.*, 1988, 2002; Gomes *et al.*, 1989, 1991; Kitagawa *et al.*, 1989; Stewien *et al.*, 1993; Scaletsky *et al.*, 1999, 2002 b; Oliva *et al.*, 1997; Andrade *et al.*, 1999; Fagundes-Neto & Andrade, 1999 Toporovski *et al.*, 1999; Fagundes-Neto & Scaletsky, 2000; Medeiros *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2002; Orlandi *et al.*, 2003).

Com relação ao mecanismo de patogenicidade da EPEC, Donnenberg & Kaper (1992) propuseram um modelo que consiste em três etapas: i) aderência localizada, (ii) transdução de sinal e (iii) aderência íntima. Elas promovem uma lesão conhecida como A/E (*attaching and effacing*), com achatamento das microvilosidades intestinais, aderência íntima das bactérias ao epitélio intestinal e agregação polarizada de actina, com conseqüente comprometimento da capacidade absorptiva e digestiva (Nataro & Kaper, 1998).

A EPEC pode ser classificada em “típica” e “atípica”, de acordo com a presença ou ausência do plasmídio EAF (EPEC *Adherence Factor*), respectivamente. A EPEC típica apresenta um padrão de colonização, em cultura de células HEp-2, denominado de “aderência localizada”, determinada pela presença de uma fímbria denominada BFP (*bundle-forming pilus*), codificada pelo referido plasmídio. Esta EPEC é classicamente descrita associada à doença diarreica em crianças menores de um ano, sobretudo nos países em desenvolvimento (Cravioto *et al.*, 1990; Nataro & Kaper, 1998; Scaletsky *et al.* 1999; Trabulsi *et al.*, 2002; Dulguer *et al.*, 2003). EPEC atípica, reconhecida como categoria em 1995 no Segundo Simpósio Internacional sobre EPEC (Kaper, 1996; Nataro & Kaper, 1998), é caracterizada pela ausência do plasmídeo que codifica a fímbria BFP e por apresentar um padrão de aderência semelhante à localizada. Tanto a EPEC típica quanto a atípica, apresentam a ilha de patogenicidade cromossômica LEE (*Locus enterocyte effacement*), responsável pela transdução de sinais e achatamento de vilosidades

intestinais. Após a década de 90, a EPEC atípica tem sido demonstrada com maior frequência nas fezes diarréicas de crianças em países desenvolvidos, em relação à EPEC típica (Scotland *et al.*, 1996; Afset *et al.*, 2003; Beutin *et al.*, 2003; Robins-Browne *et al.*, 2004). No Brasil, o papel desta categoria de EPEC na diarréia aguda ainda não está bem estabelecido (Scaletsky *et al.* 1999; Trabulsi *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2004).

As ETEC caracterizam-se pela expressão de fatores de colonização, coletivamente denominados de CFs, que permitem sua aderência em epitélio do intestino delgado, e pela produção de enterotoxinas termoestável (ST) e/ou termolábil (LT) que estimulam intensa secreção intestinal. São agentes etiológicos de diarréia aguda em crianças e adultos, sendo os principais responsáveis pela diarréia dos viajantes (Nataro & Kaper, 1998). No Brasil, sua prevalência variou de zero a 27,4% de amostras diarréicas em crianças (Guerrant *et al.*, 1983; Queiroz *et al.*, 1987; Leal *et al.*, 1988; Kitagawa *et al.*, 1989; Gomes *et al.*, 1991; Mangia *et al.*, 1993; Stewien *et al.*, 1993; Guth *et al.*, 1994; Almeida *et al.*, 1998; Toporovski *et al.*, 1999; Fagundes Neto & Scaletsky, 2000; Orlandi *et al.*, 2001; Scaletsky *et al.*, 2002 b, c; Souza *et al.*, 2002). Apesar de serem importantes agentes infecciosos intestinais em países em desenvolvimento, como o Brasil, não são pesquisadas em laboratório de rotina diagnóstica.

As EHEC foram descritas em 1983, após um surto de colite hemorrágica nos EUA com isolamento da *E. coli* sorotipo O157:H7 (Riley *et al.*, 1983; Wells *et al.*, 1983) e, concomitantemente, como agente etiológico da Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) em crianças (Karmali *et al.*, 1983). A citotoxicidade provocada nos enterócitos humanos por este patógeno, também foi demonstrada em culturas de células Vero justificada pela presença da citotoxina denominada Stx1 e Stx2 (*Shiga-like toxin*), homóloga à produzida pela espécie *Shigella dysenteriae*. A lesão A/E também é observada nas EHEC, que assim como a EPEC, também apresenta a região cromossômica LEE (Nataro & Kaper, 1998).

As EIEC são caracterizadas, dentre outros critérios, pela invasão de células epiteliais colônicas. Produzem enterotoxina denominada EIET, que é responsável pela diarréia aquosa inicial precedendo a evolução clássica para disenteria (Nataro & Kaper, 1998).

A EHEC e EIEC são pouco freqüentes no Brasil, sendo encontradas em menos de 2% dos casos de diarréia aguda em crianças (Gomes *et al.*, 1991; Stewien *et al.*, 1993; Almeida *et al.*, 1998; Toporovski *et al.*, 1999; Fagundes-neto & Scaletsky, 2000; Medeiros *et al.*, 2001; Orlandi *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2002; Régua - Mangia *et al.*, 2004).

A observação de diferentes padrões de aderência em culturas de células HEp-2 ou HeLa das EPEC serviu como base para o reconhecimento de duas outras categorias de *E. coli* diarregênicas: EAEC e DAEC (Cravioto *et al.*, 1979). As EAEC apresentam um padrão denominado de aderência agregativa, caracterizado pela disposição de células bacterianas como “tijolos empilhados”, enquanto que as DAEC, pelo padrão de aderência difuso, caracterizado pela dispersão das bactérias sobre toda a superfície epitelial (Cravioto *et al.*, 1979; Scaletsky *et al.*, 1984; Nataro *et al.*, 1985; Nataro & Kaper, 1998).

O estudo da EAEC em modelos animais demonstra uma aderência aos enterócitos associada a um aumento na produção de muco seguida de dano celular pela produção de uma citotoxina (EAST). Classicamente, EAEC é associada a quadros de diarréia persistente, mas também tem sido identificada em crianças com diarréia aguda (Lima *et al.*, 1992; Fang *et al.*, 1995; Bardhan *et al.*, 1998; Nataro & Kaper, 1998; Scaletsky *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2000; Fagundes-Neto *et al.*, 2000; Scaletsky *et al.*, 2001, 2002c). A DAEC, por outro lado, foi identificada tanto em fezes de crianças assintomáticas quanto naquelas com diarréia aguda (Albert *et al.*, 1999; Scaletsky *et al.*, 2001). Mas, uma susceptibilidade idade-dependente tem sido observada, sendo a DAEC mais prevalente em crianças acima de 2 anos do que em lactentes com diarréia aguda (Gomes *et al.*, 1989; Gunzburg *et al.*, 1993; Levine *et al.*, 1993; Nataro & Kaper, 1998; Scaletsky *et al.*, 1999, 2002 b). Ainda que identificada nestes casos, a DAEC necessita de maiores estudos para a definição de sua importância como agente etiológico de diarréia infantil, assim como para elucidação de sua patogênese. Tanto EAEC como DAEC, não são detectadas pelos procedimentos de rotina em laboratórios de análises clínicas.

O gênero *Shigella* é constituído por quatro espécies, todas patógenas intestinais: *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei* e *S. dysenteriae*. Causam a disenteria bacilar, caracterizada por diarréia muco-piossanguinolenta com intensa resposta inflamatória, proveniente da invasão e destruição da camada epitelial da mucosa do

intestino grosso. São importantes patógenos pela gravidade do quadro intestinal e por apresentarem dose infecciosa muito baixa (Goosney *et al.*, 1999; Campos, 2004). No Brasil, a espécie predominante é a *S. flexneri* seguida pela *S. sonnei* (Kitagawa *et al.*, 1989; Gomes *et al.*, 1991; Stewien *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 1997; Orlandi *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2002).

O gênero *Salmonella* é constituído por duas espécies: *S. enterica*, dividida em seis subespécies, e *S. bongori*. Existem atualmente mais de 2500 sorotipos de *Samonella*; 1478 pertencentes à *S. enterica* subespécie I que corresponde a 99,5% dos sorotipos mais comumente isolados. Alguns sorotipos são mais restritos a seus hospedeiros, enquanto outros são capazes de infectar diversos animais (Campos, 2004). A *S. Typhi* é adaptada e restrita ao ser humano, enquanto a *S. Typhimurium* causa gastroenterite ou septicemia no homem, diarréia letal em bovinos, ou ainda, uma doença sistêmica em camundongos geneticamente susceptíveis (Campos, 2004). A patogenicidade varia de acordo com o tipo sorológico, idade e condições de saúde do hospedeiro podendo causar gastroenterite aguda, bacteremia e/ou febres entéricas, quadros graves com disseminação e abscessos, osteomielite, meningite e ainda, estado de portador (Pickering & Cleary, 1992). A sua identificação está normalmente restrita às provas bioquímicas e sorológicas e a diferenciação dos sorotipos é limitada a laboratórios especializados.

No Brasil, a *Shigella* e a *Salmonella* têm sido detectadas de 0,5 a 21% e de 0 a 10,6%, respectivamente, em crianças menores de 5 anos com diarréia aguda (Guerrant *et al.*, 1983; Kitagawa *et al.*, 1989; Leal *et al.*, 1987, 1988 a, b; Gomes *et al.*, 1991; Mangia *et al.*, 1993; Almeida *et al.*, 1998; Toporovski *et al.*, 1999; Fagundes Neto & Scaletsky, 2000; Medeiros *et al.*, 2001; Orlandi *et al.*, 2001; Scaletsky *et al.*, 2002 b; Souza *et al.*, 2002).

O gênero *Campylobacter* compreende as espécies *C. jejuni*, *C. coli*, *C. laridis*, *C. hyointestinalis* e *C. upsaliensis*, sendo as duas primeiras, as principais causadoras de doença em humanos. Sabe-se que um dos seus maiores reservatórios naturais é o frango. O quadro clínico é muito semelhante ao da shigelose (Pickering & Cleary, 1992). Na América do Sul, o *Campylobacter* foi identificado de 10 a 35% de amostras de crianças com diarréia ou assintomáticas (Fernandez, 2004). Estudos brasileiros recentes têm demonstrado uma prevalência em crianças entre 0 e 11 %

dos casos de diarréia aguda (Almeida *et al.*, 1998; Fagundes Neto & Scaletsky, 2000; Medeiros *et al.*, 2001; Orlandi *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2002).

O gênero *Yersinia* tem 10 espécies, sendo três patogênicas: *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*. A *Y. enterocolitica* tem sido relatada como causa freqüente de diarréia, de maior ocorrência em crianças e em países de clima frio (Pickering & Cleary, 1992; Trabulsi & Martinez, 2004). No Brasil, foi relatada pela primeira vez no fim da década de 70 com uma incidência de 5,6% (Stumpf *et al.*, 1978). Outras pesquisas demonstraram-na em menos de 1% nos casos de diarréia aguda em crianças em diferentes localidades brasileiras, como Rondônia (Orlandi *et al.*, 2001), Ribeirão Preto (Medeiros *et al.*, 2001), São José do Rio Preto (Almeida *et al.*, 1998), São Paulo (Souza *et al.*, 2002), Belo Horizonte (Queiroz *et al.*, 1987) e Pernambuco (Leal *et al.*, 1988).

Os vibriões são microorganismos abundantes no meio aquático, detectados em uma variedade enorme de animais, tais como no zooplâncton e moluscos, e também nas algas (Thompson *et al.*, 2004). As espécies de maior importância para os humanos são *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* (Powell *et al.*, 1999). Estes agentes são causadores de gastroenterites devido ao consumo de água, mariscos ou alimentos contaminados. *V. cholerae* é o agente bacteriano responsável por importantes surtos e epidemias de diarréia profusa em adultos e crianças, principalmente nos países em desenvolvimento (Glass & Kilgore, 1997; Faruque *et al.*, 1998, 2002; Sharma *et al.*, 2003; Sack *et al.*, 2004). É endêmico em partes da Ásia e África e causa grandes perdas hidreletrolíticas, sobretudo em crianças (Niyogi *et al.*, 1994; Faruque *et al.*, 1998, 2002) através da produção de uma enterotoxina – toxina colérica (Ctx) - que é considerada 10 vezes mais potente do que a toxina termolábil (LT) da ETEC (Glass & Kilgore, 1997).

As espécies do gênero *Aeromonas* têm sido estudadas nas últimas décadas como agentes etiológicos de diarréia infecciosa em crianças e adultos, sendo *A. sobria*, *A. hydrophyla* e *A. caviae*, as mais freqüentes (Watson *et al.*, 1985; Gluskin *et al.*, 1992; Niyogi *et al.*, 1994; Gracey, 1996; Glass & Kilgore, 1997; Lee *et al.*, 2001). As mais prováveis fontes de infecção são a água, crustáceos e peixes contaminados. Estas bactérias, ao invadirem o epitélio colônico, liberam toxinas responsáveis pelos sintomas (Burke *et al.*, 1984; Watson *et al.*, 1985; Glass & Kilgore, 1997). No mundo tem sido demonstrada de 0,5 até 12,2% e no Brasil, em 1,4 a 2% de amostras fecais

de crianças com diarréia aguda (Black *et al.*, 1987; Almeida *et al.*, 1998; Albert *et al.*, 1999; Essers *et al.*, 2000). Em pessoas saudáveis, foi identificada em taxas iguais ou menores que 1% (Almeida *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2001).

2.2.2 Vírus

Os agentes infecciosos virais associados às diarréias agudas em crianças são rotavírus (RV), adenovírus (Ad), calicivírus e astrovírus (Glass & Kilgore, 1997; Waters *et al.*, 2000). Os RV são os mais freqüentes em todas as partes do mundo (Prado & O’Ryan, 1994; Horwitz, 2001; Kapikian *et al.*, 2001; Parashar *et al.*, 2003 a, b).

Os RV pertencem à família *Reoviridae* e tem o genoma segmentado, constituído de 11 moléculas de RNA de dupla fita (RNA_{df}) e foi descrito em 1973 por Bishop *et al.*. O padrão de migração em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) permite diferenciar os RV em sete grupos distintos nomeados de A-G (Kapikian *et al.*, 2001). O RV do grupo A apresenta um perfil eletroforético denominado 4-2-3-2: quatro segmentos de maior peso molecular, seguidos de dois grupos de peso molecular intermediário e finalizando com dois segmentos de menor peso molecular. Estes dois últimos segmentos também são utilizados para classificar os RV do grupo A de perfil super curto, curto e longo.

Os RV dos grupos A, B e C são descritos em humanos e em animais e os demais, apenas em animais (Glass & Kilgore, 1997). O RV do grupo A causa diarréia na infância, os dos grupos B e C causam surtos de diarréias em adultos e em crianças (Prado & O’Ryan, 1994; Glass & Kilgore, 1997; Kapikian *et al.*, 2001; Parashar *et al.*, 2003 a, b). Os RV são ainda divididos em subgrupos e sorotipos ou genotipos, determinados por proteínas e/ou por genes que codificam as proteínas estruturais VP4 e VP7. O virion apresenta seis proteínas estruturais VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7 e outras seis proteínas não estruturais NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6. A proteína VP6, a mais prevalente do virion, é altamente antigênica e permite a identificação dos RV em grupos (A – G). VP4 e VP7 contêm epítomos neutralizantes que definem os sorotipos/genotipos P (protease) e G (glicoproteína), respectivamente. No grupo A, foram identificados 14 sorotipos/genotipos G, dez

acometendo a espécie humana (G1-G6, G8-G10 e G12) enquanto que foram descritos 25 genótipos P, quatro deles acometendo a espécie humana (P[4],P[6],P[8] e P[9]) (Rahman *et al.*, 2005). Logo, a tipagem dos RV obedece a um sistema binário de classificação conforme os tipos P e G (Estes, 1996; Parashar *et al.*,1998; Kapikian *et al.*, 2001).

Cerca de 90% das crianças tanto nos países desenvolvidos, quanto em desenvolvimento, adquirem a infecção por RV durante os três primeiros anos de vida, sendo considerado um dos principais agentes etiológicos de gastroenterite viral aguda na população infantil e responsável por um alto número de internações (Cook *et al.*, 1990; Glass *et al.*, 2001; Kapikian *et al.*, 2001; Parashar *et al.*, 2003 a, b; Widdowson *et al.*, 2005). Estima-se que ocorram 1.560.000 mortes no mundo pela doença diarréica e que os RV sejam responsáveis por até 39% dos casos (Parashar *et al.*, 2003).

Com relação ao quadro clínico, os pacientes infectados com RV desenvolvem vômitos e diarréia de caráter súbito, após um período de incubação de 48 h a 96 h, podendo apresentar febre em 30 a 50% dos casos. A diarréia é de caráter explosivo, com inúmeras evacuações aquosas, amareladas e com muco em 25% dos casos. A duração média da doença é de 5 a 8 dias, com perdas fecais mais graves e prognóstico pior do que as diarréias não associadas ao RV, podendo evoluir para desidratação e internação hospitalar (Prado & O’Ryan, 1994; Linhares, 2000; Kapikian *et al.*, 2001; Mota-Hernandez *et al.*; 2001; Clark & Mc Kendrick, 2004). Em lactentes e desnutridos graves podem prolongar a duração da diarréia (Oliveira & Linhares, 1999; Kapikian *et al.*, 2001).

Desde o primeiro relato de RV no Brasil (Linhares *et al.*, 1977), diversos estudos têm demonstrado a importância destes vírus, com uma prevalência estimada em crianças com diarréia aguda variando de 1,1 até 40% (Cardoso *et al.*, 1989, 1992, 2003; Linhares *et al.*, 1989, 1993; Gomes *et al.*, 1991; Mangia *et al.*, 1993; Pereira *et al.*, 1993; Stewien *et al.*, 1993; Timenetsky *et al.*, 1994; Leite *et al.*, 1996; Mascarenhas *et al.*, 1998; Teixeira *et al.*, 1998; Toporovski *et al.*, 1999; Fagundes Neto & Scaletsky, 2000; Fernandes *et al.*, 2000; Orlandi *et al.*, 2001; da Rosa e Silva *et al.*, 2001; Scaletsky *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2002; Schnack *et al.*, 2003; Carmona *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2004 a). No Espírito Santo, dois estudos de corte transversal relataram prevalência de 7 (2004) e 17,9% (2003) de RV em

crianças com diarréia atendidas em Unidade Básica de Saúde Municipal (Vicentini *et al.*, 2003 e 2004 a).

A infecção pelos RV predomina nos meses secos e frios do ano (Linhares, 2000; Kapikian *et al.*, 2001; Coluchi *et al.*, 2002). No Brasil, foi relatado com freqüência maior entre maio e setembro em Goiânia e no Rio de Janeiro (Gomes *et al.*, 1991; Cardoso *et al.*, 1992; Pereira *et al.*, 1993), entre março e setembro, com pico em junho, em Minas Gerais (da Rosa e Silva *et al.*, 2001), entre julho e setembro em Natal (Fernandes *et al.*, 2000) e de maio a julho no Espírito Santo (Vicentini, 2004 b).

O RV é um vírus estável nas condições ambientais e pequena quantidade pode contaminar o ambiente. Como a quantidade de vírus eliminado pelo paciente é grande e a dose infecciosa estimada é baixa (Graham *et al.*, 1987), mínima contaminação ambiental é suficiente para transmitir a infecção, que se dá por contato oro-fecal direto e por fômites (Butz *et al.*, 1993; Glass & Kilgore, 1997).

Os Ad, embora fossem freqüentemente encontrados em espécimes fecais, eles não eram associados à doença do trato gastrointestinal. Em meados de 1980, dois Ad fecais, previamente não cultivados, foram adaptados em cultura e foram denominados de sorotipos 40 e 41, formando a espécie F de Ad entéricos humanos (Wadell *et al.*, 1989). Outro sorotipo implicado em diarréia em crianças é o 31 (Glass & Kilgore, 1997). Os Ad estão tipicamente associados com doença mais branda do que a causada por RV, mas com curso mais prolongado (em média de 10,8 dias contra 5,9 dias para RV), febre e vômito de menor intensidade e ausência de sazonalidade. O período de incubação pode variar de três a dez dias. A doença incide mais em crianças menores de dois anos e pode estabelecer o estado de portador prolongado, tornando as fezes da criança uma fonte comum durante a infecção aguda e após remissão dos sintomas, sendo de grave repercussão em pacientes imunossuprimidos (Horwitz, 2001; Clark & Mc Kendrick, 2004).

Diversos estudos demonstram que os Ad correspondem à segunda causa de diarréia viral em crianças no Brasil e no mundo, com prevalência variando de 1 a 10% dos casos (Cardoso *et al.*, 1992; Mangia *et al.*, 1993; Pereira *et al.*, 1993; Stewien *et al.*, 1993; Timenetsky *et al.*, 1993; Glass & Kilgore, 1997, Soares *et al.*, 2002; Subekti *et al.*, 2002; Pereira Filho, 2004).

Dentre os protozoários causadores de diarréia, em regiões tropicais, os mais importantes são a *Entamoeba histolytica*, a *Giardia lamblia* e o *Cryptosporidium* spp. (Brunser *et al.*, 1997; Procop, 2001). A maioria dos trabalhos descreve a giárdia e a ameba envolvidas com diarréia persistente e a ameba, geralmente associada à disenteria (Newman *et al.*, 2001; Abd-Alla & Ravdin, 2002).

A *E. histolytica* tem sido descrita em fezes de indivíduos assintomáticos e naqueles com diarréia aguda. No entanto, não se sabe ainda se as estirpes encontradas em indivíduos assintomáticos são as mesmas dos casos que apresentam diarréia aguda, já que foram demonstradas características morfológicamente distintas em ambas (Haque *et al.*, 2003). Alguns autores consideram o encontro de trofozoítas com hemáceas fagocitadas como um critério de doença invasiva (Garcia & Brunckner, 1996; Brunser *et al.*, 1997). Sua prevalência, em adultos e crianças, dependendo da região geográfica estudada, variou de 0,6 a 45,1% (Braga *et al.*, 1998, 2001; Albert *et al.*, 1999; Abd-Alla & Ravdin, 2002; Haque *et al.*, 2003). No Brasil, a *E. histolytica* foi encontrada numa freqüência de zero a 16% dos casos de diarréia aguda em crianças em diferentes regiões (Guerrant *et al.*, 1983; Gennari-Cardoso *et al.*, 1996; Toporovski *et al.*, 1999; Fagundes Neto & Scaletsky, 2000; Braga *et al.*, 1998, 2001; Orlandi *et al.*, 2001; Scaletsky *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2002).

Há discussão sobre o real impacto da giardiase em diarréias agudas, sobretudo nos países em desenvolvimento, visto que este parasita foi freqüentemente associado a quadros de diarréia persistente, mas também detectado em crianças assintomáticas (Albert *et al.*, 1999; Black *et al.*, 1999; Saldiva *et al.*, 1999; Rivera *et al.*, 2002). Os estudos brasileiros demonstram detecção do protozoário de 0,7 a 14,6% das fezes de crianças com diarréia aguda (Guerrant *et al.*, 1983; Stewien *et al.*, 1993; Gennari-Cardoso *et al.*, 1996; Toporovski *et al.*, 1999; Fagundes Neto & Scaletsky, 2000; Orlandi *et al.*, 2001; Scaletsky *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2002). Num estudo prospectivo em Fortaleza, Newman *et al.* (2001) demonstraram a presença de *G. lamblia* em fezes de crianças sem diarréia numa proporção semelhante àquelas com diarréia aguda (8,8%), mas com uma diferença estatisticamente significativa quando analisada em crianças com diarréia persistente (20,6%). Saldiva *et al.* (1999) evidenciaram uma alta prevalência de giárdia (44%) em crianças de 1 a 12 anos, na zona rural do estado de São Paulo, sem relato de associação com diarréia.

A infecção pelo *Cryptosporidium* spp. está classicamente associada à diarréia aguda em pacientes imunocomprometidos (Pickering & Cleary, 1992; Brunser *et al.*, 1997; Juranek, 2000; Ferreira & Borges, 2002). Nos pacientes sem comprometimento do sistema imunológico, acomete determinadas faixas etárias, especialmente nos primeiros anos de vida. Este protozoário causa diarréia de caráter aquoso profuso, com febre, náuseas e vômitos, mas assim como a giárdia e a ameba, este agente está mais associado à diarréia persistente (Pickering & Cleary, 1992; Juranek, 2000; Hlavsa *et al.*, 2005). A forma mais comum de infecção é através da ingestão de alimentos ou água contaminados por oocistos contendo o parasita, sobretudo em áreas de recreação, tais como piscinas, lagos e riachos. A prevalência mundial relatada em indivíduos com diarréia variou de 2,1% em países desenvolvidos a 8,5 até 27,8% em países em desenvolvimento (Crawford & Vermund, 1988; Haque *et al.*, 2003; Nuñez *et al.*, 2003; Adjei *et al.*, 2004; Simango *et al.*, 2004; Abdel-Messih *et al.*, 2005; Hlavsa *et al.*, 2005). No Brasil, a prevalência variou entre três e 17,4% (Mangini *et al.*, 1992; Stewien *et al.*, 1993; Gennari-Cardoso *et al.*, 1996; Franco & Cordeiro, 1996; Newman *et al.*, 1999; Oshiro *et al.*, 2000; Medeiros *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2003). A frequência de positividade para o *Cryptosporidium* foi diretamente proporcional à faixa etária estudada (Mangini *et al.*, 1992; Stewien *et al.*, 1993; Gennari-Cardoso *et al.*, 1996; Franco & Cordeiro, 1996; Oshiro *et al.*, 2000; Medeiros *et al.*, 2001). Porém, Newman *et al.* (1999) e Silva *et al.* (2003) observaram uma correlação inversa em relação à idade.

Schnack *et al.* (2003) relataram *E. histolytica* e *Cryptosporidium* em 56,4 e 85,1%, respectivamente, em crianças menores de cinco anos, com diarréia aguda, na cidade de Criciúma, mas não há descrição se o período de estudo coincidiu com um surto de infecção por estes protozoários neste local.

Os patógenos entéricos bacterianos, virais ou parasitários são muitas vezes detectados simultaneamente nos pacientes com doença diarréica aguda, dificultando a interpretação da participação de cada agente infeccioso na doença. Além do possível somatório de lesões pela coinfeção é provável que a superposição com um estado de nutrição inadequado contribua para a gravidade da diarréia nos países em desenvolvimento, onde as infecções múltiplas têm um maior risco de acontecer.

A freqüência de identificação concomitante de múltiplos enteropatógenos intestinais em alguns estudos brasileiros variou de 4 a 78% (Stewien *et al.*, 1993; Mangia *et al.*, 1993; Almeida *et al.*, 1998; Toporovski *et al.*, 1999; Medeiros *et al.*, 2001; Orlandi *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2002), mas uma notável parte dos estudos busca a identificação de um agente infeccioso isoladamente nas crianças menores de cinco anos com diarréia aguda.

No estudo dos doentes, uma informação relevante constitui a determinação do enteropatógeno que está mais freqüentemente associado à necessidade de terapia de hidratação intravenosa e/ou internação, pela gravidade do episódio clínico ou por falha ou resposta inadequada à terapia de reidratação oral. Este dado é fundamental visto que, por exemplo, o RV é um agente associado à transmissão nosocomial, prolongando o tempo de internação dos contatos (Bishop, 1994; Gusmão *et al.*, 1995; Kapikian *et al.*, 2001). Portanto, o conhecimento da etiologia da diarréia aguda, no paciente que necessita de internação, possibilitará medidas preventivas seguras a serem tomadas nas enfermarias, para minimizar o risco da transmissão e os custos das internações.

Na medida em que a doença diarreica se torna menos freqüente em comunidades com melhores condições de higiene e de saneamento básico, a prevalência dos agentes infecciosos bacterianos e dos protozoários reduz, passando a predominar as diarréias associadas aos vírus (Feachem, 1984; Esrey *et al.*, 1985, O’Ryan, Prado & Pickering). Então, a determinação da freqüência dos patógenos intestinais encontrados num primeiro momento poderá servir como indicador de qualidade sanitária da região de onde provém o caso, para planejamento e medidas de intervenção mais eficazes no combate à doença diarreica.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Detectar agentes infecciosos (bactérias, vírus e protozoários) associados à diarréia aguda em crianças de até três anos de idade, atendidas no PS do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória (HINSG), em Vitória – ES, e investigar aspectos clínico-epidemiológicos associados.

3.2. ESPECÍFICOS

3.2.1. Detectar a presença dos agentes bacterianos patogênicos ou possivelmente patogênicos associados à diarréia aguda: *Escherichia coli* enteropatogênica típica e atípica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasora (EIEC), enteroagregativa (EAEC), de adesão difusa (DAEC) e enterohemorrágica (EHEC); *Shigella* (*S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei* e *S. dysenteriae*) e *Salmonella spp*;

3.2.2. Detectar antígenos de RV em suspensão fecal por ensaio imunoenzimático e seu ácido nucleico por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e antígenos de Ad em suspensão fecal por ensaio imunoenzimático;

3.2.3. Detectar antígenos de *Giardia lamblia*, de *Entamoeba histolytica* e de *Cryptosporidium spp.* em suspensão fecal por ensaio imunoenzimático;

3.2.4. Investigar os principais sinais e sintomas e fatores sócio-demográficos associados aos diferentes grupos dos patógenos intestinais encontrados.

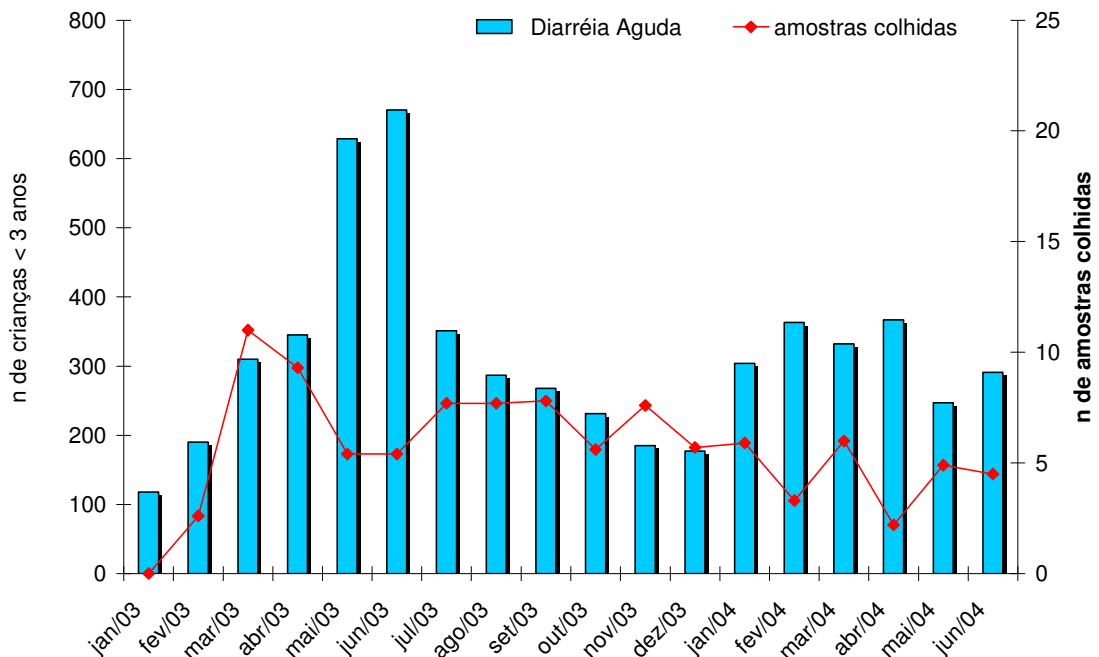
4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. TIPO DE ESTUDO E LOCAL

Foi feito um estudo descritivo dos casos de diarréia aguda em crianças até três anos de idade atendidos durante 17 meses consecutivos no Pronto Socorro (PS) do hospital pediátrico, Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória (HINSG), situado em Vitória – ES. O HINSG é um hospital de referência da rede estadual do Serviço Único de Saúde (SUS), que alberga uma residência médica em Pediatria, atendendo aos municípios da Grande Vitória, assim como a outros municípios do Estado do Espírito Santo, do Sul da Bahia e do Sudeste de Minas Gerais. Todas as crianças são atendidas no Setor de Triagem do PS do referido hospital e, quando necessário, encaminhadas aos diferentes serviços para observação ou esclarecimento diagnóstico. No período do estudo, foi realizada uma média de 7200 atendimentos mensais e o diagnóstico de diarréia aguda, associada ou não a vômitos, variou de 118 a 670 casos mensais, nos menores de três anos (Gráfico 1).

Gráfico 1: Número total de consultas por gastroenterite aguda e de amostras fecais obtidas de crianças menores de três anos atendidas no Pronto Socorro do HINSG no período de 2003 a 2004



4.2. AMOSTRAGEM

Durante quatro dias da semana, em períodos alternados de quatro horas (matutinos e vespertinos), as crianças triadas que apresentavam como queixa principal a diarréia, eram direcionadas para entrevista e coleta das fezes, após consentimento livre e esclarecido. A obtenção de todas as informações sócio-demográficas e o procedimento da coleta foram realizados pela investigadora.

O estudo foi feito no período entre fevereiro de 2003 e junho de 2004. Foram usados os seguintes critérios de inclusão: crianças de ambos os sexos, com idade compreendida entre zero e três anos, acometidas de diarréia e/ou disenteria por um período inferior a 15 dias. Foram excluídas aquelas com diarréia persistente ou crônica. Não foram colhidas amostras de pacientes internados. Nos casos em que a criança fazia uso de antimicrobiano, a pesquisa de patógenos bacterianos foi excluída. Foram selecionados 253 casos sendo 11 destes, crianças entre 36 a 48 meses.

Foram obtidas 78 amostras de crianças sem diarréia, selecionadas como controles, colhidas neste mesmo hospital sendo colhidas um total de 331 amostras. Esse grupo controle foi utilizado especialmente para avaliar a ocorrência de algumas categorias de *E. coli* supostamente diarreio gênicas (EPEC atípica, EAEC e DAEC) (Figura 1).

4.3. COLETA DOS DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

Após explicação dos objetivos da pesquisa ao responsável pela criança e a obtenção da autorização assinada para a coleta do material e dos dados clínico-epidemiológicos, foi feito o preenchimento de uma ficha com informações sócio-demográficas e uma anamnese direcionada para fatores de risco para diarréia, sinais e sintomas associados à diarréia e a terapêutica inicial após seu atendimento (Anexo 2).

Das 253 crianças estudadas, em 20 casos não foi possível ter esta ficha preenchida.

4.4. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, do Centro Biomédico, Universidade Federal do Espírito Santo, em 23 de maio de 2003 (Anexo 1).

Este estudo possibilitou um trabalho de orientação aos familiares das crianças participantes sobre higiene na alimentação e de utensílios oferecidos à criança, bem como o reconhecimento precoce de sinais de desidratação, uso de soro de reidratação oral e tipo de alimentação a ser oferecida durante o quadro de diarréia aguda, segundo recomendações da OMS (OMS, 2002).

4.5. COLETA, ARMAZENAMENTO E PROCESSAMENTO DAS FEZES

As amostras fecais foram colhidas após eliminação espontânea imediata ou por estímulo com sonda retal de polivinil de números seis a dez, fracionando o material conforme se segue: i) fezes “in natura” em recipiente plástico apropriado com tampa de rosca, para a pesquisa de vírus e de protozoários; ii) em meio de transporte Cary-Blair para isolamento de enteropatógenos bacterianos (*E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*); iii) em caldo de enriquecimento selenito para enteropatógenos *Shigella* e *Salmonella*. Estes dois últimos foram mantidos à temperatura ambiente (TA), enquanto a primeira fração permanecia em recipiente térmico mantido a 4°C, até seu congelamento a -20° C (Figura 1). As amostras fracionadas foram levadas ao laboratório ao final do período de coleta e preparadas para as análises microbiológicas e parasitológicas (Figura 2, Anexo 6). Os meios de cultura e soluções usadas estão descritas no Anexo 5.

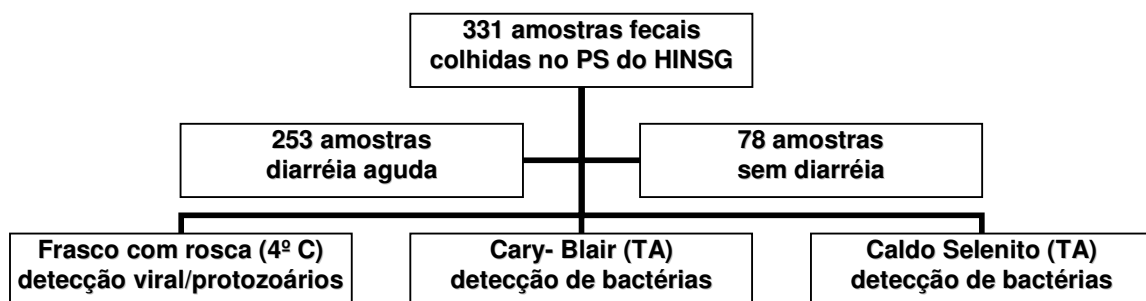


Figura 1: Distribuição das 331 amostras fecais colhidas de acordo com seu fracionamento para detecção dos enteropatógenos

4.5.1. Detecção de Bactérias

A amostra fecal foi processada no laboratório em um período sempre inferior a oito horas após a coleta em 253 casos de crianças com diarréia aguda e 78 casos sem diarréia. Foram excluídas 12 amostras das crianças com diarréia aguda para pesquisa de bactérias por estarem em uso de antimicrobiano (Figura 2).

A amostra preservada em meio de transporte Cary-Blair foi semeada em meios de cultura diferenciais de baixa seletividade (Ágar MacConkey) para isolamento de *E. coli*, e de média seletividade (Ágar SS) para isolamento de *Shigella* e de *Salmonella*. O caldo de enriquecimento selenito foi incubado por 12 a 18 h à 37°C para favorecer o isolamento de *Salmonella* spp e *Shigella* spp e, posteriormente, semeado em Ágar SS ou em XLD (Xilose-Lisina-Desoxicolato), seletivos e diferenciais. As placas foram incubadas por 24 a 48 h a 37°C. Todos os procedimentos de incubação foram realizados em incubadora bacteriológica.

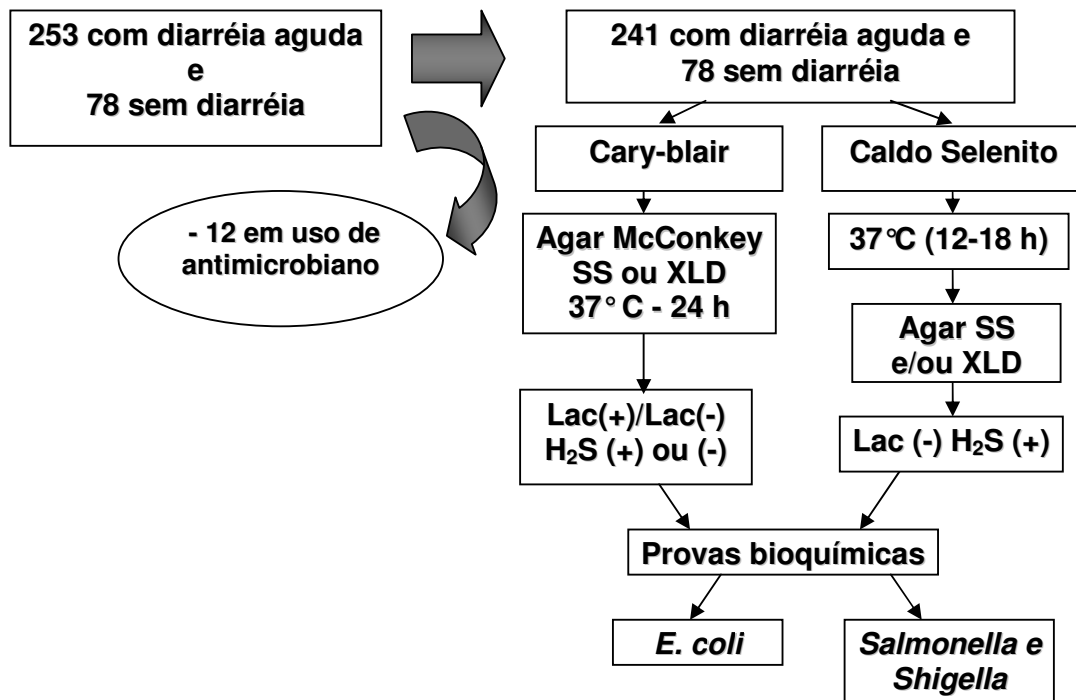


Figura 2: Sumário dos procedimentos realizados para detecção bacteriana nas 331 amostras colhidas

4.5.1.1. Caracterização bioquímica e identificação de enterobactérias

4.5.1.1.1. *E. coli*

Colônias lactose positivas (Lac +), sugestivas de *E. coli*, e lactose negativas (Lac -) com ou sem H₂S, sugestivas de EIEC, de *Shigella* ou de *Salmonella*, foram selecionadas de cada amostra para identificação bioquímica presuntiva dos gêneros bacterianos, através dos testes de motilidade, produção de indol, descarboxilação de lisina, metabolização de citrato, desaminação de fenilalanina, fermentação de dextrose, lactose e/ou sacarose, produção de gás a partir de glicose e produção de H₂S.

Quando necessário, testes bioquímicos complementares como a descarboxilação dos aminoácidos arginina e ornitina foram utilizados na elucidação do gênero bacteriano.

E. coli Lac + e Lac - foram caracterizadas bioquimicamente como do grupo enteropatogênica clássica (EPEC) ou enteroinvasora (EIEC), respectivamente, através de anti-soros polivalentes (PROBAC do Brasil) de acordo com instruções do fabricante, descritas a seguir: suspensão bacteriana foi realizada em solução salina (turvação compatível com a escala nº. 2 de Mac Farland, aproximadamente 6 x 10⁸ UFC/mL) e fervida por uma hora. Vinte e cinco microlitros da suspensão fervida foram homogeneizados em lâmina, separadamente, com 25 µl de anti-soros polivalentes A, B e C para EPEC (colônias Lac +) ou polivalentes A e B para EIEC (colônias Lac -) (Quadro 1). Reação de aglutinação foi observada com 30 s. a um min. Controle negativo da reação foi realizado omitindo-se o anti-soro e adicionando-se igual volume de salina. Reação era considerada positiva quando a aglutinação na lâmina era positiva com algum dos anti-soros e não com a salina.

Cinco colônias Lac + e duas Lac - de *E. coli* foram preservadas em ágar nutriente para posterior caracterização de todos os tipos diarreiogênicos através dos testes de hibridização com sondas genéticas radioativas para detecção de genes de virulência de EPEC, ETEC, EHEC, EAEC, EIEC e DAEC no Laboratório de Microbiologia – Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) pela Dra. Isabel Cristina Scaletsky (Quadro 2 e Anexo 6).

Quadro 1. Anti-soros utilizados na confirmação e/ou triagem de bactérias patógenas intestinais

GÊNERO E / OU ESPÉCIE	SOROGUPOS / SOROTIPOS	ANTI-SOROS
<i>E. coli</i> (EPEC)	O26, O55, O111, O119 O114, O125, O142, O158 O86, O126, O127, O128	Polivalente A Polivalente B Polivalente C
<i>E. coli</i> (EIEC)	O28ac, O29, O136, O144, O152 O112ac, O124, O143, O164, O167	Polivalente A Polivalente B
<i>Shigella</i>		
<i>S. flexneri</i>	1, 2, 3, 4, 5, 6 e variantes X e Y	Polivalente
<i>S. boydii</i>	1, 2, 3, 4, 5, 6, e 14 8, 9, 10, e 11 7, 12, 13 e 15	Polivalente 1 Polivalente 2 Polivalente 3
<i>S. sonnei</i>	I e II	Polivalente
<i>S. dysenteriae</i>	1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 8ab, 8ac, 9 e 10	Polivalente 1 Polivalente 2
<i>Salmonella</i>	A, B, C1, C2, D, E1, E2, E3, E4, Vi	Polivalente O

Quadro 2. Sondas genéticas específicas para as categorias de DEC

Patotipo de <i>E. coli</i>	Especificidade da sonda
EPEC	Plasmídio EAF*; Gene <i>eaeA</i> *
DAEC	Gene <i>daaC</i> [#]
EAEC	EAEC (pAA) ^{**}
EHEC	EHEC (Adesão)*; Stx1 [†] ; Stx2 [†]
ETEC	LT ^{***} ; STp [¥] ; STh [¥]
EIEC	Inv [§]

***EAF** = Fator de adesão da EPEC; **eaeA** = gene responsável pela codificação da *intimina*, proteína de membrana relacionada à lesão *attaching and effacing* (A/E) promovida pela EPEC.

[#]**daaC** = gene associado à biogênese da F1845, adesina fimbrial da adesão difusa;

^{**}**pAA** = plasmídio relacionado à adesão agregativa; ***Adesão** = plasmídio pO157, onde está localizado o gene responsável pela síntese da enterohemolisina de EHEC; [†]**Stx** = citotoxina "Shiga-like toxin"; ^{***}**LT** toxina termolábil; [¥] **STp e STh** toxinas termoestável de porco e humana, respectivamente; [§]**Inv** fragmento isolado do plasmídio de invasão da EIEC (pInv).

4.5.1.1.2. *Shigella* e *Salmonella*

Nos casos de suspeita do isolamento de *Shigella* ou de *Salmonella* através das provas bioquímicas descritas anteriormente, a confirmação do gênero foi obtida através do uso de anti-soros polivalentes (PROBAC do Brasil) (Quadro 1). No caso da *Shigella*, além de confirmação do gênero, foi também possível a determinação da espécie isolada: *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. dysenteriae*. Nos casos de suspeita de *Salmonella*, era utilizado o anti-soro polivalente para antígeno somático O (PROBAC do Brasil) (Quadro 1). A reação sorológica foi realizada como a anteriormente descrita, porém, nestes casos, a suspensão bacteriana não foi fervida. As amostras identificadas como *Salmonella* foram enviadas para o Laboratório do Centro de Referência de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ – RJ, sob a chefia de Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues, para determinação do sorotipo.

4.5.2. Detecção de vírus

As fezes *in natura* foram preservadas à temperatura de – 20°C para detecção dos agentes infecciosos virais RV e Ad.

4.5.2.1. Preparo de suspensões fecais

Foram preparadas suspensões fecais a 10% em tampão Tris/Cálcio (0,01M/0,015M), centrifugadas a 2000 xg a 4°C por 20 min. O sobrenadante foi coletado e armazenado à temperatura de – 20°C até realização dos procedimentos de detecção antígenos virais pelo Ensaio Imunoenzimático para RV e Ad (EIERA, Biomanguinhos, FIOCRUZ) e de extração de RNA para EGPA para identificação de RV. Todas as soluções utilizadas estão descritas no Anexo 5.

4.5.2.2. Ensaio Imunoenzimático para RV e Ad (EIERA)

Foram submetidas 147 amostras fecais à detecção de antígenos de RV e de Ad.

Os antígenos virais (RV e Ad) na suspensão fecal preparada conforme descrito anteriormente, foram detectados através do *kit* EIERA, desenvolvido por Biomanguinhos, FIOCRUZ-RJ, conforme instruções do fabricante. Este ensaio imunoenzimático consiste no método de sanduíche duplo de Anticorpos (Ac), em que os antígenos são capturados em fase sólida por Ac contra Rv ou Ad de soros hiperimunes de cabras. A detecção da reação se faz através da adição de conjugado anti-imunoglobulina contra RV ou Ad (de cobaia) marcado com peroxidase, que é evidenciada com o cromógeno tetrametilbenzidina (TMB). O composto de coloração azul turquesa se torna amarelo após a adição do ácido sulfúrico, quando os antígenos virais estão presentes. Portanto, amostras negativas para RV e Ad não apresentam coloração amarela e as amostras positivas, coloração amarela nitidamente intensa, na diluição $\frac{1}{4}$ ou ainda densidade ótica (DO) significativamente 2X mais elevada do que a dos controles. As amostras identificadas como negativas através da DO apresentam menos que 0,05 do valor zerado (após subtração do valor da DO do controle negativo) e, as positivas com DO maior ou igual a 0,05 do valor zerado (após subtração do valor da DO do controle negativo).

4.5.2.3. Extração de RNA

As suspensões fecais foram submetidas ao método de extração de ácido nucleico descrito por Boom *et al.* (1990), com algumas modificações, conforme descrito a seguir: em 200 μ L da suspensão fecal foram adicionados 800 μ L de tampão L6, homogeneizados e incubados à temperatura ambiente (TA) para lise celular e dissociação da nucleoproteína viral. A seguir, foram acrescentados 10 μ L de sílica, homogeneizados e centrifugados a 12000xg/30 s. e os sobrenadantes descartados em NaOH 10 M (para neutralizar o isotiocianato de guanidina presente no tampão L6). Adicionou-se então (1) 500 μ L de tampão L2 seguido de homogeneização e centrifugação (12000xg/30 s.); (2) 500 μ L de etanol 70% (gelado) seguido de

homogeneização e centrifugação (12000xg/30 s.); (3) 500 µL de acetona P.A. (gelada) e seguido de homogeneização e centrifugação (12000 xg/30 s.). O sobrenadante foi descartado após cada centrifugação. A seguir, incubou-se em banho Maria (BM) a 56°C por 5 min. para evaporação completa da acetona. Foram adicionados 50 µL de H₂O Milli Q, homogeneizados e incubados em banho-maria 56°C por 15 min. para eluição do RNA de dupla fita. As suspensões foram homogeneizadas e centrifugadas (12000xg/3 min.). Aproximadamente 40 µL do sobrenadante foi coletado e estocado a – 20°C até ser utilizado no procedimento seguinte.

4.5.2.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA)

A detecção de RV e a determinação de seus eletroferotipos foram realizadas conforme descrito na literatura (Pereira *et al.*, 1983) em 230 amostras fecais (Grupo III). O RNAdf extraído foi submetido a uma eletroforese vertical em gel de poliacrilamida composto por um gel concentrador (4%) e um separador (7,5%). Após a eletroforese, o gel foi corado pelo método de impregnação pela prata e o perfil eletroforético visualizado em negatoscópio, de acordo com Herring *et al.* (1982).

4.5.3. Detecção de protozoários

As fezes *in natura* foram preservadas a – 20°C para detecção de antígenos dos protozoários *Cryptosporidium*, *E. histolytica* e *G. lamblia*, que foi realizado em 88 amostras fecais (Grupo I).

4.5.3.1. Ensaio Imunoenzimático para *Cryptosporidium*, *E. histolytica* e *G. lamblia* (EIE)

O método imunoenzimático para detecção de antígenos destes protozoários foi aplicado em 88 amostras fecais de crianças com diarréia aguda, escolhidas aleatoriamente dentre as 147 que foram submetidas à pesquisa de RV e Ad (Grupo II), com o kit comercial ProSpecT Ensaio Imunoenzimático para *E. histolytica*, *Cryptosporidium* e *G. lamblia* em Microplaca (Alexon Inc.- Biobrás diagnósticos) segundo as instruções do fabricante. Este ensaio consiste no método de sanduíche duplo de Ac, com detecção qualitativa de antígenos específicos da *E. histolytica*; do *Cryptosporidium* (CSA) e da Giardia (GSA 65), respectivamente. As suspensões fecais, adequadamente diluídas, foram colocadas em unidades da microplacas contendo os anticorpos de captura do antígeno (soro hiperimune de cabra) dos respectivos protozoários. A reação completa-se através da adição de conjugado anti-imunoglobulinas de cobaia marcado com peroxidase, evidenciada com o TMB. O composto formado, de coloração azul turquesa, se torna amarelo após a adição do ácido sulfúrico se os antígenos virais estiverem presentes. As amostras identificadas como negativas apresentam DO menor que 0,05 do valor zerado (após subtração do valor da DO do controle negativo) e positivas com DO maior ou igual a 0,05 do valor zerado (após subtração do valor da DO do controle negativo).

4.5.4 Detecção de mais de um enteropatógeno nas amostras fecais

Para análise das diferentes categorias de enteropatógenos e suas associações, as amostras foram distribuídas em quatro grupos conforme agente etiológico pesquisado e metodologia (Figura 3):

- i) Grupo I = 88 amostras fecais nas quais foi realizada pesquisa de bactérias, de antígenos virais (RV e Ad) e de protozoários;
- ii) Grupo II = 147 amostras fecais nas quais foi realizada pesquisa de bactérias e de antígenos virais de RV e Ad;

- iii) Grupo III = 230 amostras nas quais foi realizada a detecção de bactérias e detecção do ácido nucléico do RV;
- iv) Grupo IV = 78 amostras controles, crianças sem diarréia nas quais foram detectadas bactérias e ácido nucléico do RV.

Os Grupos I e II correspondem a subgrupos do Grupo III e são constituídos de material clínico obtido no período de fevereiro a setembro de 2003.

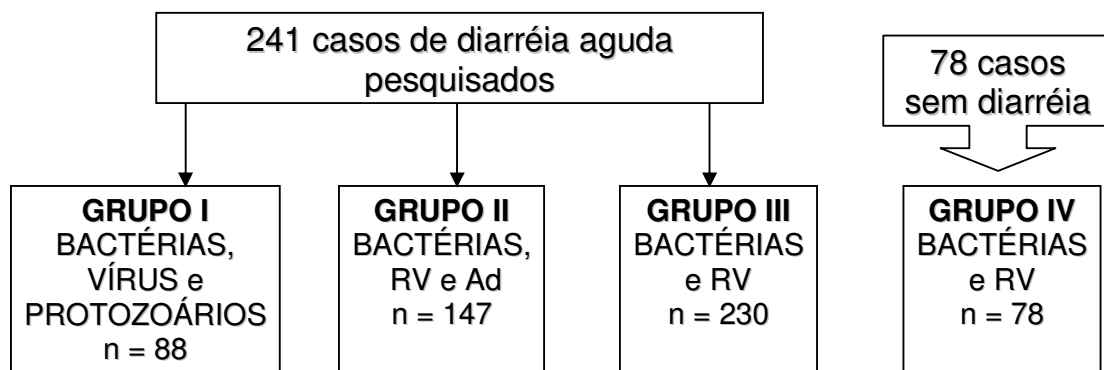


Figura 3: Distribuição dos casos de diarréia aguda e sem diarréia de acordo com a pesquisa simultânea de enteropatógenos

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

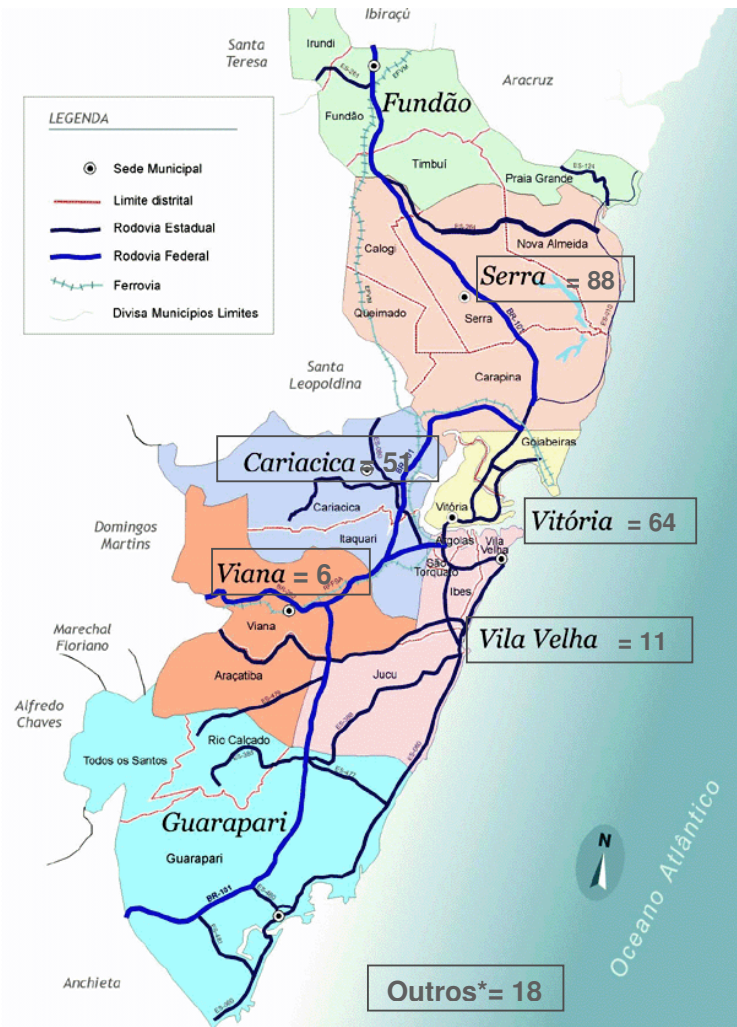
Todos os dados foram inseridos no programa estatístico SPSS 10.0. A estatística descritiva foi realizada das variáveis quantitativas representadas por média, desvio padrão, mediana, valores mínimo e máximo. As variáveis qualitativas foram estudadas pela frequência absoluta e frequência relativa (%) e, quando necessário, realizadas comparações de frequências pelos testes de Qui - quadrado (χ^2) ou exato de Fisher. Todas as estatísticas foram expressas com os respectivos intervalos de confiança a 95%.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS:

5.1. DADOS DEMOGRÁFICOS DA AMOSTRA ESTUDADA

As crianças atendidas no PS do HINSG, que fizeram parte deste estudo, procediam predominantemente de três municípios que formam a região Metropolitana de Vitória: Serra (37%), Vitória (26,9%) e Cariacica (21,4%). Os demais casos (14,6%) foram provenientes de outros municípios deste estado ou de estados adjacentes (Figura 4).

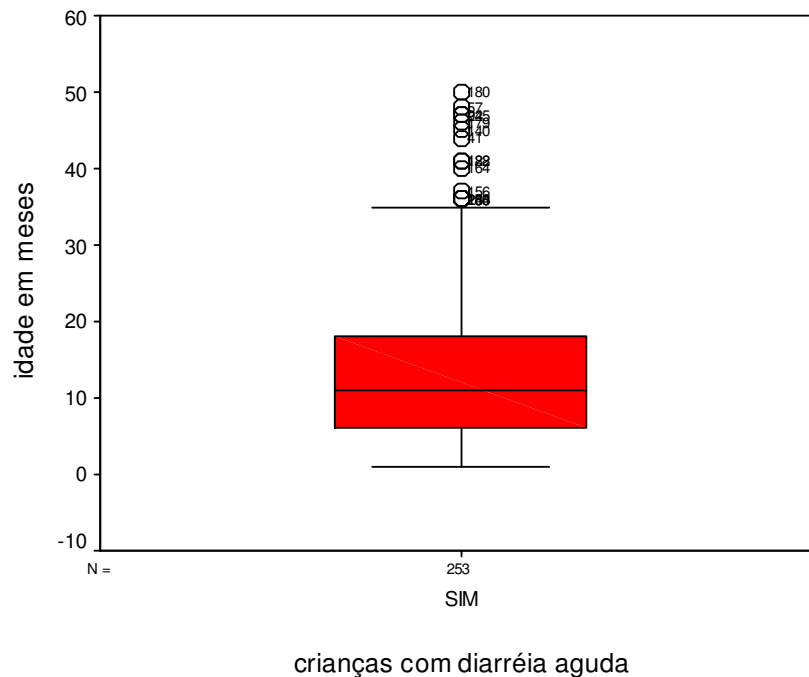


* Outros municípios ou estados

Figura 4: Mapa da região metropolitana da Grande Vitória demonstrando a localização dos municípios que a compõem: Vitória, Vila Velha, Serra, Cariacica e Viana com o respectivo número de amostras colhidas

Das 253 crianças estudadas, 153 eram do sexo masculino (60,5%) e 100, do sexo feminino (39,5%). A média de idade foi de 13,6 meses (DP: 10,7 m), mediana de 11 meses. A estratificação das idades mostrou que 76,7% tinham menos que 18 meses de idade (Gráfico 2).

Gráfico 2: Distribuição da idade das crianças com diarréia aguda estudadas. Estão representados os percentis 25 (6 meses) e 75 (18 meses) e a mediana de 11 meses



A média de idade paterna foi de 30,1 anos (DP= 12,3) e a materna, 24,8 anos (DP= 5,9). Quanto à instrução, 69% (126/183) dos pais e 60,2% (132/219) das mães têm ensino fundamental completo ou parcialmente completo. Com relação à moradia, 86,5% dos entrevistados residiam em casas de alvenaria e quase todos tinham acesso à água potável (97,8%). Havia relato de rede de esgoto nas casas de 69% (158/229) dos entrevistados e 40,7% não tinham filtro. Cento e dois entrevistados possuíam pelo menos um animal doméstico (44,7%) cuja maior freqüência foi de cão, isoladamente (17,8%) ou associado a outros animais (26,5%).

A grande maioria das mães (222/230) realizou pré-natal durante a gestação das crianças estudadas, com relato de 13% (30/230) de prematuridade. Vinte e oito casos (12,3%) tiveram peso de nascimento menor que 2500 g. Não houve diferença estatisticamente significativa comparando às crianças prematuras com as nascidas a termo e aquelas com peso menor ou igual a 2500g, comparando-as com peso superior a 2500 g quando relacionamos a presença ou ausência de diarréia ($p = 0,17$ e $p = 0,06$, respectivamente).

Em 50,6% (118/233) das crianças foi o primeiro relato de diarréia enquanto que 49,4% tinham apresentado dois ou mais episódios anteriores. Outras doenças, que não a diarréia, ocorreram em 26,1% dos casos, sendo pneumonia e refluxo gastresofágico, as mais freqüentes. Apenas 18,8% das crianças com diarréia freqüentavam creches.

Com relação à história alimentar, 37,1% (62/167) das crianças com idade superior a seis meses realizaram aleitamento materno exclusivo até o sexto mês de vida. Do total de crianças estudadas, 56% (128/229) receberam outros leites (exclusivamente ou associados ao leite materno) ou alimentos complementares após três meses de idade. O leite materno não foi oferecido em 14,8% (34/229) (Gráficos 3 e 4).

Com relação a hábitos específicos, 67,8% (156/230) utilizavam a mamadeira para oferecimento de outros alimentos (suco, chás, água ou leite). O uso de chupetas foi referido em 42,8% das crianças. O preparo dos alimentos foi imediato em 89,9% dos casos.

Gráfico 3: Tempo de aleitamento materno exclusivo nas crianças com diarréia aguda

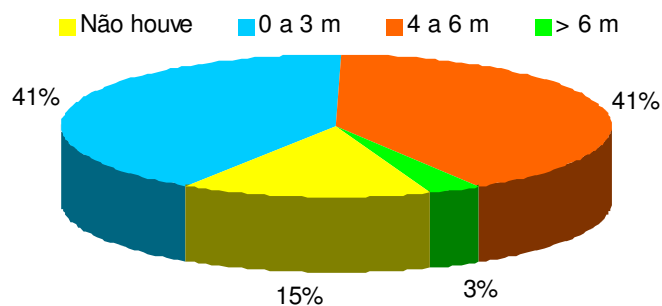
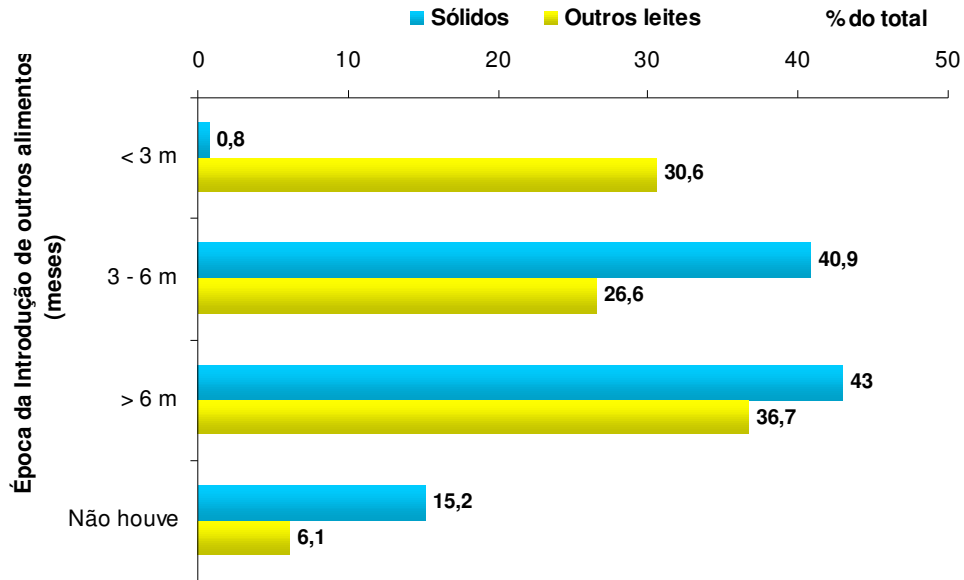


Gráfico 4: Época de introdução de outros alimentos (leites e alimentos sólidos) nos primeiros seis meses de vida das crianças com diarréia aguda



A procura de atendimento médico ocorreu em média de 3,6 dias (DP: 3,1 dias) após o início da diarréia. Cerca de 90% dos pacientes compareceram ao PS nos primeiros sete dias da doença.

Evacuações líquidas ocorreram em 83,8% (201/240) dos casos, relato da presença de sangue em 14,6% (35/239) e de muco em 55,2% (132/239) (Tabela 1). Apenas 12,6% referiram contactantes com sintomas semelhantes. Diagnóstico de desidratação ocorreu em 42,4% (101/238) dos casos, embora terapia de reposição hidreletrolítica intravenosa (IV) tivesse sido realizada em 55,5% (106/238), em decorrência da associação com vômitos incoercíveis.

A Tabela 1 mostra bactérias, vírus e protozoários identificados conforme o grupo pesquisado, sua frequência isolada ou em associação, de acordo com a faixa etária, alguns fatores de risco para doença diarréica, os principais sintomas e número de crianças que evoluíram para terapia de hidratação IV.

Tabela 1a: Prevalência de enteropatógenos por grupos, identificados isoladamente ou associados, em crianças com diarréia aguda, de acordo com algumas variáveis relacionadas com a idade, hábitos e condições de vida, alguns sinais e sintomas e terapia de hidratação intravenosa (IV). Grupo I – os três agentes pesquisados

Variáveis	Grupos de enteropatógenos identificados			
	Grupo I (n = 88)			
	n (%)			
	B	RV e Ad	P	B+V+P
< de 1 ano	21 (60)	28 (55)	9 (34,6)	16 (50)
Prematuridade	6 (17,1)	8 (15,7)	5 (20)	6 (18,8)
Não recebeu LM *	4 (11,4)	8 (15,7)	3 (11,5)	6 (18,8)
Saneamento básico	35 (100)	50 (98)	17 (68)	32 (100)
Presença de filtro	27 (77,1)	28 (55)	10 (45,5)	21 (65,6)
Febre	28 (80)	41 (80)	20 (76,9)	25 (78,1)
Vômitos	30 (85)	50 (98)	23 (88,5)	31 (97)
Sintomas respiratórios	20 (57,1)	31 (60,8)	13 (50)	20 (62,5)
Sangue nas fezes	6 (17,1)	7 (13,7)	4 (15,4)	5 (15,6)
Desidratação	16 (45,7)	23 (45,1)	13 (50)	16 (50)
Terapia IV	17 (48,6)	27 (52,9)	12 (46,2)	16 (50)
N total de casos	35 (39,8)	51 (58)	26 (10,3)	32 (36,4)

* LM = leite materno ; B = bactérias V = vírus P = protozoários;

Tabela 1b: Prevalência de enteropatógenos por grupos, identificados isoladamente ou associados, em crianças com diarréia aguda, de acordo com algumas variáveis relacionadas com a idade, hábitos e condições de vida, alguns sinais e sintomas e terapia de hidratação intravenosa (IV). Grupo II – bactérias, RV e Ad (EI ERA) pesquisados

Variáveis	Grupos de enteropatógenos identificados			
	Grupo II (n = 147)			
	n (%)			
	B	RV	Ad	B + V
< de 1 ano	33 (54,1)	44 (59,5)	5 (41,7)	18 (54,5)
Prematuridade	12 (19,7)	12 (16,2)	2 (16,7)	9 (27,3)
Não recebeu LM *	9 (14,8)	10 (13,5)	0 (0)	6 (18,2)
Saneamento básico	59 (96,7)	71 (96)	12 (100)	32 (97)
Presença de filtro	39 (63,9)	42 (56,8)	7 (58,3)	26 (78,8)
Febre	45 (73,8)	54 (73)	7 (58,3)	24 (72,7)
Vômitos	54 (88,5)	73 (98,6)	12 (100)	32 (97)
Sintomas respiratórios	31 (50,8)	38 (51,4)	4 (33,3)	16 (48,5)
Sangue nas fezes	9 (14,8)	9 (12,2)	1 (8,3)	4 (12,1)
Desidratação	24 (72,7)	34 (46)	4 (33,3)	13 (39,4)
Terapia IV	25 (40,9)	36 (48,6)	4 (33,3)	14 (42,4)
N total de casos	61 (41,4)	74 (50,3)	12 (8,2)	33 (22,5)

* LM = leite materno ; B = bactérias V = vírus P = protozoários;

Tabela 1c: Prevalência de enteropatógenos por grupos, identificados isoladamente ou associados, em crianças com diarréia aguda, de acordo com algumas variáveis relacionadas com a idade, hábitos e condições de vida, alguns sinais e sintomas e terapia de hidratação intravenosa (IV). Grupo III – Bactérias e RV (GEPA) pesquisados

Variáveis	Grupos de enteropatógenos identificados		
	Grupo III (n= 230)		
	n (%)		
	B	RV	B + RV
< de 1 ano	44 (50)	46 (56,8)	16 (51,6)
Prematuridade	17 (19,3)	10 (12,4)	8 (25,8)
Não recebeu LM *	17 (19,3)	15 (18,5)	6 (19,4)
Saneamento básico	82 (93,2)	77 (95,1)	29 (93,5)
Presença de filtro	65 (73,9)	46 (56,8)	25 (80,6)
Febre	62 (70,5)	61 (75,3)	22 (71)
Vômitos	76 (86,4)	78 (96,3)	30 (96,8)
Sintomas respiratórios	46 (52,3)	45 (55,6)	17 (54,8)
Sangue nas fezes	12 (13,6)	8 (9,9)	3 (9,7)
Desidratação	35 (40)	40 (49,4)	13 (42)
Terapia IV	36 (41)	41 (50,6)	14 (45,2)
N total de casos	88 (38,2)	81 (35,2)	31 (13,5)

* LM = leite materno ; B = bactérias V = vírus P = protozoários;

5.2. AGENTES INFECCIOSOS PESQUISADOS NA AMOSTRA ESTUDADA

Bactérias patógenas (EPEC típica, ETEC, EHEC, EIEC, *Shigella* ou *Salmonella*) ou possivelmente patógenas (EPEC atípica, EAEC e DAEC), vírus ou protozoários foram encontrados em 83% dos casos pesquisados (73/88) com diarréia aguda que fazem parte do Grupo I; enquanto que, foram encontrados em 72,1% dos casos do Grupo II (106/147) e em 60% do Grupo III (138/230).

5.2.1. Bactérias

Dos 253 casos de diarréia aguda, foram excluídos 12 para pesquisa de bactérias porque as crianças estavam em uso de antibiótico e/ou quimioterápico (Figura 2, Anexo 4). As bactérias patógenas ou possivelmente patógenas, foram detectadas em 41,5% (100/241). Excluindo as categorias de DEC ainda controversas como agentes etiológicos de diarréia aguda (EPEC atípica, EAEC e DAEC), as bactérias foram detectadas em 10% (24/241) dos casos (Tabela 1).

5.2.1.1. *E. coli* diarrreio gênica (DEC)

E. coli foi isolada em 219 dos 241 casos de diarréia aguda estudados para bactérias. Uma a cinco colônias com testes bioquímicos compatíveis com *E. coli* foram submetidas à reação sorológica para determinação dos sorogrupos e a testes de hibridização para pesquisa de genes de virulência.

5.2.1.1.1. Sorologia para DEC

A reação sorológica utilizando anti-soro policlonal para EPEC detectou nove casos positivos dos 219 em que a *E. coli* foi isolada (4,1%), representando 3,7% do total de casos estudados (Tabela 2). Um caso aglutinou com o anti-soro polivalente A (O26, O55, O111 e O119), oito com o anti-soro polivalente B (sorogrupos O114, O125, O142 e O158), e nenhum com anti-soro polivalente C (O86, O126, O127, O128).

A pesquisa de EIEC, realizada nas colônias Lac (-) que foram negativas para *Shigella*, foram também negativas para esta categoria de *E. coli* (Tabela 2).

Os sorogrupos de DEC, pesquisados com uso de anti-soros monoclonais para determinação do antígeno somático O, revelaram dez casos positivos para seis sorogrupos de *E. coli* assim distribuídos: O26 e O142 (um caso de cada) e O55, O119, O125, O128 (dois casos de cada). Dentre estes sorogrupos encontrados, apenas uma amostra O55 e uma O142 apresentaram positividade na pesquisa com anti-soros policlonais.

5.2.1.1.2. Testes de Hibridização para pesquisa de genes de virulência de DEC

Os testes de hibridização para pesquisa de genes de virulência de DEC de colônias Lac (+) e/ou Lac (-) (Figura 5 A-D) foram realizados em 219 casos de crianças com diarréia aguda, sendo detectadas em 90 destes (41,1%) (Anexo 4, Tabela 2). Houve amostras fecais em que mais de uma DEC foi detectada.

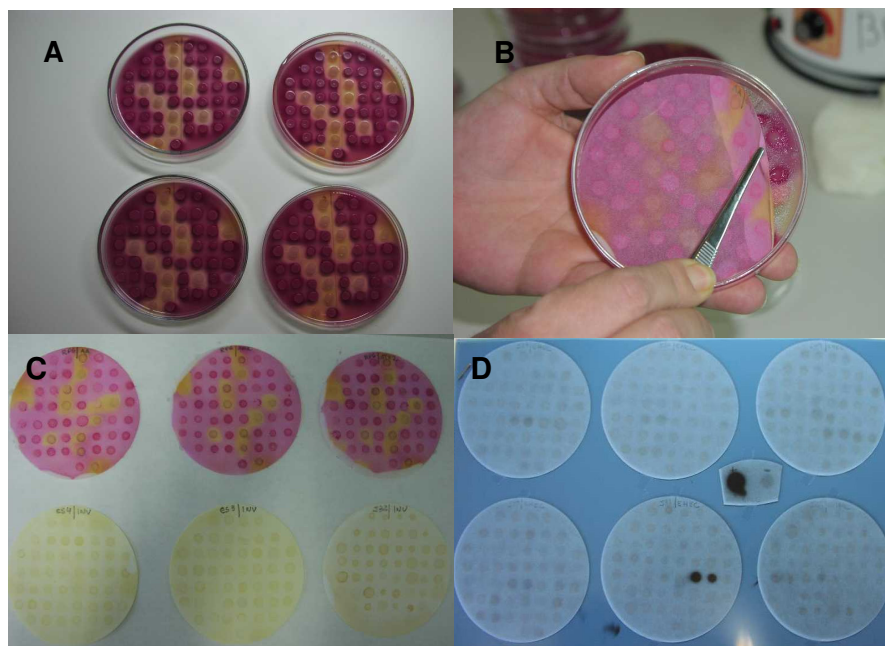


Figura 5: A) Agar McConkey com col. Lac(+) e Lac (-) de *E. coli*; B) Transferência das colônias Lac (+) e Lac (-) para membrana de nitrocelulose; C) Membrana de nitrocelulose com amostras positivas e negativas para fermentação de lactose. Sequência superior e inferior correspondem, respectivamente, a filtros não tratados e tratados com solução de lise bacteriana; D) Hibridização em membrana após revelação. Resultado positivo com sonda genética para o plasmídeo EAF (EPEC típica) pode ser observado em duas amostras no disco central inferior. Controle positivo e negativo para a referida sonda se encontra no quadrado central. Fotos obtidas no Laboratório de Microbiologia da Dra. Isabel C. Scaletsky (UNIFESP).

Foram detectados 20 casos positivos para EPEC (9,1%) através de testes de hibridização para genes de virulência. A presença dos genes *eae* (intimina) e *bfp* (plasmídeo EAF), identificados em dois casos de EPEC, caracterizou a EPEC típica (0,9%) (Figura 5C); enquanto que os demais casos foram caracterizados como EPEC atípicas (8,2%) pela ausência do plasmídeo EAF (Tabela 2).

Dos dez casos em que os sorogrupos de DEC foram determinados com anti-soros monoclonais (descritos anteriormente), genes de virulência foram detectados em sete casos. Dos dois casos de O55, um foi caracterizado como EPEC típica e outro como EPEC atípica. Dois casos de O119, assim como um de O26 e um de O142, foram identificados como EPEC atípica; enquanto um caso, dos dois do sorogrupo O128, foi caracterizado como DAEC. Nos demais sorogrupos (um caso de O128 e dois de O125) não foram detectados genes de virulência.

Não foram encontradas cepas de EHEC, que são caracterizadas pela presença do gene *eae* e de genes para STx1 e/ou Stx2 (Tabela 2).

A EIEC foi identificada em dois casos (0,9%) através da detecção do gene *inv* (Tabela 2).

A ETEC foi caracterizada em 4,1% dos pacientes (9/219) com diarréia aguda, todas as cepas contendo genes para a produção da toxina LT e uma, também o gene para a toxina ST (Tabela 2). Houve associação da ETEC com outros grupos de agentes infecciosos em seis casos: três com o RV (um destes também com *Salmonella*), dois com *G. lamblia* e um com *S. sonnei*.

As DEC caracterizadas como DAEC e EAEC de crianças com diarréia aguda estiveram presentes em 20,6% e 9,1%, respectivamente, e estavam em associação com dois ou mais enteropatógenos em 48,9% (22/45) e 50% (10/20) respectivamente.

De 78 crianças sem diarréia (Grupo IV), a *E. coli* foi caracterizada bioquimicamente em 68 amostras fecais, que foram submetidas à pesquisa de genes de virulência através de hibridização. Trinta e uma (45,6%) DEC foram encontradas, assim distribuídas: EPEC atípica em 10,3%, ETEC em 1,5%, EAEC em 20,6% e DAEC em 16,2%. Não foram detectadas EPEC típica, EHEC ou EIEC em nenhum destes casos (Tabela 2 e Gráfico 5). Houve uma associação de EPEC atípica com DAEC.

Tabela 2: Agentes patógenos e possivelmente patógenos bacterianos em amostras fecais de crianças com e sem diarréia aguda e significância estatística

Agente etiológico	<i>Diarréia aguda</i>	<i>Sem diarréia</i>	<i>p</i>
	% (<i>n</i> encontrado/total)	% (<i>n</i> encontrado/total)	
<i>Escherichia coli</i> :			
EPEC*	3,7% (9/241)	0	
EPEC Típica**	0,9% (2/219)	0	
EPEC Atípica**	8,2% (18/219)	10,3% (7/68)	0,08
ETEC**	4,1% (9/219)	1,5% (1/68)	0,27
EHEC**	0	0	
EIEC**	0,9% (2/219)	0	
EAEC**	9,1% (20/219)	20,6% (14/68)	0,019
DAEC**	20,6% (45/219)	16,2% (11/68)	0,53
<i>Shigella sp</i>			
<i>S. flexneri</i>	7	0	
<i>S. sonnei</i>	4	0	
<i>Salmonella sp.</i>			
	2,9% (7/241)	0	

*Aglutinação em lâmina com soro polivalente

**Ensaio de hibridização para genes de virulência

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre bactérias possivelmente patógenas como EPEC atípica ($p = 0,08$), e DAEC ($p = 0,53$) nas crianças com e sem diarréia. A EAEC foi observada em número estatisticamente significativo nas crianças sem diarréia ($p = 0,019$).

EPEC típica e EIEC só foram encontradas nas crianças com diarréia.

Analisando a distribuição de DEC nas diferentes faixas etárias, observou-se na detecção de EAEC uma diferença estatisticamente significativa em crianças maiores de 24 meses, com diarréia aguda ($p = 0,026$) em relação às sem diarréia. Nas crianças com DAEC, nenhuma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,41$) foi observada na estratificação das idades das crianças com e sem diarréia, assim como nas outras categorias de DEC (Tabela 3 e Gráfico 5).

Gráfico 5: Amostras positivas e negativas para diversas categorias de DEC pesquisadas em crianças com e sem diarréia aguda

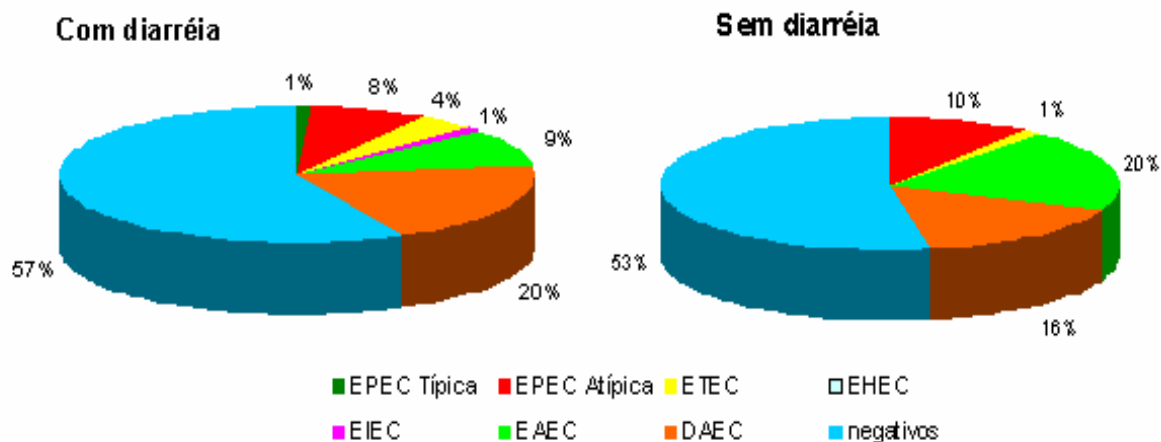


Tabela 3: Distribuição de categorias de *Escherichia coli* (EPEC atípica e típica, ETEC, EAEC e DAEC) de acordo com a estratificação de idade em crianças com e sem diarréia aguda

Categoria de <i>E. coli</i>		Faixa etária (meses)			
		0 – 12	13 - 24	> 25	Total
Diarréia Aguda	EPEC típica	1	1	0	2
	EPEC atípica	11	4	3	18
	ETEC	2	4	3	9
	EAEC	11	2	7*	20
	DAEC	26	14	5	45
Sem Diarréia	EPEC típica	0	0	0	0
	EPEC atípica	5	2	0	7
	ETEC	1	0	0	1
	EAEC	8	6	0*	14
	DAEC	8	1	2	11

* $p = 0,009$

5.2.1.2. *Shigella* e *Salmonella*

Através de reações sorológicas, *Shigella* e *Salmonella* foram detectadas em 4,6% (11/241) e em 2,9% (7/241) dos casos, respectivamente. Nestes casos, quando colônias Lac+ compatíveis bioquimicamente com *E. coli* estavam presentes (dez das onze amostras positivas para *Shigella* e cinco das sete para *Salmonella*), as amostras também foram submetidas à pesquisa de DEC por testes de hibridização e todas, à pesquisa de vírus.

A *Shigella* foi detectada como agente etiológico único em seis casos; em dois, associada com EPEC atípica (um destes também com DAEC), em dois, com RV (um com EAEC) e em um, com ETEC. As espécies identificadas foram *S. flexneri* (7) e *S. sonnei* (4) (Tabela 2 e 9).

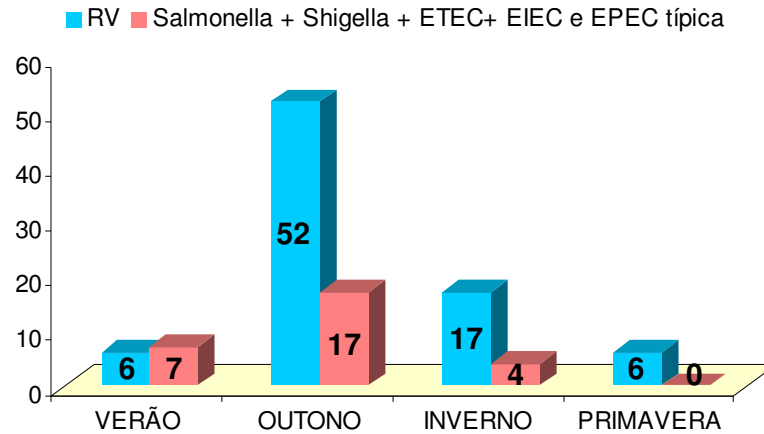
Dos sete casos onde *Salmonella* foi detectada, cinco tinham coinfeção: três com RV (cada um associada à *E. histolytica* ou à ETEC ou à EAEC e Ad), um com DAEC e um com EAEC. Três dessas amostras foram sorotipadas no laboratório de Enterobactérias da FIOCRUZ, como pertencentes à espécie *S. enterica*, sorotipos *S. Typhimurium*, *S. Derby* e *S. enterica* subespécie *enterica*.

Na distribuição por idade dos casos de *Shigella* e de *Salmonella* verificou-se que 82% (9/11) dos casos de shigelose ocorreram nas crianças acima de 12 meses ($p=0,006$), enquanto que em 42,9% (3/7) dos casos de *Salmonella*, em menores de seis meses (Tabela 4). As amostras positivas para *Shigella* ocorreram no verão e outono, enquanto aquelas com *Salmonella*, somente no outono (Gráfico 6).

Tabela 4: Identificação de amostras positivas para *Salmonella* e *Shigella* correlacionadas com a faixa etária de 241 crianças com diarréia aguda

Faixa Etária	<i>Shigella</i>	<i>Salmonella</i>
0 – 6 m	1	3
6 – 1 ano	1	1
13 a 18 m	1	0
19 a 24 m	4	1
> 25 m	4	2
Total	11	7

Gráfico 6: Correlação das amostras positivas para RV, *Salmonella*, *Shigella*, ETEC, EIEC e EPEC típica com as estações dos anos de 2003 e de 2004



5.2.2. Vírus

Antígenos de RV e de Ad foram pesquisados nas fezes de 148 e de 147 crianças com diarréia aguda (Grupo II), respectivamente, e o ácido nucléico de RV em 230 amostras (Grupo III) (Anexo 4).

5.2.2.1. EI ERA

EI ERA para detecção de antígenos de RV e de Ad resultou em 50% e em 8,2% de positividade, respectivamente. Das 12 amostras que foram positivas para Ad, nove também foram positivas para RV (Tabela 5).

Tabela 5: Agentes enteropatogênicos virais detectados em amostras fecais de crianças com diarréia aguda

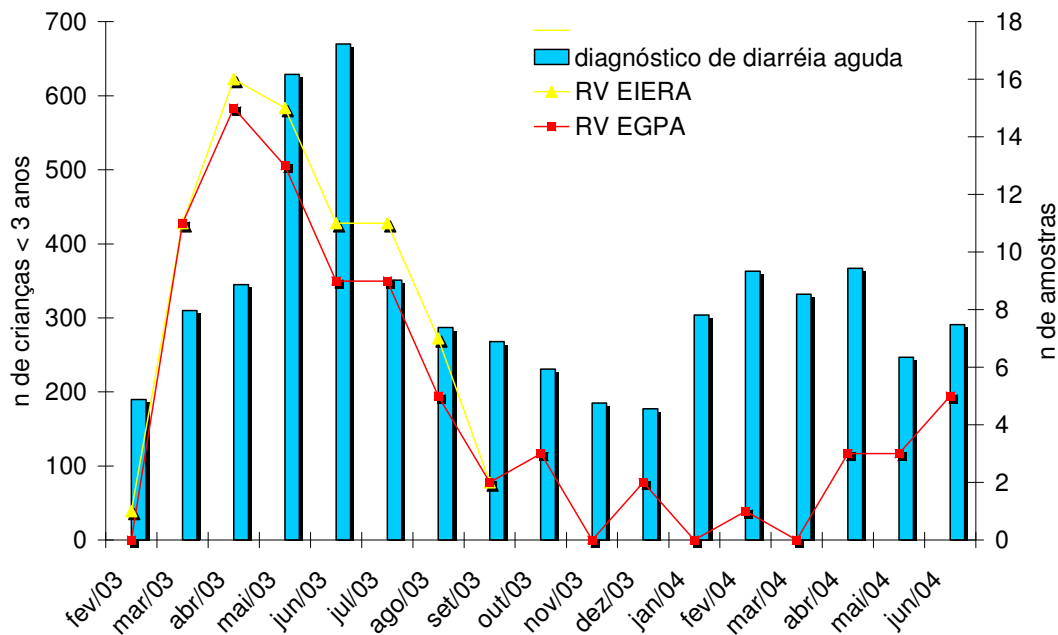
Agente etiológico	% (n /total)
Rotavírus	
EI ERA*	50 (74/148)
EGPA†	35,2 (81/230)
Adenovírus*	8,2 (12/147)

* Ensaio imunoenzimático para RV e Ad (EI ERA)

† Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)

As amostras submetidas ao EIARA foram coletadas de fevereiro a setembro de 2003, onde o número de diarréia aguda foi muito alto no HINSG (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Distribuição dos casos positivos para RV (EIARA e EGPA) e de diarréia aguda nos menores de três anos conforme meses do período estudado



5.2.2.2. EGPA

Duzentas e trinta amostras de crianças com diarréia aguda foram submetidas à extração de RNA viral, conforme descrito anteriormente, para detecção de RV por EGPA. O genoma viral foi encontrado em 35,2% (81/230) dos casos (Tabela 5). O RV foi caracterizado como sendo do grupo A em 81 casos, através do padrão de migração dos 11 segmentos de RNAdf em EGPA (4-2-3-2). Uma amostra que apresentou um perfil de bandeamento atípico: a banda cinco desapareceu e migrou entre as bandas dois e três, apresentando o perfil 5-1-3-2 (Figura 6). Esta cepa foi caracterizada como do sorogrupo A no Laboratório de Referência em pesquisa de Rotavírus, da FIOCRUZ-RJ. Os 81 casos detectados apresentaram perfil de migração longo.

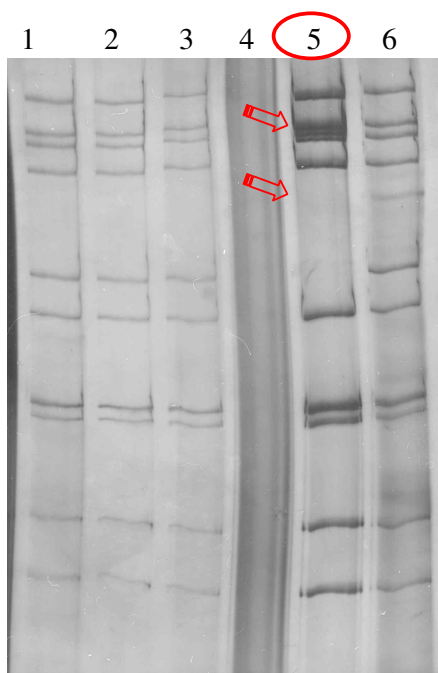


Figura 6: Eletroferotipos de RNAdf do RV após EGPA corado pela impregnação pela prata. Colunas 1-3, 6: padrão 4-2-3-2; Col.4: amostra negativa; Col. 5: genoma com reestruturação (5-1-3-2)

Das 78 amostras obtidas de crianças sem diarreia, 72 foram submetidas a EGPA e uma foi positiva para RV.

O maior número de casos positivos para RV ocorreu nos municípios da Serra e de Vitória, com 38,3% e 34,6% dos casos, respectivamente, seguidos por Cariacica, com 16,1% (Gráfico 8).

Dos casos positivos para RV, 91,4% (74/81) foram detectados em pacientes menores de dois anos, dos quais 56,8% (46/81) tinham menos de 12 meses de vida. Dos 18 casos positivos em crianças menores de seis meses, um terço estava abaixo dos três meses. Os Ad não foram encontrados acima dos 24 meses, sem correlação estatisticamente significativa ($p = 0,23$) (Tabela 6).

Gráfico 8: Distribuição do número total de amostras colhidas com diarréia aguda e de amostras positivas para RV de acordo com os municípios.

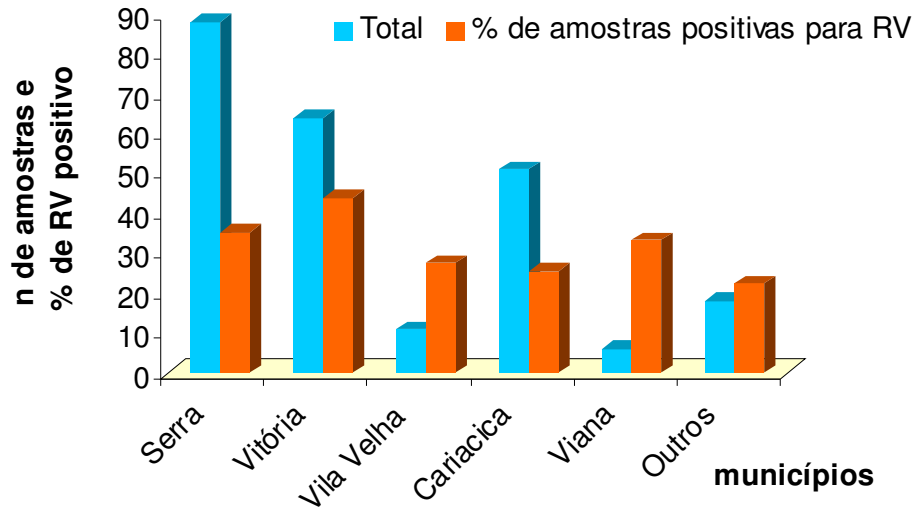


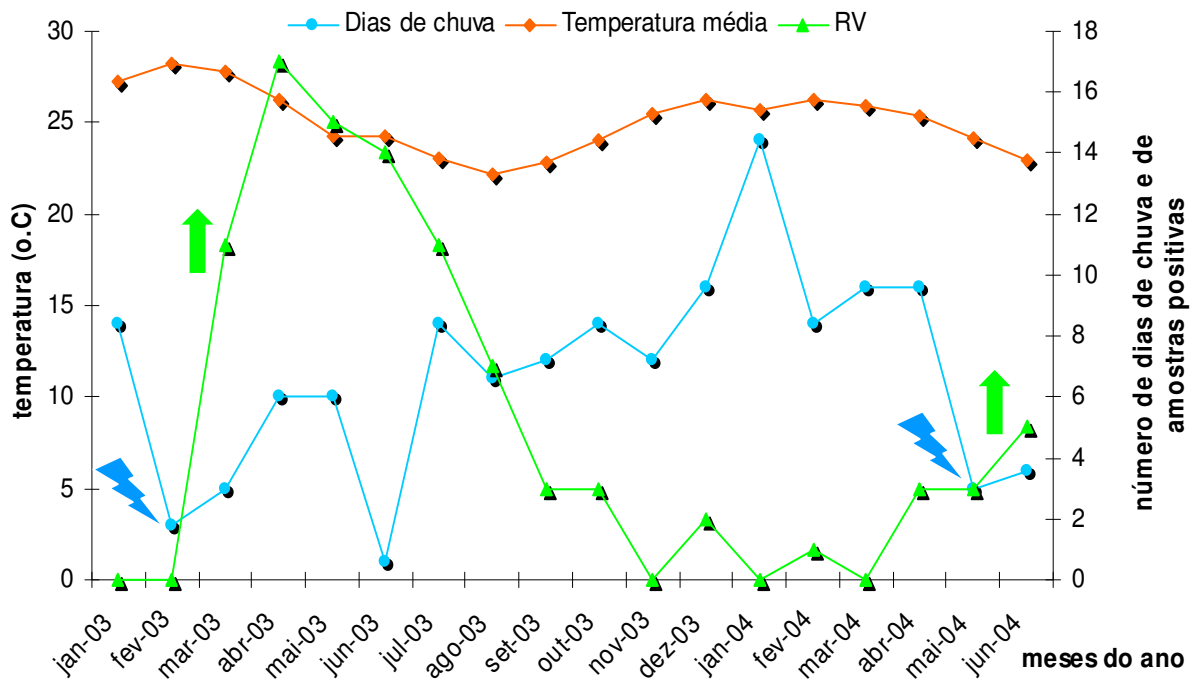
Tabela 6: Distribuição das amostras positivas para RV e Ad por EIERA (Grupo II) e para RV por EGPA (Grupo III) de acordo com faixa etária das crianças com diarréia aguda

Faixa Etária	Vírus		
	EIERA		EGPA
	Ad n (%)	RV n (%)	RV n (%)
0 – 6 m	2 (16,7)	17 (23)	18 (22,2)
7 – 12 m	3 (25)	27 (36,4)	28 (34,6)
13 a 18 m	6 (50)	16 (21,6)	21 (26)
19 a 24 m	1 (8,3)	7 (9,5)	7 (8,6)
>25 m	0	7 (9,5)	7 (8,6)
Positivos/Total	12/147 (8,2)	74/148 (50)	81/230 (35,2)

O número de casos positivos para RV foi maior durante os meses de março a setembro de 2003 (64/81) e foi proporcional ao daqueles que apresentaram diagnóstico de gastroenterite aguda (vômitos associado à diarréia aguda) nos mesmos meses (Gráfico 7).

Correlação entre alterações climáticas (temperatura e umidade) e a detecção de RV não foi observada. Após uma redução significativa dos índices pluviométricos, verificada nos meses de fevereiro de 2003 e 2004, ocorreu um aumento na positividade destes vírus nas amostras fecais (Gráfico 9).

Gráfico 9: Distribuição mensal dos casos de diarréia aguda positivos para RV e variações da temperatura média, número de dias de chuva, no período de fevereiro de 2003 a junho de 2004



5.2.3. Protozoários

Das 88 amostras fecais submetidas ao ensaio imunoenzimático para detecção de antígenos de *Cryptosporidium* spp., *E. histolytica* e *G. lamblia* (Grupo I), 26 (29,6%) foram positivas. Em três amostras, dois ou três protozoários foram detectados (Tabela 7). Protozoário foi identificado como único agente infeccioso em 9,1% dos casos (8/88) e a *G. lamblia*, estava presente em seis destes. Os demais casos foram encontrados em associação com outros grupos de patógenos (vírus e/ou bactérias) (Gráfico 10).

Tabela 7: Antígenos de protozoários detectados em 88 amostras fecais de crianças com diarreia aguda (Grupo I) através do EIE para *G. lamblia*, *E. histolytica* e *Cryptosporidium* spp.

Agente etiológico	% (n /total)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	11,4% (10/88)
<i>Entamoeba histolytica</i>	8% (7/88)
<i>Giardia lamblia</i>	14,8% (13/88)

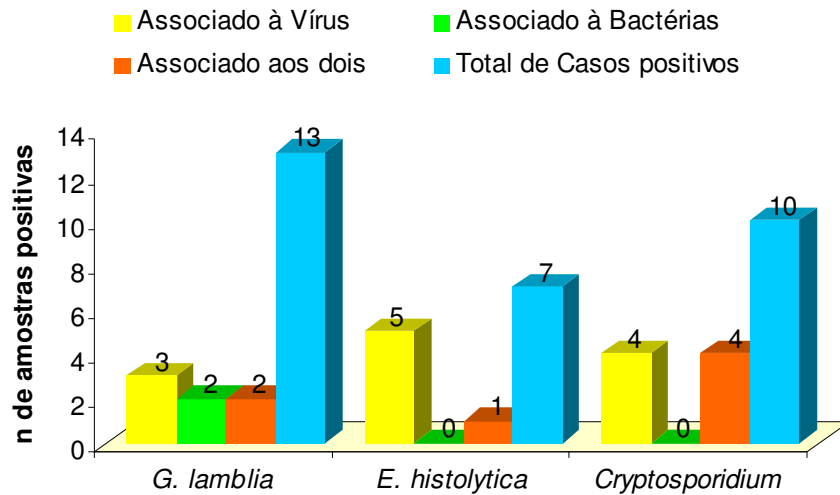
A freqüência de *Cryptosporidium* e *E. histolytica* foi semelhante nas diferentes faixas etárias, enquanto que a *G. lamblia* apresentou uma freqüência estatisticamente significativa ($p = 0,021$) em crianças maiores de 12 meses (11/13) (Tabela 8).

As associações dos protozoários encontradas com outras categorias de patógenos intestinais estão descritas a seguir (Gráfico 10).

Tabela 8: Amostras positivas para protozoários de acordo com a faixa etária das 88 crianças com diarreia aguda (Grupo I)

Faixa Etária	<i>G. lamblia</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>Cryptosporidium</i>
	n = 13	n = 7	n = 10
0 – 12 m	2	4	4
13 a 24 m	7	2	4
25 a 36 m	3	1	2
> 36 m	1	0	0

Gráfico 10: Número total de amostras positivas para *Cryptosporidium*, *E. histolytica* e *G.lamblia* e suas associações com bactérias e vírus (RV e Ad) detectadas nas amostras fecais de crianças com diarréia aguda



5.2.4. Associações entre bactérias, vírus e protozoários

No Grupo I (n = 88), em que foram pesquisados vírus, bactérias patógenas ou possivelmente patógenas e protozoários, foram encontradas 32 associações entre as diferentes categorias de enteropatógenos: 43,8% de bactérias com vírus (14/32), 28,1% de protozoários com vírus (9/32), 21,9% com as três categorias (7/32) e 6,3% de bactérias com protozoários (2/32) Das 35 bactérias identificadas, nove eram agentes clássicos de diarréia (EPEC típica, ETEC, *Shigella*, *Salmonella*) (Diagrama 1).

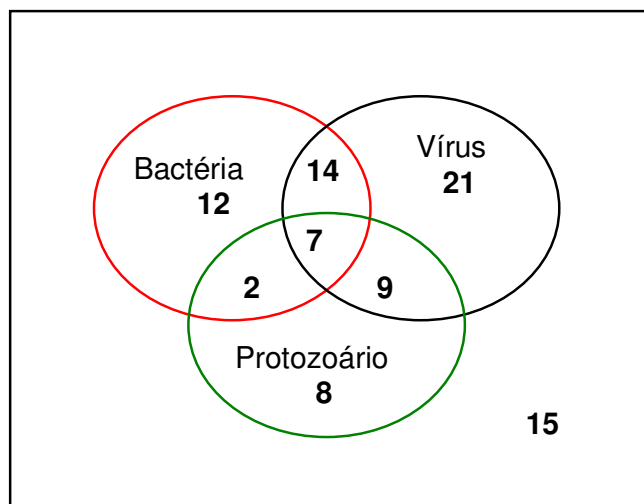


Diagrama 1: Associação inter e intracategorias de patógenos detectados em 88 amostras fecais de diarréia aguda (Grupo I)

Das 32 associações entre as diferentes categorias, os vírus estiveram presentes em 30 casos (93,8%), seguidos pelas bactérias em 23 (71,9%) e pelos protozoários em 18 (25%). Correlacionando o número de associações e o número total de amostras positivas por categoria encontradas nas 88 amostras, o maior número de associações observadas ocorreu nas amostras positivas para protozoários (18/26), seguidos pelas bactérias (23/35) e pelos vírus (30/52) (Diagrama 1).

Foram observadas 18 associações de protozoários com vírus ou bactérias: sete de 13 casos positivos para *G. lamblia*, cinco destes associados a agentes virais (quatro com RV e um com Ad); seis de sete casos de *E. histolytica* (cinco com RV e um com Salmonella); oito de dez casos *Cryptosporidium*, todos com RV. O protozoário que apresentou maior prevalência isoladamente foi *G. lamblia* (Gráfico 10).

Associações entre bactérias e vírus (RV e Ad)

No Grupo II, onde RV, Ad e bactérias foram pesquisados, foram encontradas 32 (21,8%) associações entre vírus e bactérias. A maior frequência das associações encontrada entre bactérias e RV (74,3 %), seguido de bactérias e RV e Ad (14,3%) e entre RV e Ad (8,6%) (Diagrama 2).

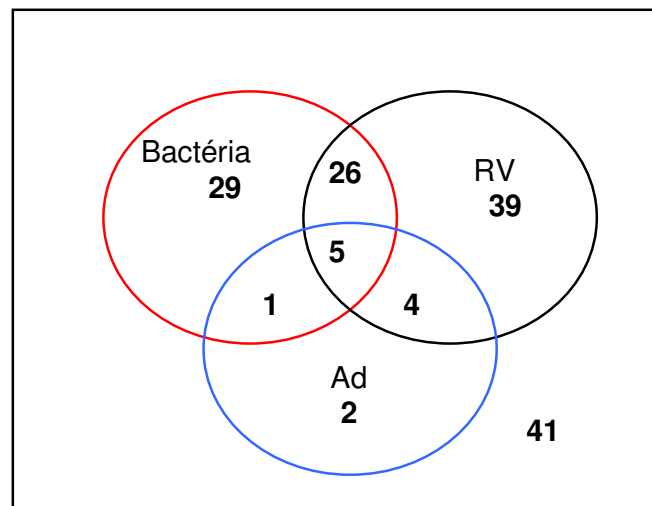


Diagrama 2: Associação entre bactérias, RV e Ad detectados em 147 amostras fecais de diarréia aguda (Grupo II)

As associações encontradas representam 24,5% (36/147) do total de amostras fecais positivas com enteropatógeno classicamente descritos como agentes etiológicos de diarréia aguda em crianças (RV, Ad, EPEC típica, ETEC, *Salmonella* e *Shigella*) ou não (EPEC atípica, EAEC e DAEC).

No grupo III, 230 amostras fecais foram submetidas a EGPA para detecção do RNA viral, assim como a detecção de bactérias por métodos sorológicos ou biomoleculares. Dos 138 casos positivos para qualquer dos patógenos pesquisados, houve associação em 26,1% (36/138) de bactérias patógenas ou possivelmente patógenas com RV (EGPA) ou entre si. Considerando categorias patógenas e possivelmente patógenas de DEC, 5,8% (8/138) e 18,1% (25/138), respectivamente, estiveram associadas ao RV (Diagrama 3).

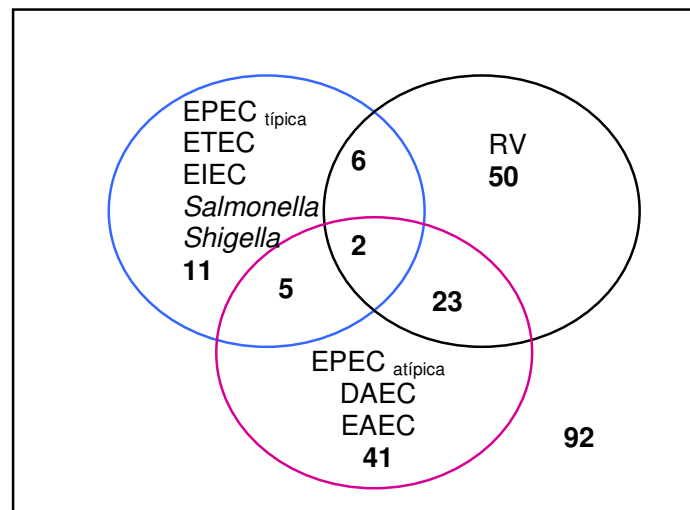


Diagrama 3: Associação entre bactérias e RV detectados em 230 amostras fecais de diarréia aguda (Grupo III)

5.2.5. Quadro clínico das crianças com diarréia e associação com dados sócio-demográficos

Dentre os sinais e sintomas observados nas crianças com diarréia aguda, vômitos, evacuações com aspecto líquido e febre foram os mais encontrados (Tabela 9).

Tabela 9: Sinais e sintomas clínicos das crianças com diarréia aguda

Sinais e Sintomas	% (n / total)
Febre	70,6 (168/238)
Vômitos	87 (208/239)
Anorexia	67,8 (162/239)
Dor abdominal (> 6 m)	10,7 (20/187)
Coriza ou tosse	54,6 (130/238)
Evacuações líquidas	83,8 (201/240)
Sangue nas fezes	14,6 (35/239)
Muco nas fezes	55,2 (132/239)
Desidratação	42,4 (101/238)

Nos casos onde as DEC foram detectadas, as principais queixas foram as evacuações líquidas e os vômitos, seguidos de febre e dor abdominal, que ocorreram em mais de um terço dos casos. A desidratação foi identificada em 38 casos (43,7%). Considerando somente as categorias detectadas e classicamente aceitas como patógenas (EPEC típica, ETEC e EIEC), os sinais e sintomas mais freqüentes foram vômitos, anorexia, dor abdominal e presença de muco nas fezes, além de uma menor taxa de desidratação (11%) em relação a outros grupos de enteropatógenos (Tabela 10, Diagrama 3).

Sangue nas evacuações não foi encontrado nos casos de EIEC (Tabela 10).

Nos casos em que *Shigella* foi isolada, os sintomas mais comuns foram anorexia (90%) seguida de dor abdominal, febre e vômitos. A procura de atendimento médico nestes casos ocorreu de um a sete dias do estabelecimento de sintomas. O relato ou observação de sangue nas fezes ocorreu em três casos (27,3%) nos quais as crianças estavam no quarto dia do início da diarréia. A desidratação ocorreu em dois pacientes e evolução para reposição hidreletrolítica intravenosa, em três casos. A média de idade foi de 27 meses (variou de 6 m até 48 m). Apenas um destes relatou contato com indivíduo com sintomas semelhantes, apesar de 36,4% destes (4/11) freqüentarem creches. Todos dispunham de água potável e saneamento básico e em 54,5% (6/11) destas casas havia filtro. Não houve associação da presença da bactéria com ausência de aleitamento materno e utilização de mamadeiras e chupetas.

Os sinais e sintomas mais freqüentes referidos nas crianças onde *Salmonella* foi detectada foram vômitos e febre; sangue esteve presente em 42,9% das amostras fecais. Evolução para desidratação ou hidratação intravenosa ocorreu em três pacientes (42,9%) sendo um deles em associação com o RV. Estas crianças tinham de cinco a 36 meses de vida (média 16,6 meses), não havia relato de contato com indivíduo com sintomas semelhantes e, apenas uma destas, freqüentava creche. Acesso à água potável e ao saneamento básico ocorreu em 71,4% (5/7) das casas destes indivíduos e a presença de filtro, em 42,9% (3/7). Dos três casos onde a *Salmonella* foi isolada nas crianças com menos de seis meses de vida, todas já haviam interrompido o aleitamento materno, com introdução precoce de outros leites e/ou alimentos.

Tabela 10: Sinais e sintomas clínicos das crianças com diarréia aguda em amostras positivas para *Shigella*, *Salmonella* e DEC

Sinais e Sintomas	<i>Shigella</i> n (%)	<i>Salmonella</i> n (%)	ETEC, EIEC e EPEC típica n (%)
Febre	8 (72,7)	5 (71,4)	6 (46,1)
Vômitos	8 (72,7)	6 (85,7)	10 (76,9)
Anorexia	10 (90,8)	3 (42,9)	9 (69,2)
Dor abdominal (* > 6 m)	9 (81,8)	1 (25)	8 (61,5)
Coriza ou tosse	7 (70)	2 (28,6)	4 (30,8)
Evacuações líquidas	8 (72,7)	6 (85,7)	7 (53,8)
Sangue nas fezes	3 (27,3)	3 (42,9)	1 (7,7)
Muco nas fezes	6 (54,6)	4 (57,1)	9 (69,2)
Desidratação	2 (18,2)	3 (42,9)	3 (11)
Total de casos	11	7	13

*n positivo pesquisado > 6 m = *Shigella* 11, *Salmonella* 4, DEC 71, ETEC e EPEC típica 13.

Dos 95 pacientes com RV, detectados em amostras submetidas à EGPA e/ou EIARA, vômito esteve presente em 96,8%, febre em 74,7% e sintomas respiratórios em 54,7% dos casos. Fezes aquosas ocorreram em 90% dos casos, associadas com muco em 52,6% e com sangue em 9,5% (9/95). Dos casos onde houve relato ou visualização de sangue nas fezes, sete (87,5%) apresentavam associação com outros enteropatógenos: um com EPEC típica e *G. lamblia*, dois com DAEC, um com DAEC e *Cryptosporidium*, um com Ad, um com *E. histolytica* e um com *Cryptosporidium*. Foram encaminhadas 48 crianças (50,5%) para hidratação intravenosa por desidratação (46) e dois, por vômitos incoercíveis (Tabela 11). O relato de contactantes com os mesmos sintomas ocorreu em 13 pacientes (13,7%).

De todas as crianças com amostras positivas para o RV, 20,7% não haviam recebido leite materno e 56,5% tiveram o aleitamento materno exclusivo interrompido no terceiro mês de vida; enquanto que naquelas com menos de seis meses, este fato ocorreu em 30,4% e 87%, respectivamente. A ausência de aleitamento materno exclusivo teve uma correlação estatisticamente significativa com a positividade para o RV ($p = 0,0007$).

Ausência de água potável e/ou de rede de saneamento básico só ocorreu em 1,1% dos casos. Sessenta e dois por cento tinham filtro em casa.

Tabela 11: Sinais e sintomas clínicos das crianças com diarréia aguda nas amostras positivas com RV (EGPA e EI ERA), Ad (EI ERA) e associação de ambos (EI ERA)

Sinais e Sintomas	RV n (%)	Ad n (%)	RV e Ad n (%)
Febre	71 (74,7)	7 (58,3)	5 (55,6)
Vômitos	92 (96,8)	12 (100)	9 (100)
Anorexia	64 (67,4)	9 (75)	6 (66,7)
Dor abdominal (* > 6 m)	49 (63,6)	8 (66,7)	5 (55,6)
Coriza ou tosse	52 (54,7)	4 (33,3)	2 (22,2)
Evacuações líquidas	85 (89,5)	11 (91,7)	8 (88,9)
Sangue nas evacuações	9 (9,5)	1 (8,3)	1 (11,1)
Presença de muco nas evacuações	50 (52,6)	2 (16,7)	2 (22,2)
Desidratação	46 (48,4)	8 (66,7)	5 (55,6)
Total de casos identificados	95	12	9

*N TOTAL = RV = 77, Ad = 10 e Associação = 7

Nos pacientes onde o Ad foi detectado, todos tinham vômito e 91,7%, evacuações líquidas. Sintomas respiratórios foram observados em quatro pacientes (33,3%) e sangue nas fezes, em apenas um; este último em associação com RV, *E. histolytica* e *Cryptosporidium*.

Os principais sinais e sintomas observados nas crianças nas quais antígenos de protozoários foram detectados nas amostras fecais estão resumidos na Tabela 12.

A média de idade de acometimento foi 21,7 e 16,7 meses para *G. lamblia* e *Cryptosporidium*, respectivamente, e a *E. histolytica* teve uma média etária menor (14 meses).

As associações de *Cryptosporidium* e *E. histolytica* com outros enteropatógenos foram maiores do que cada um isoladamente (duas e uma respectivamente), portanto estes sinais e sintomas descritos são de dois ou mais enteropatógenos pesquisados presentes na mesma amostra fecal.

Dos dois casos positivos para *G. lamblia* com relato de sangue nas fezes, um apresentou EPEC típica e RV associado e referiu 14 dias de tempo de diarréia. Os sintomas respiratórios aconteceram em cinco crianças, com três destas associadas ao RV e uma ao Ad. Febre, assim como vômitos, também ocorreu em cinco casos de *G. lamblia*, todos associados aos agentes virais.

Tabela 12: Sinais e sintomas clínicos das crianças com diarréia aguda em amostras positivas para *Cryptosporidium* ou *E. histolytica* ou *G. lamblia* :

Sinais e Sintomas	<i>Cryptosporidium</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>Giardia lamblia</i>
	n (%)	n (%)	n (%)
Febre	8 (80)	6 (85,7)	9 (69,2)
Vômitos	8 (80)	7 (100)	12 (92,3)
Anorexia	9 (90)	6 (85,7)	13 (100)
Dor abdominal (* > 6 m)	8 (80)	5 (71,4)	10 (76,9)
Coriza ou tosse	7 (70)	4 (57,1)	5 (38,5)
Evacuações líquidas	10 (100)	7 (100)	11 (84,2)
Sangue nas evacuações	2 (20)	1 (14,3)	2 (15,4)
Muco nas evacuações	6 (60)	5 (71,4)	8 (61,5)
Desidratação	5 (50)	4 (57,1)	7 (53,8)
Total	10	7	13

*n total = 75 pacientes

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1. CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA ESTUDADA

Este estudo evidenciou causas infecciosas de diarréia aguda em crianças até três anos de idade, de baixo nível sócio-econômico, aspectos clínicos da doença e dados sócio-demográficos desta população.

Foram estudadas crianças com gastroenterite atendidas no HINSG, hospital terciário da rede pública estadual, referência no atendimento pediátrico dos municípios da Grande Vitória, do interior do Estado do ES ou de outros estados, pertencentes a famílias de renda baixa e, em sua maioria, suprida com acesso à água tratada e saneamento básico. Não houve diferença significativa com relação ao número de crianças do sexo masculino e feminino. Estes pacientes, provindos de seu domicílio ou encaminhadas de unidades básicas de saúde apresentavam um espectro de doença variando da forma leve à grave.

As amostras fecais colhidas de crianças sem diarréia foram obtidas em número adequado para verificar associação de determinadas categorias de DEC (EPEC atípica, EAEC e DAEC) com a etiologia da doença diarréica. Cuidados foram observados na coleta das amostras e metodologia, de acordo com o agente a ser pesquisado, como a utilização de meios seletivos e com separação de mais de uma colônia de *E.coli* para pesquisa de seus genes de virulência. As crianças foram atendidas no PS, em sua maioria, nas primeiras 72 horas de doença, o que poderia favorecer uma maior probabilidade de identificação dos enteropatógenos pesquisados.

Neste estudo, a grande maioria das crianças selecionadas tinha menos de dois anos de idade (85,8%, média - 13,6 e mediana - 11 meses). Características desta faixa etária, como uma proporção maior de líquidos (70 a 75% do peso corporal) em comparação aos adultos (60%), faz com que suas necessidades hídricas sejam maiores. Perdas através do trato gastrointestinal, superiores a percentuais de 3 a 10% da água ingerida, favorecem a evolução rápida para a desidratação associada à necessidade de reposição intravenosa de líquidos (Nelson *et al.*, 2002). Uma perda

estimada de 5 a 10 % do peso destas crianças pode contribuir para uma alta taxa de internação e progressão para complicações como o choque hipovolêmico, sobretudo quando a reposição é inadequada ou não supera as perdas. Além disso, a disseminação sistêmica de agentes infecciosos com agravo no estado hemodinâmico dos pacientes, associada à desnutrição, culmina com altas taxas de mortalidade infantil por diarréia nos países em desenvolvimento (OMS; OPAS, 2002).

A taxa de mortalidade infantil de 16,07 (2002) no Estado do Espírito Santo é considerada uma das mais baixas do Brasil, mas a taxa de mortalidade proporcional por doença diarréica de 2,7% (2002) e de hospitalização por desidratação de 9,1%, ainda são altas se comparadas a outras cidades da região Sul e Sudeste, apesar de inferior às relatadas de outras regiões brasileiras (DATASUS, 2004). Logo, este estudo apresenta sua relevância não só para elucidação da etiologia infecciosa, mas também para a avaliação de dados clínicos e epidemiológicos da diarréia infantil no Espírito Santo.

6.2. ENTEROPATÓGENOS DETECTADOS

No presente estudo, foram pesquisadas bactérias (DEC, Salmonella e Shigella), RV, Ad e protozoários (*Cryptosporidium* spp., *E. histolytica* e *G. lamblia*) em 88 casos (Grupo I), enquanto bactérias, RV e Ad foram pesquisados em 147 (Grupo II) e bactérias e RV em 230 (Grupo III). A detecção de enteropatógenos classicamente descritos ou possíveis agentes etiológicos de diarréia na população estudada foi de 83, 72,1 e 60% nos grupos I, II e III, respectivamente. Este achado é compatível com diversos estudos prévios que relataram detecção em 64 até 78% dos casos (Stewien *et al.*, 1993; Toporovski *et al.*, 1999; Scaletsky *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2002).

Deve ser levado em consideração que os agentes pesquisados, relatados nas diferentes publicações, não foram exatamente os mesmos. Além disso, esta pesquisa não incluiu agentes bacterianos dos gêneros *Campylobacter*, *Yersinia*, *Vibrio* e *Aeromonas*, assim como outros agentes virais como os calicivírus e astrovírus, que poderiam ser responsáveis pelo quadro clínico destas crianças nas quais o resultado foi negativo. Logo, outros estudos devem ser conduzidos

ampliando o número de agentes causais, na elucidação da etiologia de diarréia aguda infecciosa na população da Grande Vitória.

O perfil etiológico da doença diarréica tem se alterado mediante três principais fatores: i) nível de desenvolvimento com uso de medidas higiênico-sanitárias; ii) conhecimento dos mecanismos de patogenicidade; iii) novas metodologias de diagnóstico molecular possibilitando discriminação das categorias distintas de *E. coli*. A prevalência de enteropatógenos bacterianos clássicos (EPEC típica, ETEC, EIEC, *Shigella* e *Salmonella*) isoladamente, corresponde a menos de 11%, enquanto que os enteropatógenos virais foram detectados em percentuais maiores do que 21%, sem associação, nas amostras avaliadas. Isto evidencia que o RV se caracterizou como a causa mais importante de diarréia aguda na população estudada, fato que ocorre em países desenvolvidos com condições sanitárias adequadas (Kapikian, 2001; Parashar *et al.*, 2003 a, b).

6.3. BACTÉRIAS

Na caracterização da *E. coli* nas fezes de uma criança com diarréia aguda, a aglutinação com anti-soros polivalentes é o teste empregado na rotina de diagnóstico em laboratório de análise clínicas, após os testes bioquímicos da cultura, para a pesquisa de sorogrupos de EPEC, EIEC e do sorogrupo protótipo de EHEC. Desta forma, as outras categorias de DEC como ETEC, EAEC, DAEC e outros sorogrupos de EHEC não são identificados usualmente. A EPEC típica, classicamente envolvida na etiologia de diarréia aguda nos países em desenvolvimento (Scaletsky *et al.*, 1999, 2001, 2002 a, b; Trabulsi, 2002; Piva *et al.*, 2003; Régua-Mangia *et al.*, 2004), também não pode ser diferenciada, através da sorologia, das EPEC atípicas que tem seu papel inferido nas diarréias agudas dos países desenvolvidos (Kaper, 1996; Scotland *et al.*, 1996; Afset *et al.*, 2003; Beutin *et al.*, 2003; Robins-Browne *et al.*, 2004).

Neste estudo, também foram usados métodos diagnósticos que detectam os genes de virulência característicos de cada categoria de DEC, permitindo a detecção destes enteropatógenos.

Dentre os enteropatógenos bacterianos pesquisados, as DEC foram os agentes detectados em maior número nas amostras fecais de diarréia aguda. As categorias mais prevalentes foram a DAEC seguida pela EAEC e EPEC atípica.

A EPEC é uma categoria diarreiogênica importante nos países em desenvolvimento em menores de dois anos (Guerrant *et al.*, 1983, 1986; Black *et al.*, 1989; Gomes *et al.*, 1991; Prado & O’Ryan, 1994; Kaper, 1996; Fagundes-Neto & Scaletsky, 2000; Torres *et al.*, 2001). Em pesquisas conduzidas na região sudeste do Brasil, foram evidenciadas EPEC em 8 a 16,2% de crianças com diarréia aguda, não internadas (Gomes *et al.*, 1991; Stewien *et al.*, 1993; Mangia *et al.*, 1993; Almeida *et al.*, 1998; Toporovski *et al.*, 1999; Scaletsky *et al.*, 1999, 2002; Fagundes-Neto & Scaletsky, 2000; Medeiros *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2002; Régua-Mangia *et al.*, 2004). A pesquisa dos genes de virulência *bfp* e *eae* de todos os casos isolados de *E.coli* evidenciou EPEC típica em 0,9% dos casos de diarréia aguda. Estes casos ocorreram em duas crianças aos 12 e 15 meses de vida, ambos em associação com RV e um também com giárdia. Este achado foi significativamente inferior aos referidos anteriormente, porém, muitos destes não discriminam se a EPEC isolada foi caracterizada como típica ou atípica. Por outro lado, redução na prevalência da EPEC típica vem sendo descrita em outras partes do mundo. No Brasil, alguns relatos também têm evidenciado esta redução (Kaper, 1996; Scotland *et al.*, 1996; Scaletsky *et al.*, 1999; Trabulsi *et al.*, 2002; Afset *et al.*, 2003; Beutin *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2004; Robins-Browne *et al.*, 2004). A baixa prevalência neste estudo pode ser resultado de fácil acesso à água tratada e saneamento básico nos municípios da Grande Vitória.

No presente estudo, a sorologia com anti-soros polivalentes detectou menor número de EPEC do que a pesquisa de genes de virulência. Das nove amostras positivas pela sorologia para EPEC, a pesquisa dos genes de virulência permitiu discriminá-las em quatro casos: EPEC atípica em dois (um associado à DAEC), EAEC em um e DAEC em outro, possíveis patógenos da diarréia. Isto demonstra que o uso de anti-soros polivalentes para EPEC não discriminam diferentes categorias de DEC. Recentemente, Campos *et al.* (2004) correlacionaram diferentes sorogrupos de *E. coli* que são compartilhados com distintas categorias, inclusive com cepas reconhecidamente patógenas (EPEC típica, EHEC, e ETEC), cepas nas quais o potencial de virulência é controverso (EPEC atípica, DAEC e EAEC) e ainda, cepas

não consideradas patógenas. Portanto, a determinação da EPEC baseada somente em sorologia para detecção do antígeno O, pode erroneamente induzir à etiologia da diarréia pela EPEC.

A EPEC atípica, definida como categoria diarreiogênica no II Simpósio Internacional sobre EPEC em 1995 (Kaper, 1996; Nataro & Kaper, 1998), teve sua participação descrita em casos de diarréia em adultos e crianças, nos países desenvolvidos como na Inglaterra, Austrália, Alemanha e Noruega (Kaper, 1996; Scotland *et al.*, 1996; Afset *et al.*, 2003; Beutin *et al.*, 2003; Robins-Browne *et al.*, 2004).

A investigação dos pacientes sem diarréia evidenciou uma freqüência maior da EPEC atípica (10,3%) em relação aos pacientes com diarréia aguda (8,2%), estatisticamente não significativa, demonstrando que não se constituem agentes de diarréia aguda na população estudada na Grande Vitória. Da mesma forma, em outros estudos realizados do Brasil, esta categoria não tem sido associada à diarréia aguda em crianças, por ter sido identificada em número igual ou maior em pacientes sem diarréia (Gomes *et al.*, 1991; Almeida *et al.*, 1998; Scaletsky *et al.*, 2001; Nunes *et al.*, 2003, Régua -Mangia *et al.*, 2004). Entretanto, Campos *et al.* (2004) demonstraram a participação da EPEC atípica na diarréia aguda em crianças paulistanas, onde anteriormente havia predomínio das EPEC típicas. Portanto, estudos continuados em diferentes áreas geográficas são necessários para avaliar a participação da EPEC atípica na etiologia da diarréia aguda.

EAEC está descrita classicamente como agente etiológico de diarréia persistente em crianças (Lima *et al.*, 1992; Fang *et al.*, 1995; Bardhan *et al.*, 1998; Andrade *et al.*, 2000) e alguns autores sugerem sua relação com etiologia de diarréia aguda (Nataro & Kaper, 1998; Scaletsky *et al.*, 1999; Fagundes-Neto *et al.*, 2000, Piva *et al.*, 2003; Huang & DuPont, 2004; Regua-Mangia *et al.*, 2004). Neste estudo, a EAEC foi identificada em menor número nos casos de diarréia aguda do que nas crianças sem diarréia, estatisticamente significativa, o que demonstra que não se encontra associada à diarréia aguda na população estudada. Entretanto, a distribuição da EAEC com relação à idade das crianças evidenciou uma diferença estatisticamente significativa nas crianças com diarréia aguda após o segundo ano de vida quando comparada às crianças sem diarréia ($p = 0,026$). Esta distribuição evidencia EAEC como agente etiológico de diarréia aguda nas crianças acima dos dois anos. Por outro lado, Scaletsky *et al.* (2002) relatou que a EAEC foi quase duas vezes mais

frequente em crianças menores de cinco meses de vida com diarréia, apesar de prevalências iguais de EAEC nas crianças com ou sem diarréia, observada em todas as faixas etárias.

Metade dos casos onde EAEC foi detectada em crianças com diarréia (10/20), estava associada com um ou mais agentes infecciosos, em sua maioria em menores de dois anos de idade. Rodrigues *et al.* (2002) descreveram a EAEC em 20,4% de 54 crianças com diarréia aguda como agente único e em 41% quando outros enteropatógenos estavam associados, questionando a possibilidade desta categoria estar colonizando o trato gastrointestinal em determinada idade, sem provocar doença. No entanto, outros relatos brasileiros mostraram uma prevalência de EAEC em crianças com diarréia aguda, sem discriminação de faixas etárias, que variou de 3,1 a 19,4% e com prevalências menores nos pacientes sem diarréia sugerindo seu envolvimento como agente causal de diarréia (Almeida *et al.*, 1998; Scaletsky *et al.*, 1999, 2001; Souza *et al.*, 2001; Piva *et al.*, 2003; Régua-Mangia *et al.*, 2004).

A DAEC, descrita inicialmente através de testes de adesão em cultura de célula por Cravioto *et al.* (1979), vêm sendo investigada como possível agente etiológico de diarréia aguda em crianças. Esta categoria de DEC foi detectada no Brasil em crianças com diarréia aguda, com prevalência variando de 14,3 a 20,7% (Scaletsky *et al.*, 1999, 2001, 2002 b, c; Fagundes-Neto & Scaletsky, 2001; Souza *et al.*, 2002; Piva *et al.*, 2003). O presente estudo detectou DAEC em 20,6% dos casos de diarréia aguda e, em mais da metade destes, associada a outros enteropatógenos. Nas crianças sem diarréia, foi encontrada em 16,2% dos casos, diferença estaticamente não significativa ($p = 0,53$). Logo, estes resultados demonstram que a DAEC, assim como a EPEC atípica e EAEC não estiveram associadas à diarréia aguda, na população estudada.

Neste estudo, não houve correlação estatística de DAEC entre as diferentes faixas etárias das crianças com diarréia aguda ($p = 0,53$), embora tenha sido relatado ser mais prevalente em crianças acima de dois anos com diarréia aguda (Gomes *et al.*, 1989; Gunzburg *et al.*, 1993; Levine *et al.*, 1993; Nataro & Kaper, 1998; Scaletsky *et al.*, 1999, 2002 b). Portanto, estudos mais amplos, do tipo caso – controle, são necessários para avaliação do possível envolvimento da DAEC com diarréia aguda em diferentes faixas etárias.

A EIEC e a EHEC são responsáveis por disenteria e colite hemorrágica, respectivamente, sendo esta última também implicada como agente etiológico da SHU. Na amostra estudada, EIEC foi detectada em duas crianças com diarréia aguda, constituindo 0,9% dos casos. Embora tenha sido realizada a pesquisa por sorologia convencional, a EIEC só foi evidenciada através da pesquisa do gene *Inv*. Esta frequência condiz com outros trabalhos brasileiros que evidenciaram esta categoria em menos de 2% dos casos (Gomes *et al.*, 1991; Stewien *et al.*, 1993; Almeida *et al.*, 1998; Toporovski *et al.*, 1999; Fagundes-Neto & Scaletsky, 2000; Medeiros *et al.*, 2001; Orlandi *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2002; Régua-Mangia *et al.*, 2004).

O patotipo EHEC não foi encontrado nas amostras examinadas. Este achado está de acordo com os achados da literatura, que revelam ser baixa a prevalência desta categoria no Brasil (Almeida *et al.*, 1998; Toporovski *et al.*, 1999; Medeiros *et al.*, 2001; Orlandi *et al.*, 2001; Guth *et al.*, 2002 a, b; Souza *et al.*, 2002; Régua-Mangia *et al.*, 2004). De acordo com trabalhos realizados no estado de São Paulo, a EHEC só foi encontrada em um caso de 100 amostras (Toporovski *et al.*, 1999) e em três, de 505 casos de diarréia aguda (Guth *et al.*, 2002 a). Nenhuma destas EHEC pertencia ao sorotipo 0157:H7, contemplado pelo anti-soro disponível no mercado. Portanto, sua identificação foi feita através de pesquisas de genes de virulência. Importante ressaltar que apesar da baixa prevalência de EHEC no Brasil, em outros países, como a Argentina e o Chile ela se constitui na causa mais importante de insuficiência renal aguda em crianças (Prado *et al.*, 1997; Spizzirri *et al.*, 1997).

A ETEC, importante agente de diarréia aguda em crianças nos países em desenvolvimento, foi detectada em 4,1% (9/219) dos casos de diarréia aguda. Este índice está de acordo com relatos publicados de alguns estados brasileiros, que encontraram ETEC em 2,6 a 6% dos casos (Almeida *et al.*, 1998; Toporovski *et al.*, 1999; Fagundes-Neto *et al.*, 2000; Orlandi *et al.*, 2001; Scaletsky *et al.*, 2002 a; Regua-Mangia *et al.*, 2004). Por outro lado, um estudo realizado no estado de São Paulo por Souza *et al.*, (2002) revelou a presença de ETEC em 12,3%, compatível com estudos brasileiros anteriores que apresentavam taxas mais altas de detecção, que variaram de 10,2 a 23,5% (Guerrant *et al.*, 1983; Queiroz *et al.*, 1987; Kitagawa *et al.*, 1989; Mangia *et al.*, 1993; Sarinho *et al.*, 1993).

A ETEC também foi detectada em uma criança assintomática (1,5%), de seis meses de idade, provinda de Rondônia, que não tinha filtro, acesso à água potável e rede de esgoto na sua moradia. Esta criança não teve seguimento para avaliar possível evolução para o quadro diarréico. Sabe-se que, em regiões endêmicas como países em desenvolvimento, a maioria das infecções ocorre até os três anos de vida, com desenvolvimento de anticorpos para fatores de colonização (CFs) e para a toxina LT da bactéria, afetando sua colonização na mucosa intestinal e neutralizando atividade da toxina (Nataro & Kaper, 1998; Guth, 2000). Portanto este caso também poderia corresponder a infecção subclínica pela ETEC, levando em consideração a origem da criança e suas condições de vida, o que sugere exposição prévia à ETEC. Esta criança já havia apresentado outros episódios de diarréia.

De todas as cepas isoladas mundialmente, cerca de 35% expressam genes para toxinas LT e ST, enquanto 35%, apenas para ST e o restante, para LT (Gaastra *et al.*, 1996). Neste estudo, genes para a produção da toxina LT foram detectados em todas as amostras positivas para ETEC e em uma, também o gene para a toxina ST. Este achado sugere que se trata de primoinfecção com cepa produtora de LT, pois esta toxina induz a formação de Ac neutralizante. Outros relatos brasileiros já demonstraram uma freqüência maior de cepas produtoras de LT nas crianças com diarréia aguda (Sarinho *et al.*, 1993; Toporovski *et al.*, 1999).

Das nove amostras positivas, sete eram de crianças maiores do que um ano, indicando a aquisição desta categoria de DEC após o primeiro ano de vida, através de melhoria dos cuidados materno - infantis, sobretudo na higiene ambiental e alimentar nesta faixa etária, fato que contribui para redução na sua freqüência, associado aos anticorpos protetores veiculados através da ingestão de leite materno, sobretudo naqueles agentes de veiculação por água e alimentos contaminados (Curtis, 2001; Leclerck *et al.*, 2002).

É descrita uma redução da freqüência das DEC, sobretudo da EPEC, relacionada à melhoria do padrão higiênico-sanitário das populações com conseqüente repercussão na morbi-mortalidade infantil (Guerrant *et al.*, 1983; Feachem, 1984; Scaletsky *et al.*, 1984, 1999; Esrey *et al.*, 1985; Trabulsi *et al.*, 1988, 2002; Tomasi *et al.*, 1994; Waldman *et al.*, 1997; Nataro & Kaper, 1998). Uma baixa freqüência para patógenos clássicos como a EPEC, EIEC e ETEC, em relação à pesquisas prévias pode refletir melhoria das condições de sanitárias de uma população (Guerrant *et al.*,

1983; Trabulsi *et al.*, 1988, 2002; Gomes *et al.*, 1989, 1991; Kitagawa *et al.*, 1989; Mangia *et al.*, 1993; Stewien *et al.*, 1993; Almeida *et al.*, 1998; Scaletsky *et al.*, 1999). Isto se reflete pelos dados de acesso à água potável (97,8%) associado ao saneamento básico (69%) nas famílias das crianças estudadas.

Os resultados obtidos neste estudo revelam a importância da implantação de estudos biomoleculares a fim de evidenciar adequadamente as DEC e alterações nos seus padrões epidemiológicos em cada região.

As bactérias do gênero *Shigella*, agentes infecciosos mais comuns de disenteria, foram isoladas em 4,6% dos casos, resultado semelhante a outros estudos brasileiros (Gomes *et al.*, 1991; Stewien *et al.*, 1993) embora percentuais maiores de 6,2 até 21%, já tenham sido relatados (Almeida *et al.*, 1998; Toporovski *et al.*, 1999; Fagundes-Neto & Scaletsky, 2000; Medeiros *et al.*, 2001; Scaletsky *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2002; Orlandi *et al.*, 2003). A espécie identificada em maior número de amostras foi a *S. flexneri* (7/11), que corresponde à que tem sido descrita na literatura em países em desenvolvimento e na população de baixo nível sócio-econômico, enquanto que nos países desenvolvidos, a *S. sonnei* é a espécie mais isolada (Niyogi, 2005).

Neste estudo, houve maior incidência de casos de *Shigella* acima de um ano de vida (8/11 casos) ($p = 0,006$), descrição clássica de literatura que relata predomínio em crianças de um a cinco anos (Sears & Kaper, 1996; Nataro & Kaper, 1998; Niyogi, 2005).

A apresentação clínica de disenteria ocorre em 30 a 50% dos casos de Shigelose (Sears & Kaper, 1996), Durante a infecção, a *Shigella* coloniza o intestino grosso, invade as células M ou enterócitos através do plasmídeo de invasividade IpaD, rompe a vesícula de endocitose e se dissemina movida por um rearranjo de actina no pólo das células (Sears & Kaper, 1996). A lise das células invadidas, onde a *Shigella* prolifera, com quimiotaxia de polimorfonucleares e ulcerações da mucosa, caracterizam o quadro disentérico. Porém, no início da infecção, as fezes apresentam-se com a consistência diminuída pela produção da toxina e sem sangue. Três dos onze casos (27%) positivos para *Shigella* apresentaram sangue nas fezes nas amostras deste estudo. Estes casos correspondem àqueles que buscaram atendimento médico no quarto dia de diarréia enquanto que dos casos restantes, quatro foram conduzidos ao PS no primeiro dia e os demais quatro, de 3 a 7 dias do

estabelecimento do quadro clínico. O tempo médio de diarréia à consulta, justificaria o encontro de sangue em pequeno número dos casos positivos para *Shigella* estudados (Sears & Kaper, 1996; Niyogi, 2005).

A *Salmonella* pode ser responsável por quadros de diarréia leve até quadros graves dependendo do sorotipo, da idade e das condições de saúde do hospedeiro (Pickering & Cleary, 1997). No presente estudo, foi detectada uma prevalência de 2,9% de *Salmonella* nas crianças com diarréia, de acordo com outros relatos brasileiros que a detectaram de um até 6,9% dos casos (Mangia *et al.*, 1993; Stewien *et al.*, 1993; Almeida *et al.*, 1998; Toporovski *et al.*, 1999; Fagundes-Neto & Scaletsky, 2000; Medeiros *et al.*, 2001; Orlandi *et al.*, 2001; Scaletsky *et al.*, 2001, 2002 b, c; Souza *et al.*, 2002).

Dos sete casos positivos, a *Salmonella* foi detectada em cinco nas crianças abaixo dos dois anos, sendo três casos abaixo dos seis meses de vida, fato também observado em outros trabalhos (Almeida *et al.*, 1998; Medeiros *et al.*, 2001).

Houve identificação da *Shigella* e *Salmonella* somente nos meses de outono e verão condizente com a literatura que demonstra a disseminação destes enteropatógenos nas estações mais quentes do ano (Pickering & Cleary, 1997; Niyogi, 2005).

O quadro clínico das crianças com amostras positivas para categorias de DEC classicamente descritas como agentes etiológicos de diarréia (EPEC típica, ETEC e EIEC), cursou com vômitos, febre e sintomas respiratórios em menor prevalência comparados aos de outros enteropatógenos. Nestes casos, a evolução do quadro diarréico para desidratação ocorreu em apenas 11% dos casos, significativamente menor do que 50% dos casos de RV. Uma menor taxa de desidratação também foi observada nos casos positivos para *Shigella* ou *Salmonella*, o que corrobora com dados de literatura (Pickering & Cleary, 1992; Brunser *et al.*, 1997; Campos, 2004).

6.4. VÍRUS

Os RV representam uma causa importante de diarréia no mundo (Parashar *et al.*, 2003 a e b). No Brasil, sua freqüência foi relatada variando de 4,1 a 41% (Gomes *et al.*, 1991; Mangia *et al.*, 1993; Stewien *et al.*, 1993; Timenetsky *et al.*, 1993; Gusmão *et al.*, 1999; Toporovski *et al.*, 1999; Fagundes-Neto & Scaletsky, 2000; Fernandes *et al.*, 2000).

al., 2000; Da Rosa e Silva *et al.*, 2001; Meneghetti *et al.*, 2001; Scaletsky *et al.*, 2001; Orlandi *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 2003; Carmona *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2004).

Na amostra estudada, os RV foram os enteropatógenos detectados em maior número como agentes únicos ou em associação, encontrados em 35,2% do total de casos pesquisados, semelhante a outros relatos brasileiros (Cardoso *et al.*, 1992, 2003; Teixeira *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2002; Carmona *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2004).

O RV apresenta características de sazonalidade, com sua freqüência aumentando nos meses mais frios e secos do ano (Kapikian, 2001). O período de março a setembro de 2003 foi o de maior positividade para RV nas amostras colhidas nos 17 meses deste estudo, coincidindo com o relato em outras localidades brasileiras tais como Minas Gerais, no mesmo período (Da Rosa e Silva *et al.*, 2001) e em São Paulo, Goiânia e Rio de Janeiro, de maio a setembro (Gomes *et al.*, 1991; Cardoso *et al.*, 1992; Pereira *et al.*, 1993). Foi descrita uma estabilidade maior nas partículas do RV em ambientes com baixa umidade (Kapikian, 2001). A região metropolitana de Vitória não apresenta estações do ano tão bem definidas como em outras regiões do país e possui uma alta porcentagem de umidade relativa do ar por ser uma cidade litorânea. Neste estudo, a correlação de maior positividade das amostras para RV com menores índices de pluviosidade ou com temperaturas mais baixas não foi evidenciada. Entretanto, houve uma diminuição de pluviosidade em fevereiro de 2003 que coincidiu com o aumento expressivo de casos de diarréia em crianças e amostras positivas para RV nos meses consecutivos, o que poderia ser explicado pela maior disseminação de partículas virais a partir daquele momento.

Nas mesmas amostras de fezes em que o RV foi pesquisado através da detecção de antígenos (EIERA) e de ácido nucleico viral (EGPA), uma positividade de 50% (74/147) e de 41,2% (61/148) foi encontrada, respectivamente. Sessenta casos foram positivos para ambos métodos gerando uma concordância de 90% entre os dois métodos diagnósticos, considerados de boa sensibilidade e especificidade (Wilhelmi *et al.*, 2001; Altindis *et al.*, 2004).

Portanto, o método de EIERA, aparentemente detectou um número maior de casos positivos para RV do que EGPA. Entretanto, deve ser considerado que no início da infecção viral, um grande número de antígenos do RV pode ser detectado, período

em que a quantidade de ácido nucléico pode não ser suficiente para ser evidenciado por método de detecção direta sem amplificação do genoma viral, gerando resultados divergentes de acordo com a metodologia utilizada. A técnica de RT-PCR para a detecção de ácido nucléico do RV foi realizada nestas amostras positivas por EIERA e negativas por EGPA, com resultado negativo em todas. A não detecção do ácido nucléico do RV pode se dever à degradação do mesmo ou ainda, ao fato da infecção não ter sido causada pelo RV. Neste caso, a reação obtida pelo EIERA seria falso-positiva. Resultados falso – positivos podem ocorrer pela presença de fatores como proteína A de *Staphylococcus*, fator reumatóide ou peroxidase nas amostras fecais, conforme o fabricante deste teste. Para avaliar estes casos que foram positivos para ambos, testes confirmatórios deveriam ser realizados, mas não tivemos mais *Kits* para sua realização.

Os RV dos grupos A, B e C estão associados a infecções humanas no mundo, sendo o RV do grupo A (RVA) o mais prevalente, sobretudo em crianças (Kapikian *et al.*, 2001; Parashar *et al.*, 2003 a, b). O perfil eletroforético pela EGPA revelou 81 amostras fecais positivas para o RV pertenciam ao grupo A. Nenhum RV do grupo B ou C foi encontrado nestas amostras, apesar de alguns relatos de infecções em crianças e adultos com diarréia aguda no Brasil (Souza *et al.*, 1998; Gabbay *et al.*, 1999; Araújo *et al.*, 2004).

Os RVA apresentam, caracteristicamente, o perfil eletroforético 4-2-3-2. Uma amostra apresentou o perfil eletroforético 5-1-3-2, sugerindo um possível rearranjo viral, que tem sido descrito para o RV, evento que pode ser observado em vírus cujo genoma é de natureza segmentada. Os rearranjos mais comumente encontrados ocorrem nos segmentos 5 e 11, sendo que no 11 confere vantagens para o RV na sua replicação e na estabilidade das partículas virais, sendo mais freqüente em pacientes imunossuprimidos (Kapikian, 2001).

Houve uma amostra positiva para o RV (EGPA) em paciente de 11 meses de vida que fazia parte do grupo controle. Existem relatos de infecção sub-clínica por RV na dependência de fatores, como a virulência da cepa, determinados alelos de VP4 (Ramig, 2004). Há possibilidade de que este paciente estivesse no período de incubação da doença diarreica, visto que a sintomatologia à consulta médica foi de anorexia e febre, sem quadro clínico de diarréia, mas com modificação da

consistência das fezes verificada durante a coleta. Entretanto, a evolução clínica desta criança não foi avaliada.

Kapikian *et al.* (2001) e Clark & Mc Kendrick (2004) relataram que 90% das crianças até os três anos de idade apresentam pelo menos uma infecção por RV. Neste estudo, a maior prevalência de amostras positivas para o RV foi verificada em crianças menores de 18 meses de idade (82,7%), sendo pouco mais da metade abaixo de um ano de idade.

Para que haja infecção produtiva de enterócitos pelo RV, a proteína VP4 necessita ser previamente clivada por proteases intestinais. A imaturidade do trato gastrointestinal com menor expressão de proteases intestinais, nos neonatos, contribuiria para restrição nesta infecção ou ainda, manifestações clínicas ausentes ou brandas (Ramig, 2004). No entanto, das 28 crianças estudadas com menos de três meses de vida, cinco foram positivas para RV. Todas estas cinco crianças estavam sem aleitamento materno. É relatada a importância dos fatores anti-infecciosos do leite materno para redução de doenças diarreicas, sobretudo em países em desenvolvimento, assim como sua proteção na diarreia por RV (Parashar, *et al.*, 1998; Kapikian, 2001). Além da manutenção de uma nutrição protéico-calórica adequada que fornece condições adequadas a um bom funcionamento do sistema imunológico do lactente, a presença de fatores pré-bióticos, imunoglobulinas, lisozima, lactaderina, interferon e leucócitos no leite materno favorecem a proteção contra diarreia aguda infecciosa (Betrán *et al.*, 2001, 2004; Fuchs & Victora, 2002; Escuder *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2003; Carratala Munuera *et al.*, 2005; Newburg *et al.*, 2004, 2005).

O Aleitamento materno exclusivo até os primeiros 30 dias ocorre em 55,3% das crianças capixabas e este percentual cai para 10,8% dos casos, quando observado até o 6º mês de vida (DATASUS, 2004). Obtivemos uma correlação estatisticamente significativa da infecção por RV nas crianças sem aleitamento materno ou com introdução precoce de alimentos em detrimento do leite materno, o que demonstra a importância do incentivo do aleitamento materno exclusivo até o sexto mês de vida para proteção dos lactentes.

O quadro clínico decorrente da infecção por RV cursa com vômitos em 50 a 60% dos casos e de muco em 25% das evacuações diarreicas, sem referência de sangramento (Kapikian, 2001). Neste estudo, nas crianças em que houve detecção

do RV foi observada uma proporção significativa de vômitos (96,3%) e de muco nas evacuações (53,1%). A presença de sangue ocorreu em quase 10% dos casos, embora não seja característica da patogênese do RV. Sete de oito casos de sangramento estavam em associação com outros patógenos, mas apenas um deles com característica clássica de possível invasão de mucosa intestinal (*E. histolytica*). Toporovsky *et al.* (1999) e Souza *et al.* (2002) também verificaram sangue em uma de 21 e duas de 33 amostras fecais positivas para RV, respectivamente. É importante ressaltar que outros patógenos que podem apresentar fezes com sangue, tais como *Campylobacter* sp ou *Yersinia enterocolitica*, não foram pesquisados.

Mais da metade dos casos positivos para RV evoluiu para a hidratação intravenosa, enquanto que outros autores relataram esta evolução em 23 a 27% dos casos (Timenetsky *et al.*, 1993; Souza *et al.*, 2002). Vômitos, ocorridos em quase totalidade dos casos, poderia justificar uma maior perda hidreletrolítica com desidratação e dificuldades da reidratação por via oral. Fatores intrínsecos ao RV, tais como cepas mais virulentas, ou ao seu hospedeiro, como a desnutrição protéico-calórica, poderiam ser responsáveis pela exacerbação dos sintomas (Ramig, 2004). Deve ser levado em consideração que os pacientes atendidos no PS hospitalar podem ser selecionados dentre aqueles que não obtiveram melhora com a administração do soro de reidratação industrializado ou de manipulação caseira por orientação ambulatorial ou mesmo cultural, conseqüentemente com pior quadro clínico, requerendo hidratação intravenosa. Carmona *et al.* (2004), verificaram uma maior prevalência de RV em pacientes com diarréia aguda grave que necessitavam de internação contra os que não necessitavam. A evolução completa dos casos encaminhados para a terapia de reidratação IV não pôde ser inferida devido a falta de seguimento destes. Outros estudos se fazem necessários para que seja realizada uma correlação com o tipo de cepa circulante no período, a idade com maior susceptibilidade para reidratação IV e a evolução clínica.

Alguns sorotipos de Ad, denominados adenovírus entéricos, estão relacionados à diarréia aguda infantil (Glass & Kilgore, 1997; Horwitz, 2001). Antígenos do Ad foram encontrados em 8,2% das amostras fecais diarréicas estudadas, todas com idade inferior aos dois anos de vida. Esta prevalência foi maior comparada a outros relatos brasileiros cuja identificação variou de 1,5 a 3,1% em amostras fecais de crianças atendidas ambulatorialmente (Timenetsky *et al.*, 1987; Cardoso *et al.*, 1992; Mangia

et al., 1993; Pereira *et al.*, 1993; Soares *et al.*, 2002). Deve ser levado em consideração que os anticorpos de captura do teste utilizado para detecção deste patógeno não discrimina entre cepas entéricas e não-entéricas. Soares *et al.* (2002) detectaram Ag deste vírus em 4,9% de 1420 amostras diarréicas de diversas cidades brasileiras, através de ensaio imunoenzimático. Porém, o isolamento viral e a pesquisa com Ac monoclonais detectaram 1,55% de Ad entéricos. Pereira *et al.* (2004), através da pesquisa por reação em cadeia pela polimerase (PCR) para o gene da fibra de Ad, em amostras fecais positivas para Ag de Ad (EI ERA), revelou que 65% destas correspondiam ao gênero F (entérica). Logo, estudos complementares seriam úteis na discriminação das espécies entéricas de Ad.

O Ad foi encontrado associado ao RV em nove de 12 casos estudados (75%). O RV e Ad foram encontrados infectando um mesmo indivíduo em diversos relatos (Waters *et al.*, 2000; Giordano *et al.*, 2001; Román *et al.*, 2003). O teste positivo pode conter antígenos de RV e Ad, mas resultado falso – positivo pode ocorrer pela presença dos mesmos fatores citados anteriormente para o RV. Da mesma forma, teste confirmatório segundo seus fabricantes, seria necessário.

No quadro clínico apresentado pelas crianças com Ad, vômito, anorexia e dor abdominal foram os sintomas mais prevalentes. Sangue nas fezes foi encontrado em uma amostra com coinfeção com RV e *E. histolytica*. A interpretação adequada do quadro clínico destas amostras positivas para Ad, fica prejudicada devido ao grande número de associações com outros agentes, principalmente RV e a ausência de metodologia, neste estudo, que diferencie cepas de Ad entéricos dos não entéricos.

6.5. PROTOZOÁRIOS

Os protozoários foram detectados através da pesquisa de seus antígenos específicos no ensaio imunoenzimático (Prospect em microplaca – Alexon – Biobrás) considerado de alta sensibilidade e especificidade (Garcia & Shimizu, 1997; Aldeen *et al.*, 1998; Boone *et al.*, 1999)

A amebíase é uma das doenças responsáveis por uma alta morbimortalidade mundial com estimativas de 40 mil mortes/ano (OMS) e cursa com apresentação clínica de disenteria. A detecção de 8% (7/88) de *E. histolytica* nas fezes desta

amostragem está de acordo com a maioria de trabalhos brasileiros publicados (Guerrant *et al.*, 1983; Gennari-Cardoso *et al.*, 1996; Toporovski *et al.*, 1999; Fagundes Neto & Scaletsky, 2000; Orlandi *et al.*, 2001; Scaletsky *et al.*, 2002 b; Souza *et al.*, 2002). Apenas Schnack *et al.* (2003), utilizando mesmo método imunoenzimático, encontraram a *E. histolytica* em 56,4% dos casos de diarréia aguda em menores de cinco anos, com maior prevalência nos maiores de 12 meses e importante associação (53%) com outros enteropatógenos, inclusive com a detecção de *Cryptosporidium* em 85% dos casos. Nas amostras estudadas, o grande número de associações observadas com o RV (6/7), compromete a interpretação de sua correlação etiológica na diarréia aguda. Estudos pareados com controles também seriam úteis na determinação das estirpes de *E. histolytica* que teriam forma clínica de doença invasiva, com apresentação sob forma de complicações extra-intestinais, de alta morbi-mortalidade daquelas que não o são.

Cryptosporidium spp., agente etiológico de diarréia em pacientes imunossuprimidos e também em crianças, foi detectado em 11,4% (10/88) em crianças estudadas. Esta frequência foi maior do que a encontrada por outros autores brasileiros que variou de 0,5 A 8,4% dos casos (Stewien *et al.*, 1993; Gennari-Cardoso *et al.*, 1996; Saredi & Bava, 1998; Newman *et al.*, 1999; Toporovski *et al.*, 1999; Medeiros *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2003). Entretanto, outros estudos em países em desenvolvimento apresentaram números iguais ou superiores aos encontrados em crianças menores de cinco anos (Mangini *et al.*, 1992; Nuñez *et al.*, 2003; Schnack *et al.*, 2003; Adjei *et al.*, 2004; Simango *et al.*, 2004; Abdel-Messih *et al.*, 2005). A associação deste agente com outros protozoários e com o RV em oito das dez amostras não permite inferir seu real papel na diarréia aguda.

G. lamblia esteve presente em 14,8% (13/88), em seis casos isoladamente e em sete em associação com RV, Ad, *Cryptosporidium*, EPEC típica ou ETEC. As crianças maiores de um ano com amostras positivas para *G. lamblia* apresentaram correlação estatisticamente significativa quando comparadas às maiores de um ano. É sabido que a *G. lamblia* acomete todas as faixas etárias, mas alguns relatos também encontraram-na em crianças maiores com diarréia aguda, sobretudo em desnutridos (Pickering & Cleary, 1997; Toporovski *et al.*, 1999; Newman *et al.*, 2001) Apesar de ter sido identificada em amostras fecais de pacientes assintomáticos e com diarréia persistente (Saldiva *et al.*, 1999, Newman *et al.*, 2001; Tashima &

Simões, 2004), prevalência semelhante ou até maior à encontrada no presente estudo já foi descrita (Gennari-Cardoso *et al.*, 1996; Orlandi *et al.*, 2001). No entanto, se considerarmos apenas as seis amostras positivas que não estiveram em associação com outros enteropatógenos, a prevalência da *G. lamblia* em diarréia aguda seria de 6,8%, compatível com estudos anteriores brasileiros que encontraram em porcentagem inferior a 8% nas fezes de crianças com diarréia aguda (Guerrant *et al.*, 1983; Stewien *et al.*, 1993; Toporovski *et al.*, 1999; Fagundes Neto & Scaletsky, 2000; Scaletsky *et al.*, 2002 b; Souza *et al.*, 2002; Schnack *et al.*, 2003). Portanto, dos protozoários estudados, apenas *G. lamblia* apresentou correlação com a diarréia aguda.

No quadro clínico da giardíase, os sintomas principais foram anorexia, vômitos e dor abdominal, esta última descrita com freqüência em escolares, de causa recorrente, associada ou não à síndrome de mal-absorção por sua patogênese de “atapetamento” da mucosa intestinal (Pickering & Cleary, 1997; Nelson *et al.*, 2004).

Todas as crianças com amostra fecal positiva para um protozoário, associado ou não a outros enteropatógenos apresentaram uma alta freqüência de relato de vômitos, anorexia, dor abdominal e febre. O sangramento nas fezes foi evidenciado em quatro amostras; em três em associação de bactéria, vírus e protozoário (uma destas com *E. histolytica*).

Diversas co-infecções foram observadas nos grupos pesquisados, onde dois ou mais agentes infecciosos foram detectados numa mesma amostra: 36,4, 24,5 e 15,7% nos grupos I, II e III, respectivamente. O somatório de fatores patogênicos poderia contribuir para agravar o quadro de sintomas e um pior prognóstico clínico. Porém, a correlação com a evolução clínica e a associação entre patógenos e/ou patógenos únicos não foi realizada na presente investigação por não ser o foco desta pesquisa.

No quadro clínico dos diferentes grupos de patógenos foi difícil a correlação dos sinais e sintomas com uma etiologia específica da diarréia aguda, visto que nenhum destes estava predominantemente associado com um determinado patógeno. A febre, sinal caracteristicamente associado às doenças bacterianas, ocorreu em menos da metade dos casos das crianças com amostras positivas para bactérias classicamente patogênicas de diarréia aguda, enquanto naquelas com positividade para RV e protozoários, foi demonstrado em mais de 70% dos casos.

O vômito foi o sintoma predominante associado às evacuações líquidas, ocorrendo em 87% de todas as amostras com positividade para qualquer agente infeccioso, o que justifica a utilização do termo gastroenterite aguda como sinônimo do quadro clínico desenvolvido por uma criança com diarréia aguda. O vômito associado à diarréia se constitui em um agravante durante o tratamento destas crianças, pois pode dificultar a hidratação oral e aumentar os índices de internação (Ribeiro, 2000). Isto pode cursar com aumento dos custos do Estado e sobrecarregar o sistema de saúde (Ribeiro, 2000). Por outro lado, crianças que apresentam resolução espontânea através de administração de soro de reidratação oral, não recorrendo ao atendimento médico não são computadas epidemiologicamente e muito menos investigadas do ponto de vista etiológico. Estes dois motivos reforçam a necessidade de estudos ambulatoriais e hospitalares objetivando a prevalência dos agentes infecciosos da doença diarréica, evolução clínica e custos para nossa população usuária do sistema único de saúde (SUS). Comparações das crianças com diarréia aguda com grupos controle promoveriam a identificação dos fatores de risco e, seu seguimento, avaliação da repercussão clínica e laboratorial de acordo com a faixa etária para cada enteropatógeno. A partir destes dados, a proposição de soluções e/ou estratégias específicas seria fundamental para o planejamento do destino de verbas na saúde, beneficiando as populações de baixo nível sócio-econômico que buscam o sistema de saúde municipal ou estadual. Investimentos na prevenção, tais como vacinação para o RV, educação populacional para conhecimento da doença e divulgação das principais etiologias para os profissionais que trabalham nos locais de atendimento destas crianças, seriam importantes fatores para redução da morbidade e mortalidade infantil.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- ✓ Enteropatógenos foram detectados em mais de 60% de cada grupo pesquisado de crianças com diarréia; sendo o grupo das bactérias (todas as categorias de DEC, *Salmonella* e *Shigella*) foram mais prevalentes (41,5%) do que os outros grupos de enteropatógenos (vírus e protozoários);
- ✓ Excluindo-se as bactérias possivelmente patógenas (EPEC atípica, EAEC e DAEC), os RV foram mais prevalentes nas crianças com diarréia aguda do que as bactérias classicamente patógenas (EPEC típica, ETEC, EIEC, *Salmonella* e *Shigella*);
- ✓ Das bactérias, o grupo de maior prevalência foi o das DEC, seguida por *Shigella* e finalmente pela *Salmonella*;
- ✓ EPEC típica e EIEC foram detectadas somente nas crianças com diarréia aguda e em baixa prevalência na população estudada;
- ✓ ETEC foi detectada, predominantemente, nas crianças com diarréia aguda;
- ✓ EPEC atípica, DAEC e EAEC não estão associadas nas crianças com diarréia aguda na população estudada, devido à alta prevalência em crianças com e sem diarréia aguda;
- ✓ A EAEC esteve relacionada com a diarréia aguda somente nas crianças acima dos dois anos de idade;
- ✓ Anti-soros comercialmente usados na rotina diagnóstica das *E. coli*, não são adequados para discriminação de cepas patógenas de DEC;
- ✓ O uso de técnicas moleculares, como a hibridização para determinação dos genes de virulência, é importante para evidenciar todas as categorias de *E. coli*;
- ✓ O RV apresenta alta prevalência na população estudada (35,2%), predominantemente nos menores de 18 meses de vida, com o maior número de casos ocorrendo de março a setembro de 2003;

- ✓ A detecção do Ad em alta percentagem com o RV e a não discriminação das espécies entéricas não permite inferir sua participação na diarréia aguda;
- ✓ As associações entre enteropatógenos foram freqüentes nas amostras estudadas, sendo os protozoários, o grupo de enteropatógenos com o maior número de associações;
- ✓ Dos protozoários avaliados, apenas *G. lamblia* parece ser agente etiológico isolados de diarréia aguda;

8. PERSPECTIVAS

8. PERSPECTIVAS

Este estudo foi o primeiro realizado no Espírito Santo para esclarecimento da etiologia infecciosa da diarréia aguda infantil, unindo achados laboratoriais com o quadro clínico destas crianças. Mas a prevalência de outros enteropatógenos como *Campylobacter*, *Yersinia*, *Aeromonas*, *Astrovirus*, *Calicivirus* e *Strongyloides* não foi pesquisada, o que poderia aumentar ainda mais o percentual de positividade destas amostras. Portanto, neste mesmo material obtido, é importante que sejam evidenciados ácidos nucleicos de astrovírus e de calicivírus, assim como a discriminação das espécies entéricas de Ad através de PCR, como seqüência determinação da etiologia infecciosa.

Este pode ser o primeiro passo para conscientização dos profissionais que lidam com estas crianças e através destes resultados, despertar o interesse pelo estudo aprofundado das diarréias infantis, possibilitando a capacitação de recursos humanos no atendimento e de laboratórios no diagnóstico da diarréia.

Estudos posteriores com o conhecimento de genótipos circulantes de RV, determinação das espécies de Ad completariam o raciocínio epidemiológico para investimentos em medidas profiláticas para o controle das diarréias infantis, causa importante de mortalidade infantil.

A conduta adotada no tratamento imediato da criança com doença diarréica aguda provavelmente não sofrerá mudanças pela determinação do agente etiológico, mas posturas deverão ser tomadas na Saúde pública, com intuito de minimizar custos, taxas de morbi-mortalidade infantil e monitorização indireta das condições de saneamento básico da população. A implantação de programas educacionais ou continuação daqueles com enfoque nos fatores de risco para doença diarréica, tais como a manutenção do aleitamento materno exclusivo por seis meses e sua manutenção até o segundo ano de vida, além de programas de vigilância dos agentes etiológicos, permitiria a precisa indicação de medidas preventivas como a vacina, no caso dos RV.

9. TRABALHOS APRESENTADOS

9. TRABALHOS APRESENTADOS

9.1. Tema livre do XVIII Congresso Espírito-santense de Pediatria e V Encontro Minas, Goiás e Espírito Santo de Nutrição:

Diarréias agudas em crianças residentes na Região Metropolitana de Vitória: pesquisa de *Rotavirus* e *Adenovirus* no período de nove meses.

9.2. Poster apresentado no 6th International Rotavirus Symposium – Cidade do México – 2004:

Rearrangements of rotavirus gene segments detected in children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro and Vitória, Southeast Region, Brazil

9.3. Tema livre na XIV Jornada de Iniciação Científica da UFES - 2004:

Rotavírus e Adenovírus : detecção imunoenzimática e molecular em casos de Diarréia Aguda

9.4. Poster no XV National Meeting of Virology, 2004:

Rotavirus IN ACUTE DIARRHEA IN Vitória, ESPÍRITO SANTO STATE.

9.5. Poster do XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e do I Encontro de Medicina Tropical do Cone Sul, 2005.

OCORRÊNCIA DE ANTÍGENOS FECAIS DE *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia lamblia* EM AMOSTRAS FECAIS DE CRIANÇAS MENORES DE TRÊS ANOS DE IDADE PORTADORAS DE DIARRÉIA EM VITÓRIA – ES

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abd-Alla MD & Ravdin JI. Diagnosis of amoebic colitis by antigen capture EIE in patients presenting with acute diarrhea in Cairo, Egypt. *Trop Med Int Health* 2002; 7(4): 365-70.

Abdel-Messih IA, Wierzba TF, Abu-Elyazeed R, Ibrahim AF, Ahmed SF, Kamal K, Sanders J, Frenck R. Diarrhea Associated with *Cryptosporidium parvum* among Young Children of the Nile River Delta in Egypt. *J Trop Pediatr* 2005; 51 (3): 154-9.

Adjei AA, Armah H, Rodrigues O, Renner L, Borketey P, Ayeh-Kumi P, Adiku T, Sifah E, Lartey M. *Cryptosporidium* spp., a frequent cause of diarrhea among children at the Korle-Bu Teaching Hospital, Accra, Ghana. *Jpn J Infect Dis* 2004; 57 (5): 216-9.

Afset JE, Bergh K, Bevanger L. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. *J Med Microbiol* 2003; 52 (11): 1015-9.

Albert MJ, Faruque AS, Faruque SM, Sack RB, Mahalanabis D. Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3458-3464.

Aldeen WE, Carroll K, Robison A, Morrison M, Hale D. Comparison of nine commercially available enzyme-linked immunosorbent assays for detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (5): 1338-40.

Almeida MTG, Silva RM, Donaire LM, Moreira LE, Martinez MB. Enteropatógenos associados com diarréia aguda em crianças. *J pediatr (Rio J)* 1998; 74 (4): 291-298.

Altindis M, Yavru S, Simsek A, Ozkul A, Ceri A, Koc H. Rotavirus infection in children with acute diarrhea as detected by latex agglutination, ELISA and polyacrylamide gel electrophoresis. *Indian Pediatr* 2004; 41 (6): 590-4.

Andrade JAB, Oliveira JOT, Fagundes-Neto U. Letalidade em crianças hospitalizadas com diarréia aguda – fatores de risco associados ao óbito. *Rev Ass Med Brasil* 1999; 45 (2): 121-7.

Andrade JA, Moreira C, Fagundes Neto U. Persistent diarrhea. *J Pediatr (Rio J)* 2000; 76 (1): S119-26.

Anonymus. Atención integrada a las enfermedades prevalentes de la infancia (AIEPI) en las Americas. Boletín Epidemiológico - Organización Panamericana de la Salud 1998; 19: 1-9.

Anonymus. Persistent diarrhea in developing countries. Memorandum from OMS meeting. Bull WHO 1988; 66 (6): 709-17.

Araujo IT, Assis RMS, Fialho AM, Monteiro AIC, Kmetzsch CI, Barreto M, Leite JPG. Group C Rotavírus infection in children with diarrhea in Rio de Janeiro, Bahia and Rio Grande do Sul. Virus Reviews and Research 2004; 9 (1): 214.

Bardhan PK, Albert MJ, Alam NH, Faruque SM, Neogi PKB, Malahanabis D. Small bowel and fecal microbiology in children suffering from persistent diarrhea in Bangladesh. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1998; 26: 9-15.

Barros AJ, Ross DA, Fonseca WV, Williams LA, Moreira-Filho DC. Preventing acute respiratory infections and diarrhea in child care centers. Acta Paediatrica 1999; 88: 1113-1138.

Barros AJ. Child-care attendance and common morbidity: evidence of association in the literature and questions of design. Rev Saude Publica 1999; 33 (1): 98-106.

Betran AP, De Onis M, Lauer JA, Villar J. Ecological study of effect of breastfeeding on infant mortality in Latin America. BMJ 2001; 323: 1188.

Beutin L, Marches O, Bettelheim KA, Gleier K, Zimmermann S, Schmidt H, Oswald E. HEp-2 cell adherence, actin aggregation, and intimin types of attaching and effacing Escherichia coli strains isolated from healthy infants in Germany and Australia. Infect Immun 2003; 71 (7): 3995-4002.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. Lancet. 1973; 8, 2 (7841):1281-3.

Bishop R. Natural history of human rotavirus infections. In: Kapikian AZ, ed. Viral Infections of the Gastrointestinal Tract. New York: Marcel Dekker; 1994: 131-168.

Black RE, Lopez de Romaña GL, Brown KH, Bravo N, Balazar OG, Kanashiro HC. Incidence and etiology of infantile diarrhea and major routes of transmission in Huascar, Peru. Am J Epidemiol 1989; 129 (4): 785-99.

Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PME, Van Der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28 (3): 495-503.

Boone JH, Wilkins TD, Nash TE, Brandon JE, Macias EA, Jerris RC, Lyerly DM. TechLab and alexon Giardia enzyme-linked immunosorbent assay kits detect cyst wall protein 1. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (3): 611-4.

Braga LL, Mendonca Y, Paiva CA, Sales A, Cavalcante AL, Mann BJ. Seropositivity for and intestinal colonization with *Entamoeba histolytica* and *entamoeba dispar* in individuals in northeastern Brazil. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (10): 3044–3045.

Braga LL, Gomes ML, Silva MW, Paiva C, Sales A, Mann BJ. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections as detected by monoclonal antibody in an urban slum in Fortaleza, Northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65 (4): 268-71.

Brunser O, Espinoza J & Brunser AM. Etiology of Diarrhea: Bacteria and parasites. In: Gracey M & Walker-Smith JA. *Diarrheal disease*. Nestlé Nutrition workshop series 1997; 38: 13-37.

Burke V, Robinson J, Gracey M, Peterson D, Meyer N, Haley V. Isolation of *Aeromonas* spp. from an unchlorinated domestic water supply. *Appl Environ Microbiol* 1984; 48 (2): 367-70.

Butz AM, Fosarelli P, Dick J, Cusak T, Yolken R. Prevalence of rotavirus on high-risk fomites in day-care facilities. *Pediatrics* 1993; 92 (2): 202-205.

Campos LC. Shigella. Salmonella In: Trabulsi LR & Alterthum F. *Microbiologia*. 4^a. ed. Brasil. Atheneu, 2004. cap 42 e 43.

Campos LC, Franzolin MR, Trabulsi LR. Diarrheagenic *Escherichia coli* Categories among the traditional Enteropathogenic *E. coli* O Serogroups – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99 (6): 545-552.

Carratala Munuera MC, Gascon Perez E, Raga Ortega M. Is breast-feeding a protective factor for infectious diseases? A case-control study. *Aten Primaria* 2005 28; 35 (3): 140-5.

Cardoso DD, De Brito WM, Martins RM, Kitajima EW, Souza MP, Barbosa AJ, De Oliveira AS, Rascopi SB. Presence of rotavirus and adenovirus in fecal samples of

children with gastroenteritis, in the city of Goyania. *Rev Soc Bras Med Trop* 1989; 22 (2): 67-71.

Cardoso DD, Martins RMB, Kitajima EW, Barbosa AJ, Camarota SCT, Azevedo MSP. Rotavirus and adenovirus em crianças de 0-5 anos hospitalizadas com ou sem gastroenterite em Goiania – GO, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1992; 34 (5): 433-439.

Cardoso DD, Soares CM, Dias e Souza MB, De Azevedo MS, Martins RM, Queiroz DA, De Brito WM, Munford V, Racz ML. Epidemiological features of rotavirus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, from 1986 to 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98 (1): 25-9.

Carre D, Coton T, Delpy R, Guisset M, Debonne JM. Acute Infectious Diarrhea: current treatment and perspectives. *Med Trop* 2001; 61 (6): 521-8.

Carmona RC, Timenetsky MDO C, Da Silva FF, Granato CF. Characterization of rotavirus strains from hospitalized and outpatient children with acute diarrhoea in Sao Paulo, Brazil. *J Med Virol* 2004; 74 (1): 166-72.

Casburn-Jones AC & Farthing MJ. Management of infectious diarrhoea. *Gut* 2004; 53 (2): 296-305.

Clark B, Mckendrick M. A review of viral gastroenteritis. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17 (5): 461-9.

Coluchi N, Munford V, Manzur J, Vazquez C, Escobar M, Weber E, Marmol P, Racz ML. Detection, subgroup specificity, and genotype diversity of rotavirus strains in children with acute diarrhea in Paraguay. *J Clin Microbiol* 2002; 40 (5): 1709-14.

Cook SM, Glass RI, Lebaron CN, Ho MS. Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Org* 1990; 68 (2): 171-177.

Cordell RL, Addiss DG. Cryptosporidiosis in child care settings: a review of the literature and recommendations for prevention and control. *Pediatric Infect Dis J* 1994; 13 (4): 310-317.

Costa FAC. Diarréia aguda por rotavírus com desidratação grave: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais em dois hospitais públicos do Rio de Janeiro. 2004. 146 f. Dissertação de Mestrado - Curso de Pós- Graduação em

Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ – Departamento de Virologia, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2004.

Cravioto A, Gross RJ, Scotlan SM, Rowe B. An Adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* 1979; 3: 95-99.

Cravioto A, Reyes RE, Trujillo F, Uribe F, Navarro A, De La Roca JM, Hernandez JM, Perez G, Vasquez V. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. *Am J epidemiol* 1990; 131 (5): 886-904.

Crawford FG & Vermund SH. Human Cryptosporidiosis. *CRC Crit Rev Microbiol* 1988; 16 (2): 113-59.

Curtis V. Hygiene: How Myths, Monsters, and Mothers-in-law can promote behaviour change. *Journal of Infection* 2001; 43 (1): 75-79.

Da Rosa e Silva ML; Naveca, FG & Carvalho, IP. Epidemiological Aspects of Rotavírus Infections in Minas Gerais, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2001; 5 (4): 215-22.

Dulguer MV, Fabricotti SH, Bando SY, Moreira-Filho CA, Fagundes-Neto U, Scaletsky ICA. Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains: Phenotypic and Genetic profiling reveals a strong association between Enteraggregative E. Coli Heat-Stable Enterotoxin and Diarrhea. *J Infect Dis* 2003; 188 (11): 1685-94.

Elegbe IA, Ojofeitimi EO, Elegbe I, Akinola MO. Pathogenic bacteria isolated from Infant feeding Teats. *Am J Dis Child* 1982; 136 (8): 672-674.

Escuder MM, Venâncio SI, Pereira JC. Impact estimates of breastfeeding over infant mortality. *Rev Saude Publica* 2003; 37 (3): 319-25.

Esrey SA, Feachem RG & Hughes JM. Interventions for the control of diarrheal diseases among young children: improving water supplies and excreta disposal facilities. *Bull WHO* 1985; 63 (4): 757-772.

Essers B, Burnens AP, Lanfranchini FM, Somaruga SGE, Von Vigier RO, Schaad UB, Aebi C, Bianchetti MG. Acute Community – Acquired Diarrhea Requiring Hospital Admission in Swiss Children. *Clin Infect Dis* 2000; 30 (1): 192-6.

Estes MK. Advances in molecular biology: impact on rotavirus vaccine development. *J Infect Dis* 1996; 174 (1): S37-46.

- Fagundes-Neto U, Andrade JAB. Acute Diarrhea and Malnutrition: Lethality Risk in Hospitalized Infants. *J Am Coll Nutr* 1999; 18 (4): 303-308.
- Fagundes-Neto U, Scaletsky ICA. The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. *São Paulo Medical Journal* 2000; 118 (1): 21-29.
- Fagundes-Neto U, De Martini-Costa S, Pedroso MZ, Scaletsky IC. Studies of the small bowel surface by scanning electron microscopy in infants with persistent diarrhea. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33 (12): 1437-1442.
- Fang GD, Lima AAM, Martins CV, Nataro JP, Guerrant RL. Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in Northeastern Brazil: a hospital based, prospective, case-control study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 21 (2): 137-144.
- Faruque SM, Albert MJ, Mekalanos JJ. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62 (4): 1301-14.
- Faruque SM, Nair GB. Molecular ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol Immunol* 2002; 46 (2): 59-66.
- Feachem RG. Interventions for the control of diarrheal diseases among young children: promotion of personal and domestic hygiene. *Bull WHO* 1984; 62 (2): 467-476.
- Fernandes JV, Fonseca SM, Azevedo JC, Maranhão H de S, Fonseca MH, Dantas MT, Meissner RV. Rotavirus detection in feces of children with acute diarrhea. *J Pediatr (Rio J)* 2000; 76 (4): 300-4.
- Fernandez H. *Campylobacter*. In: Trabulsi LR & Alterthum F. *Microbiologia*. 4^a. ed. Atheneu, 2004. cap 45.
- Ferreira, MS & Borges, AS. Some Aspects of Protozoan Infections in Immunocompromised Patients: A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2002; 97 (4): 443-457.
- Franco RM, Cordeiro N da S. Giardiasis and cryptosporidiosis in day-care centers in the municipality Campinas SP. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996; 29 (6): 585-91.
- Fuchs SC & Victora CG. Risk and prognostic factors for diarrheal disease in Brazilian infants: a special case- control design application. *Cad. Saúde Pública* 2002; 18 (3): 773-782.

Gabbay YB, Jiang B, Oliveira CS, Mascarenhas JD, Leite JP, Glass RI, Linhares AC. An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among children attending a day-care centre in Belem, Brazil. *J Diarrhoeal Dis Res* 1999; 17 (2): 69-74.

Garcia LS, Bruckner DA. *Diagnostic Medical Parasitology*. 3rd ed New York, Elsevier, 1996.

Garcia LS, Shimizu RY. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35 (6): 1526-9.

Gaastra W, Svennerholm AM. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends Microbiol* 1996; 4 (11): 444-52.

Gennari-Cardoso ML, Costa-Cruz JM, De Castro E, Lima LM, Prudente DV. *Cryptosporidium* spp. in children suffering from acute diarrhea at Uberlandia City, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91 (5): 551-4.

Glass RI & Kilgore PE. Etiology of Acute Viral Gastroenteritis. In: Gracey M & Walker-Smith JA. *Diarrheal disease*. Nestlé Nutrition workshop series 1997; 38: 39-54.

Glass RI, Bresee J, Jiang B, Gentsch J, Ando T, Fankhauser R, Noel J, Parashar U, Rosen B, Monroe SS. Gastroenteritis viruses: an overview. *Novartis Found Symp* 2001; 238: 5-19.

Gluskin I, Batash D, Shoseyov D, Mor A, Kazak R, Azizi E, Boldur I. A 15-year study of the role of *Aeromonas* sp. in gastroenteritis in hospitalised children. *J Med Microbiol* 1992; 37 (5): 315-8.

Gomes TAT, Blake PA, Trabulsi LR. Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse, and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. *J Clin Microbiol* 1989; 27 (2): 266-9.

Gomes TA, Rassi V, Macdonald KL, Ramos SR, Trabulsi LR, Vieira MA, Guth BE, Candeias JÁ, Ivey C, Toledo MR. *Et al.* Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. *J Infect Dis* 1991; 164 (2): 331-337.

Gomes TA, Irino K, Girao DM, Girao VB, Guth BE, Vaz TM, Moreira FC, Chinarelli SH, Vieira MA. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? *Emerg Infect Dis* 2004; 10 (10): 1851-5.

- Goosney DL, Knoechel DG, Finlay BB. Enteropathogenic *E. coli*, Salmonella, and Shigella: masters of host cell cytoskeletal exploitation. *Emerg Infect Dis* 1999; 5 (2): 216-23.
- Gracey M. Diarrhea and malnutrition: a challenge for pediatricians. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996; 22 (1): 6-16.
- Graham DY, Dufour GR, Estes MK. Minimal infective dose of rotavirus. *Arch Virol* 1987; 92 (3-4): 261-271.
- Guandalini S. Treatment of Acute Diarrhea in the New Millennium. *J Pediatr Gastroenterol Nut* 2000; 30 (5): 522-527.
- Guerrant RL, Kirchhoff LV, Shields DS, Nations MK, Leslie J, Sousa MA, Araujo JG, Correia LL, Sauer KT, MC Clelland KE, Trowbridge FL, Hughes JM. Prospective study of Diarrheal Illnesses in Northeastern Brazil: Patterns of Disease, Nutritional Impact, Etiologies, and Risk Factors. *J Infect Dis* 1983; 148 (6): 986-997.
- Guerrant RL, Shields DS, Thorson SM, Shorling JB, Groschel DHM. Evaluation diagnosis of acute infectious diarrhea. *Am J Med* 1985; 78 (6B): 91-8.
- Guerrant RL, Lohr JA, Williams EK. Acute Infectious Diarrhea. I. Epidemiology, Etiology and pathogenesis. *Ped Infect Dis* 1986; 5 (3): 353-359.
- Gunzburg ST, Chang BJ, Elliott SJ, Burke V, Gracey M. Diffuse and enteroaggregative patterns of adherence of enteric *Escherichia coli* isolated from aboriginal children from the Kimberley region of Western Australia. *J Infect Dis* 1993; 167 (3): 755-8.
- Gusmão RH, Mascarenhas JD, Gabbay YB, Lins-Lainson Z, Ramos FL, Monteiro TA, Valente SA, Linhares AC. Rotaviruses as a cause of nosocomial, infantile diarrhoea in northern Brazil: pilot study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995; 90 (6): 743-9.
- Guth BEC, Aguiar EG, Griffin PM, Ramos SRT, Gomes TAT. Prevalence of colonization factor antigens (CFAs) and adherence to HeLa cells in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from feces of children in São Paulo. *Microbiol Immunol* 1994; 38 (9): 695-701.
- Guth BEC. Enterotoxigenic *Escherichia coli* – An Overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95 (1): 95-97.

Guth BE, Souza RL, Vaz TMI, Irino, K. First Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with Hemolytic Uremic Syndrome, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2002; 8 (5): 535-6.

Guth BE, Ramos SR, Cerqueira AM, Andrade JR, Gomes TA. Phenotypic and genotypic characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in Sao Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97 (8): 1085-9.

Haque R, Mondal D, Kirkpatrick BD, Akther S, Farr BM, Sack RB, Petri JR WA. Epidemiologic and Clinical Characteristics of acute diarrhea with emphasis on *Entamoeba histolytica* infections in preschool children in a urban slum of Dhaka, Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69 (4): 398-405.

Hlavsa MC, Watson JC, Beach MJ. Cryptosporidiosis surveillance--United States 1999-2002. *MMWR Surveill Summ* 2005; 54 (1): 1-8.

Horwitz MS. Adenovirus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, *et al.*, eds. *Fields Virology*, ed. 4. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001; cap 68, CD-room.

Huang DB & DuPont HL. Enteraggregative *Escherichia coli*: An Emerging Pathogen in Children. *Semin Pediatric Infect Dis* 15 (4): 266-271.

Juranek DD. Cryptosporidiosis. In G T Strickland ed. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*. 8th ed. Saunders, Philadelphia, 2000; 594-600.

Kaper JB. Defining EPEC. *Rev. Microbiol* 1996, 27: 130-133.

Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanok RM. Rotavirus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, *et al.*, eds. *Fields Virology*, ed. 4. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001; cap 55, CD-room.

Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1983; 19 (8325): 619-20.

Kitagawa SM, Toledo MRF, Trabulsi LR, Ramos Srts, Murahovschi J, Fagundes-Neto U, Candeias JA. Etiologia da diarréia infecciosa endêmica da criança de baixo nível sócio-econômico em São Paulo. *Rev. Paul. Pediatr* 1989; 7 (24): 16-25.

Larrosa-Haro A, Ruiz-Perez M, Aguilar-Benavides S. Utilidad del estudio de las heces para el diagnóstico y manejo de lactantes y preescolares con diarrea aguda. *Salud Publica Mex* 2002; 44 (4): 328-334.

- Leal NC, SÁ AT, Solari CA, Silva SJ, Hofer E. Sorotipos de Salmonella isolados de processos entéricos humanos em Recife – Pernambuco, durante o triênio 1978-1980. Mem Inst Oswaldo Cruz 1987; 82 (1): 153-159.
- Leal NC, Cavalcanti TI, Rodrigues DP, Hofer E. Enteropathogenic bacteria detected in healthy children from three low income communities, in Recife, Pernambuco State, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1988; 83 (2): 153-159.
- Leal NC, Cavalcanti TI, Jesuita M, Da Silva B, Dos Reis EM, Solari CA, Hofer E. Frequency of pathogenic enterobacteria in infantile diarrheic processes in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1988; 83 (4): 475-9.
- Leclerc H, Schwartzbrod L, Dei-Cas E. Microbial Agents Associated with waterborne Diseases. Critical Reviews in Microbiol 2002; 28 (4): 371-409.
- Lee WS, Puthuchear SD. Retrospective study of Aeromonas infection in a Malaysian urban area: a 10-year experience. Singapore Med J 2001; 42 (2): 57-60.
- Levine MM, Ferreccio C, Prado V, Cayazzo M, Abrego P, Martinez J, Maggi L, Baldini MM, Martin W, Maneval D, *et al.* Epidemiologic studies of Escherichia coli diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. Am J Epidemiol 1993; 138 (10): 849-69.
- Lima AA, Guerrant RL. Persistent diarrhea in children: epidemiology, risk factors, pathophysiology, nutritional impact, and management. Epidemiol Rev 1992; 14: 222-42.
- Linhares AC, Pinheiro FP, Schmetz C, *et al.* Duovirus (rotavirus) em Belém do Para. Rev Inst Med Trop 1977; 19 (4): 278-279.
- Linhares AC, Gabbay YB, Freitas RB *et al.* Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. Epidemiol Infect 1989; 102 (1): 129-145.
- Linhares AC, Moura JM, Gabbay YB, Mendes PS, Mascarenhas JD, De Azevedo RC. Rotavirus serotypes and electrophoretotypes among children attending three paediatric hospitals in Belem, Brazil. J Trop Pediatr 1993; 39 (3): 137-41.
- Linhares AC, Gabbay YB, Mascarenhas JD, De Freitas RE, Oliveira CS, Bellesi N, Monteiro TF, Lins-Lainson Z, Ramos FL, Valente SA. Prospective study of rotavirus infections in Belem, Para, Brazil: clinical and epidemiological features. J Pediatr (Rio J) 1994; 70 (4): 220-5.

- Linhares AC. Rotavirus infection in Brazil: epidemiology and challenges for its control. *Cad Saude Publica* 2000; 16 (3): 629-46.
- Lins MGM & Silva GAP. Doença diarreica em crianças hospitalizadas – importância da diarreia persistente. *J Pediatr (Rio J)* 2000; 76 (1): 37-43.
- Long K, Vasquez-Garibay E, Mathewson J, De La Cabada J, Dupont H. The impact of infant feeding patterns on infection and diarrheal disease due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Salud Pública de Mexico* 1999; 41 (4): 263-270.
- Mangia AH, Duarte NA, Duarte R, Silva LA, Bravo VL, Leal MC. Aetiology of acute diarrhoea in hospitalized children in Rio de Janeiro city, Brazil. *J Trop Pediatr* 1993; 39 (6): 365-367.
- Mangini AC, Dias RM, Grisi SJ, Escobar AM, Torres DM, Zuba LP, Quadros Chieffi PP *Cryptosporidium* parasitism in children with acute diarrhea. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1992; 34(4): 341-5.
- Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CH. Waterborne protozoan pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* 1997; 10 (1): 67 – 85.
- Mascarenhas JDP, Paiva FL, Barardi CRM *et al.* Rotavirus G and P types in children from Belém, Northern Brazil, as determined by RT-PCR: Occurrence of mixed P type infections. *J Diarrhoeal Dis Res* 1998; 16 (1): 8-14.
- Medeiros MI, Neme SN, Silva P, Capuano DM Errera MC Fernandes AS Do Valle GR, De Avila FA. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto-SP0 Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2001; 43 (1): 21-24.
- Moore SR, Lima AA, Conaway MR, Schorling JB, Soares AM, Guerrant RL. Early childhood diarrhoea and helminthiasis associate with long-term linear growth faltering. *Int J Epidemiol* 2001; 30 (6): 1457-1464.
- Mota-Hernandez F, Gutierrez-Camacho C, Villa-Contreras S, Calva-Mercado J, Arias CF, Padilla-Noriega L, Guiscafre-Gallardo H. Prognosis of rotavirus diarrhea. *Salud Publica Mex* 2001; 43 (6): 524-528.
- Nataro JP, Scaletsky IC, Kaper JB, Levine MM, Trabulsi LR. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1985; 48 (2): 378-83.

- Nataro J & Kaper JB. Diarrheagenic Escherichia Coli. Clin Microbiol Rev 1998; 11 (1): 142-201.
- Nelson, WE; Behrman, RE; Kliegman, RM; Jenson, HB. Tratado de Pediatria, Vol 1, cap 2 e 3.16a. Ed. Guanabara Koogan, 2002.
- Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. Annu Rev Nutr 2005; 25: 37-58.
- Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Chaturvedi P, Meinzen-Derr J, Guerrero Mde L, Morrow AL. Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants. Glycobiology 2004; 14 (3): 253-63.
- Newman RD, Sears CL, Moore SR, Nataro JP, Wuhib T, Agnew DA, Guerrant RL, Lima AA. Longitudinal study of Cryptosporidium Infection in children in Northeastern Brazil. J Infect Dis 1999; 180 (1): 167-175.
- Newman RD, Moore SR, Lima AA, Nataro JP, Guerrant RL, Sears CL. A longitudinal study of Giardia lamblia infection in North-east Brazilian children. Trop Med Int Health 2001; 6 (8): 624-634.
- Niyogi SK, Saha MR, De SP. Enteropathogens associated with acute diarrhoeal diseases. Indian J Public Health 1994; 38 (2): 29-32.
- Niyogi SK. Shigellosis. J Microbiol 2005; 43 (2): 133-43.
- Nunes EB, Saridakis HO, Irino K, Pelayo JS. Genotypic and phenotypic characterization of attaching and effacing Escherichia coli (AEEC) isolated from children with and without diarrhoea in Londrina, Brazil. J Med Microbiol 2003; 52 (6): 499-504
- Nuñez FA, Gonzalez OM, Gonzalez I, Escobedo AA, Cordovi RA. Intestinal coccidia in Cuban pediatric patients with diarrhea. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98 (4): 539-42.
- O'Ryan M, Prado V, Pickering LK. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. Semin Pediatr Infect Dis 2005; 16 (2): 125-36.
- Oliva CAG, Scaletsky IC, Morais MB, Fagundes-Neto U. Diarréia Aguda grave associada à Escherichia coli enteropatogênica clássica (EPEC): características clínicas e perdas fecais em lactentes hospitalizados. Rev Ass Med Brasil 1997; 43 (4): 283-9.

Oliveira CS, Linhares AC. Rotavirus: clinical features and prevention. *J Pediatr (Rio J)* 1999; 75 (1): S91-S102.

Orlandi PP, Silva T, Magalhães GF, Alves F, De Almeida Cunha RP, Durlacher R, Da Silva LH. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants of poor urban areas of Porto Velho, Rondônia: a preliminary study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96 (5): 621-625.

Oshiro, E T, Dorval, M E C, Nunes, V L B *Et al.* Prevalence of *Cryptosporidium parvum* among children of less than 5 years of age in the urban zone of Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil, 1996. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; 33 (3), 277-280.

Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI. Rotavirus. *Emerg Infect Dis* 1998; 4 (4): 561-70.

Parashar UD, Bresee JS, Glass RI. The global burden of diarrhoeal disease in children. *Bull World Health Organ* 2003; 81 (4): 236.

Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 2003; 9 (5): 565-72.

Pereira HG, Linhares AC, Candeias JÁ, Glass RI. National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. *Bull Pan Am Health Organ* 1993; 27 (3): 224-233.

Pereira, Edson Filho. Caracterização Molecular de Adenovírus Humanos Associados a Casos de Gastreenterite Infantil Aguda. 2004. 118 f. Dissertação de Mestrado - Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz – Departamento de Virologia, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2004.

Pickering LK & Cleary TG. Approach to patients with gastrointestinal tract infections and food poisoning. *Gastrointestinal Infections*. In: Feigin RD & Cherry JD. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases, Part II, Infection of Specific Organ System*. 3^a ed. WB Saunders Company, 1992. p. 565-596.

Piva IC, Pereira AL, Ferraz LR, Silva RS, Vieira AC, Blanco JE, Blanco M, Blanco J, Giugliano LG. Virulence markers of Enterοaggregative *Escherichia coli* isolated from children and adults with diarrhea in Brasilia, Brazil. *J Clin Microbiol* 2003; 41 (5): 1827-32.

- Powell JL. *Vibrio* species. *Clin Lab Med* 1999; 19 (3): 537-52.
- Prado VE, O’Ryan ML. Acute gastroenteritis in Latin America. *Infect Dis Clin North Am* 1994; 8 (1): 77-106.
- Prado V, Martinez J, Arellano C, Levine MM. Temporal variation of genotypes and serotypes of enterohemorrhagic *E Coli* isolated from Chilean children with intestinal infections or hemolytic uremic syndrome. *Rev Med Chil* 1997; 125 (3): 291-7.
- Procop GW. Gastrointestinal Infections. *Infect Dis Clin North Am* 2001; 15 (4): 1073-108.
- Queiroz DM, Mendes EM, Penna FJ, Peret-Filho LA, De Figueiredo-Filho PP, Duarte MA, Peres JN. Research on enteropathogenic bacteria from children with acute diarrhea, in Belo Horizonte, MG. *Arq Gastroenterol* 1987; 24 (1): 46-50.
- Rahman M, Banik S, Faruque AS, Taniguchi K, Sack DA, Van Ranst M, Azim T. Detection and characterization of human group C rotaviruses in Bangladesh. *J Clin Microbiol* 2005; 43 (9): 4460-5.
- Ramig RF. Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection. *J Virol* 2004; 78 (19): 10213–10220.
- Regua-Mangia AH, Gomes TA, Vieira MA, Andrade JR, Irino K, Teixeira LM. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. *J Infect* 2004; 48 (2): 161-7.
- Ribeiro H Jr. Diarrheal Disease in a developing nation. *American Journal of Gastroenterology* 2000; 95: 14-15.
- Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, Mcgee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 1983; 308 (12): 681-5.
- Rivera M, de la Parte MA, Hurtado P, Magaldi L, Collazo M. Intestinal giardiasis. Mini-review. *Invest Clin* 2002; 43 (2): 119-28.
- Robins-Browne RM, Bordun AM, Tauschek M, Bennett-Wood VR, Russell J, Oppedisano F, Lister NA, Bettelheim KA, Fairley CK, Sinclair ML, Hellard ME. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. *Emerg Infect Dis* 2004; 10 (10): 1797-805.

Rodrigues J, Acosta VC, Candeias JM, Souza LO, Filho FJ. Prevalence of diarrheogenic *Escherichia coli* and rotavirus among children from Botucatu, Sao Paulo State, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35 (11): 1311-8.

Sack DA, Sack RB Nair GB, Siddique AK. Cholera. *Lancet* 2004; 363 (9404): 223-33.

Saldiva SR, Silveira AS, Philippi ST, Torres DM, Mangini AC, Dias RM, Da Silva RM, Buratini MN, Massad E. *Ascaris-Trichuris* association and malnutrition in Brazilian children. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1999; 13 (1): 89-98.

Saredi N & Bava J. Cryptosporidiosis in pediatric patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1998; 40 (3): 197-200.

Sarinho SW, Silva GAP, Magalhães M, Carvalho MRC. A study of the importance of the Enterotoxigenic *E. coli* in children with Acute Diarrhoea in Recife, Brazil. *J Trop Ped* 1993; 39 (5): 304-306.

Sazawal S, Bhan MK, Bhandari N. Type of milk feeding acute diarrhea and the risk of persistent diarrhoea. *Acta Paediatrica* 1992; 381: 93-97.

Scaletsky ICA, Silva NLM, Trabulsi LR. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun* 1984; 45 (2): 534-536.

Scaletsky IC, Pedroso MZ, Oliva CA, Carvalho RL, Morais MB, Fagundes-Neto U. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. *Infect Immun* 1999; 67 (7): 3410-5.

Scaletsky IC, Fabbricotti SH, Carvalho RL, Nunes CR, Maranhão HS, Morais MB, Riley L, Fagundes-Neto U. Diffuse and entero aggregative patterns of adherence of *Escherichia coli* isolated from stools of children in Northeast Brazil. *Brazil Journal of Microbiol* 2001; 32: 313-319.

Scaletsky IC, Fabbricotti SH, Aranda KR, Morais MB, Fagundes-Neto U. Comparison of DNA hybridization and PCR assays for detection of putative pathogenic enteroadherent *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2002; 40 (4): 1254-8.

Scaletsky IC, Fabbricotti SH, Carvalho RL, Nunes CR, Maranhão, Morais MB, Fagundes-Neto U. Diffusely adherent *Escherichia Coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. *J Clin Microbiol* 2002; 40 (2): 645-648.

Scaletsky IC, Fabbriotti SH, Silva SOC, Morais MB, Fagundes-Neto U. Hep-2-Adherent Escherichia coli strains associated with acute infantile diarrhea, São Paulo, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2002; 8 (8): 855-858.

Scotland SM, Smith HR, Cheasty T, Said B, Willshaw GA, Stokes N, Rowe B. Use of gene probes and adhesion tests to characterise Escherichia coli belonging to enteropathogenic serogroups isolated in the United Kingdom. *J Med Microbiol* 1996; 44 (6): 438-43.

Schnack FJ, Fontana LM, Barbosa PR, Silva LSM, Baillargeon CMM, Barichello T, Póvoa MM, Cavasini CE, Machado RLD. Enteropatógenos associados com diarréia infantil (< 5 anos de idade) em amostra da população da área metropolitana de Criciúma, Santa Catarina, Brasil. *Cad. Saúde Pública* 2003; 19 (4): 1205-1208.

Sears CL, Kaper JB. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev* 1996; 60 (1): 167-215.

Sharma S, Sachdeva P, Viridi JS. Emerging water-borne pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; 61 (5-6): 424-8.

Silva S DA, Silva SP DA, Gouveia YDE S, Silva N De O DA, Melo-Me, Moura H, Neves RH, Bello AR, Machado-Silva JR. Occurrence of Cryptosporidium spp. in fecal samples of children less than 10 years old with clinical indication of Rotavirus. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36 (3): 421-3.

Simango C, Mutikani S. Cryptosporidiosis in Harare, Zimbabwe. *Cent Afr J Med* 2004; 50 (5-6): 52-4.

Snyder JD & Merson MH. The magnitude of global problem of acute diarrheal disease: a review of active surveillance data. *Bull WHO* 1982; 60 (4): 605-613.

Soares CC, Volotao EM, Albuquerque MC, Da Silva FM, De Carvalho TR, Nozawa CM, Linhares RE, Santos N. Prevalence of enteric adenoviruses among children with diarrhea in four Brazilian cities. *J Clin Virol* 2002; 23 (3): 171-7.

Souza DF, Kisielius JJ, Ueda M, Gabbay YB, Carmona RC, ST Timenetsky MDO C, Mascarenhas JD, Takimoto S, Tanaka H. An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among adults living in Valentim Gentil, Sao Paulo State, Brazil. *J Diarrhoeal Dis Res* 1998; 16 (2): 59-65.

Souza EC, Martinez MB, Taddei CR, Mukai L, Gilio AE, Racz ML, Silva L, Ejzenberg B, Okay Y. Perfil Etiológico das diarreias agudas de crianças atendidas em São Paulo. *J Pediatr (Rio J)* 2002; 78 (1): 31-38.

Spizzirri FD, Rahman RC, Biblioni N, Ruscasso JD, Amoreo OR. Childhood hemolytic uremic syndrome in Argentina: long-term follow-up and prognostic features. *Pediatr Nephrol* 1997; 11 (2): 156-160.

Stewien KE, Mos EN, Yanaguaita RM, Jerez JA, Durigon EL, Harsi CM, Tanaka H, Moraes RM, Silva LA, Santos MA *et al.* Viral, bacterial and parasitic pathogens associated with severe diarrhea in the city of São Paulo, Brazil. *J Diarrhoeal Dis Res* 1993; 11 (3): 148-152.

Stumpf M, Ricciardi ID, Oliveira N, Sabra A, Bernhoeft M. *Yersinia enterocolitica* as a cause of infantile diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Bras Pesqui Med Biol* 1978; 11 (6): 383-4.

Subekti D, Lesmana M, Tjaniadi P, Safari N, Frazier E, Simanjuntak C, Komalarini S, Taslim J, Campbell Jr, Oyoyo BA. Incidence of Norwalk-like viruses, rotavirus and adenovirus infection in patients with acute gastroenteritis in Jakarta, Indonesia. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 33 (1): 27-33.

Szwarcwald CL, Leal MC, Castilho A, Andrade CLT. Infant mortality rate in Brazil: Belgium-India or Bulgaria? *Cad. Saúde Pública* 1997; 13 (3): 503-516.

Tashima NT, Simoes MJ. Enteroparasitic occurrence in fecal samples analyzed at the University of Western Sao Paulo-UNOESTE Clinical Laboratory, Presidente Prudente, Sao Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2004; 46 (5): 243-8.

Teixeira JM, Camara GN, Pimentel PF, Ferreira MN, Ferreira MS, Alfieri AA, Gentsch JR, Leite JP. Human group C rotavirus in children with diarrhea in the Federal District, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31 (11): 1397-1403.

Thompson FL, Lida T, Swings J. Biodiversity of vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68 (3): 403-31.

Timenetsky MDO C, Kisielius JJ, Grisi SJ, Escobar AM, Ueda M, Tanaka H. Rotavirus, adenovirus, astrovirus, calicivirus and small round virus particles in feces of children with and without acute diarrhea, from 1987 to 1988, in the greater Sao Paulo. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1993; 35 (3): 275-80.

Timenetsky MC, Santos N, Gouvea V. Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in São Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2622-2624.

Tomar BS. Intestinal infections. *Indian J Pediatr* 2001; 68: S8-18.

Tomasi E, Victora CG, Post PR, Olinto MTA, Béhague D. Uso de chupeta em crianças : contaminação fecal e associação com diarréia. *Rev. Saúde Pública* 1994; 28 (5): 373-379.

Toporovski MS, Mimica IM, Chieffi PP, Paschoalotti MA, Dias AMG, Silva CB. Diarréia aguda em crianças menores de 3 anos de idade: recuperação de enteropatógenos nas amostras fecais de pacientes comparada à de grupo controle. *J Pediatr* 1999; 75 (2): 97-104.

Torres ME, Pirez MC, Schelotto F, Varela G, Parodi V, Allende F, Falconi E, Dell'acqua L, Gaione P, Mendez MV, Ferrari AM, Montano A, Zaneta E, Acuña AM, Chiparelli H, Ingold E. Etiology of children's Diarrhea in Montevideo, Uruguay: Associated Pathogens and unusual Isolates. *J Clin Microbiol* 2001; 39 (6): 2134-2139.

Trabulsi LR, Kitagawa SMS, Toledo MRF, Candeias JAN. Diarrheal disease in children in São Paulo. *J Jap Assoc Infect Dis* 1988; 62: 97-104.

Trabulsi LR, Keller R, Gomes TAT. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2002; 8 (5): 508-513.

Trabulsi LR & Martinez MB. *Yersinia*. In: Trabulsi LR & Alterthum F. *Microbiologia*. 4ª. ed. Atheneu, 2004. cap 44.

Vasquez ML, Mosquera M, Cuevas LE, Gonzalez ES, Veras ICL, Luz EO, Batista Filho M, Gurgel RQ. Incidência e fatores de risco de diarréia e infecções respiratórias agudas em comunidades urbanas de Pernambuco, Brasil. *Cad. Saúde Publica* 1999; 15 (1): 163-171.

Vicentini F, Cuquetto Sc, Fonseca KL, Lorenção M, Teixeira L, Fragoso RP, Kitoko PM. Detection of dsRNA of Rotavirus in diarrheic stools of children from the outskirts of Vitória, Espírito Santo state. *Virus Reviews and Research*, 2003; 8: 231.

Vicentini F, Cuquetto Sc, Nunes JM, Rocha GC, Teixeira L, Santos DB, Fragoso RP, Kitoko PM. Community diarrhoea by group a Rotavirus, in Vitória, Espírito Santo state in the 2003. *Virus Reviews and Research*, 2004; 9: 218.

Vicentini F, Cuquetto Sc, Nunes JM, Rocha GC, Teixeira L, Santos DB, Kitoko PM. Seasonality of Community Rotavirus infection in Vitória, Espírito Santo state. *Virus Reviews and Research*, 2004; 9: 218.

Victora CG, Vaughan JP, Lombardi C, Fuchs SMC, Gigante LP, Smith PG et I. Evidence for protection by breastfeeding against infant deaths from infectious diseases in Brazil. *Lancet* 1987; 2 (8554): 319-322.

Vieira GO, Silva LR, Vieira TO. Alimentação Infantil e morbidade por diarréia. *J Pediatr (Rio J)* 2003; 79 (5): 449-54.

Waldman EA, Barata RCB, Moraes JC de, Guibu LA, Timenetsky MCST. Gastrenterites e infecções respiratórias agudas em crianças menores de 5 anos, em área da região sudeste do Brasil, 1986-1987. II – Diarréias*. *Saúde Pública* 1997; 31 (1): 62-70.

Waters V, Ford-Jones EL, Petric M, Fearon M, Corey P, Moineddein R. Etiology of community-acquired pediatric viral diarrhea: a prospective longitudinal study in hospitals, emergency departments, pediatric practices and child care centers during the winter rotavirus outbreak, 1997 to 1998. The Pediatric Rotavirus Epidemiology Study for Immunization Study Group. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19 (9): 843-8.

Watson IM, Robinson JO, Burke V, Gracey M. Invasiveness of *Aeromonas* spp. in relation to biotype, virulence factors, and clinical features. *J Clin Microbiol* 1985; 22 (1): 48-51.

Wells JG, Davis BR, Wachsmuth IK, Riley LW, Remis RS, Sokolow R, Morris GK. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J Clin Microbiol* 1983; 18 (3): 512–520.

Widdowson MA, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI. Rotavirus disease and its prevention. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21 (1): 26-31.

Zamboni A, Fabricotti SH, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. Enteroggregative *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. *J Clin Microbiol* 2004; 42 (3): 1058-63.

Internet : sites consultados

(<http://www3.who.int/whosis/country/indicators.cfm?country=bra>) - Último acesso 03/10/2004

(www.paho.org/English/AD/DPC/CD/diarrhea.htm)

<http://tabnet.datasus.gov.Br/cgi/idb2003> – ultimo acesso 13/10/2005.

http://www.opas.org.br/prevencao/site/UploadArq/reunião_rotavirus.doc - último acesso em 06/10/2004

http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/cryptosporidiosis/factsheet_cryptosporidiosis.htm.

<http://www.datasus.gov.br/> último acesso -01/09/2005

11. ANEXOS

Anexo 1: Carta de aprovação pelo Comitê de Ética da UFES - Vitória - ES



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória-ES, 14 de maio de 2003


Do: Prof. Dr. Paulo Roberto Merçon de Vargas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico

Para: Profa. Liliana Cruz Spano
Pesquisadora Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: “Agentes Infecciosos Associados à Diarréia Aguda em Crianças até 3 Anos de Idade: Estudo em um Hospital de Referência no Município de Vitória-ES”.


Prezada Profa. Liliana,

Através deste informo à V.Sa., que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Projeto de Pesquisa intitulado: **“Agentes Infecciosos Associados à Diarréia Aguda em Crianças até 3 Anos de Idade: Estudo em um Hospital de Referência no Município de Vitória-ES”**, cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, APROVOU o referido projeto, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, em reunião ordinária realizada em 14 de maio de 2003.

Atenciosamente,


Prof. Dr. PAULO ROBERTO MERÇON DE VARGAS
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do
Centro Biomédico

2: Ficha de dados clínico – epidemiológicos:

NOME COMPLETO:				
IDADE: (em meses) =	DATA:			hora coleta:
Dn: / /	SEXO:	COR:		
Nome do Pai:		Idade:		
Nome da Mãe:		Instrução :		
Endereço:		Bairro:		
Cidade:	Estado:	Renda familiar:		
Telefone de contato:				
Antecedentes pessoais :				
Nºde gestações =	Nascidos vivos=	Filhos vivos =	Pré-natal gestacional	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Intercorrências	<input type="checkbox"/> Ameaça aborto	<input type="checkbox"/> Infecção congênita	<input type="checkbox"/> Anemia	<input type="checkbox"/> outros
Tipo de Parto	Normal <input type="checkbox"/>	Cesárea <input type="checkbox"/>	Tempo no hospital	(Em dias) =
Peso nascimento = g	Altura nasc. = cm			
Intercorrências neonatais	<input type="checkbox"/> Prematuridade <input type="checkbox"/> Sepsis ou infecção congênita <input type="checkbox"/> outros _____			
Doenças Anteriores:	Diarréia:(quantos episódios?):	Internações por diarreias:	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> SIM Quantas vezes?	
Outras doenças;	<input type="checkbox"/> Baixo peso	<input type="checkbox"/> RGE	<input type="checkbox"/> Cardiopatia	<input type="checkbox"/> pneumonia <input type="checkbox"/> outras

Alimentação :

Leite Materno até (em meses) = _____ Exclusivo _____ Introdução de suco ou chá : _____
 Início do Aleitamento Misto (LM + LV): nasc. _____m
 Só Outros Leites: LV soja cabra Quando? desde nasc. _____meses
 Introdução de alimentos: Frutas aos _____m Comida de sal aos _____m
 Forma de Administrar: mamadeira colher
 Preparo: imediato Até 2 h > de 2 h antes
 Uso de chupeta Chupa dedo

Ambiente:

Casa de Alvenaria madeira Água encanada e tratada água de poço Outra fonte
 Rede de esgoto Fossa Sanitária Filtro
 Número de cômodos: até 2 de 2 a 4 4 a 6 > 6
 Número de habitantes _____ adultos _____ crianças
 Animal em casa: Sim Não Qual? _____
 Frequente creche: Sim Não
 Contato em creche ou casa com pessoas com mesmos sintomas? não sim . Quem? _____

Clínica :

Medicações em uso = sim não ANTIBIÓTICO? Qual? _____ Anti-helmíntico? _____
 Diarréia duração: _____ em dias .
 Número de evacuações/dia : <5 de 5 a 10 X de 10 a 15 X > de 15 X
 Vômitos: Sim Não Febre: Sim Não
 Sintomas respiratórios (tosse ou coriza) : Sim Não
 Anorexia: Sim Não
 Dor abdominal: Sim Não
 Presença de: *Sangue* Sim Não *Muco* Sim Não *Pus* Sim Não
 Aspecto : líquidas semi-líquida semi-pastosa pastosas endurecidas
 Exame Físico: Hidratado desidratado
 Encaminhado: TRO SNG ou EV
 Peso: _____ Estatura: _____
 Se desidrat., após hidratação Peso: _____ Foi internado? sim não . Onde _____

Laboratório de Micro :

- 1) **material Bact** sim não Resultados _____ (/ /)
- 2) **material vírus** sim não Resultados _____ (/ /)
- 3) **material Parasito** sim não Resultados _____ (/ /)
- 4) **suspeita clínica ?** _____
- 5) **Outros dados relevantes (hemograma, evolução, etc..)** _____

Anexo 3: Termo de consentimento livre e esclarecido

Termo de Consentimento

Eu, _____ (nome completo do pai, da mãe ou responsável pela criança) responsável por _____ (nome da criança) autorizo a coleta das fezes para o estudo sobre diarréia aguda em crianças.

Vitória, _____ / _____ /2004

Nome e Assinatura do responsável

Anexo 4: Procedimentos realizados nas amostras fecais colhidas em Vitória – ES

Método diagnóstico	Origem das amostras fecais			
	Diarréia aguda (n = 253)		Sem diarréia (n = 78)	
	Nº amostras processadas	Nº positivas	Nº amostras processadas	Nº positivas
Cultura*	241	219	78	68
Sorologia (Aglutinação)*				
a) Anti-soro policlonal				
EPEC	219	9	78	0
EIEC	28	0	78	0
Shigella	49	11	78	0
Salmonella	14	7	78	0
b) Anti-soro monoclonal†	219	90	68	31
EIERA*				
a) RV	148	74	14	0
b) Ad	147	12	13	0
EGPA*	230	81	72	1
EIE para protozoários*	88	30	4	2
Local de realização* NDI † UNIFESP				

Anexo 5: Meios de Cultura e Soluções usadas:

1. Meios para isolamento e identificação das bactérias

I) Meios comerciais (preparados segundo instruções do fabricante e adquiridos do comércio ou preparados em nosso laboratório)

- a) Cary-Blair (*Bencton Dickinson*)
- b) Caldo Selenito (*Merck*)
- c) Ágar MacConkey (*Merck e Difco*)
- d) Ágar SS (*Merck e Vetec*)
- e) Ágar XLD (*Diagnostics Pasteur*)
- f) Fenilalanina (*Bencton Dickinson*)
- g) TSI (*Merck*)
- h) Citrato (*Merck*)
- i) SIM (*Biobrás*)
- j) Ágar nutriente (*Vetec*)

II) Outros Meios

a) MiLi

Extrato de levedura	0,6 g
Peptona	2,0 g
Triptona	2,0 g
L-lisina	2,0 g
Glicose	0,2 g
Ágar-ágar	0,4 g
Púrpura de bromocresol	0,004 g
Água destilada	200 ml

b) Caldo peptonado

NaCl	1 g
Peptona	4 g
Água destilada	200 ml

c) Caldo VMVP:

Peptona	5 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Glicose	5 g
Água destilada	1000 ml

III) Soluções:

a) Reativo de Kovacs :

Álcool isoamílico	30 ml
p-dimetilaminobenzaldeído	2 g
HCl concentrado	10 ml

b) FeCl₃ 10% :

FeCl ₃	10 g
Água destilada	100 ml

c) Vermelho de Metila :

Vermelho de metila	0,1 g
Álcool 95%	300 ml
Água destilada	500ml

2 Soluções e reagentes utilizados para identificação dos RV

a) Sílica:

Dióxido de Sílica (SigmaChemical Company)	60 g
Água destilada q.s.p.	500 mL

b) Tampão L2:

Isotiocianato de guanidina (Gibco BRL.)	120 g
Tris-HCl 0,1 M, pH 6,4 (Gibco BRL)	100 mL

c) Tampão L6:

Triton X-100	2,6 g
Isotiocianato de guanidina (Gibco BRL)	120 g
EDTA 0,2M pH8,0 (Sigma Chemical Company)	22 mL
Tris-HCl 0,1 M, pH 6,4 (Gibco BRL.)	100 mL

d) Tampão Tris-Ca⁺⁺ pH 7,2:

Tris base 0,01M (Gibco BRL)	1,21 g
Cloreto de cálcio 0,0015M (Vetec Química Fina Ltda.)	0,22 g
Água Milli-Q q.s.p.	1000 mL

e) Tampão Lower-tris 4X pH 8,8:

Tris base (Gibco BRL)	36,34 g
Água Milli-Q q.s.p.	200 mL

f) Tampão Upper-tris 4X pH 6,8:

Tris base (Gibco BRL)	12,12 g
Água Milli-Q q.s.p.	200 mL

g) Persulfato de amônia a 10%:

Persulfato de amônia*	1 g
Água Milli-Q q.s.p.	10 mL

*Sigma Chemical Company

h) Acrilamida/Bisacrilamida 50/1,3%:

N' N' Metileno-Bisacrilamida*	1,3 g
Acrilamida (Sigma Chemical Company)	50 g
Água Milli-Q q.s.p.	100 mL

i) Gel separador 7,5%:

Água destilada	11,4 mL
Tampão <i>Lower</i> -tris pH 8,8	5,0 mL
Acrilamida / bisacrilamida 50/1,5%	3,0 mL
Solução persulfato de amônio 2%*	0,6 mL
TEMED (Sigma Chemical Company)	10 µL

j) Gel concentrador 4%:

Água destilada	3,05 mL
Tampão <i>Upper</i> -tris pH 6,8	1,25 mL
Acrilamida/bisacrilamida 50/1,5%*	0,4 mL
Solução persulfato de amônio 2%*	0,3 mL
TEMED (Sigma Chemical Company)	7,5 µL

k) Solução fixadora:

Etanol (Merck)	20 mL
Ácido Acético (Grupo Química)	1 mL
Água destilada q.s.p.	200 mL

l) Solução de nitrato de prata 0,001M:

Nitrato de prata (Sigma Chemical Company)	0,185 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

m. Solução reveladora:

NaOH (Merk)	6 g
Formaldeído (Química Moderna)	1,5 mL
Borohidreto de sódio (Sigma Chemical Company) *	40 mg
Água destilada q.s.p.	200 mL

n. Solução de ácido acético 5%:

Ácido acético (Grupo Química)	10 mL
Água destilada q.s.p.	200 mL

o. Solução de etanol 10%:

Etanol (Merck)	20 mL
Água destilada q.s.p.	200 mL

p. Solução para conservar o gel (desidratante):

Metanol (Merk)	130 mL
Glicerina (Isofar)	1 mL
Água destilada q.s.p.	200 mL

q. Tampão Tris-Glicina 4X pH 8,2:

Tris base (Gibco BRL)	12 g
Glicina (Sigma Chemical Company)	57,68 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Obs. :A solução foi diluída 1X para uso.

Anexo 6: Organograma resumindo o destino das amostras fecais após coleta

