UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Etiologia das diarreias agudas em crianças atendidas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, estudo caso-controle

Francisco Milton Pinto Ventura

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Prof. Titular Marina Baquerizo Martinez

SÃO PAULO

2010

FRANCISCO MILTON PINTO VENTURA

**ETIOLOGIA DAS DIARREIAS AGUDAS EM CRIANÇAS ATENDIDAS NO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, ESTUDO
CASO-CONTROLE**

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

**Prof. Dra. Marina Baquerizo Martinez
orientadora/presidente**

1º examinador

2º examinador

São Paulo, ____ de ____.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte da minha vida, por me amar e me dar força de espírito para continuar sempre sem nunca pensar em desistir;

À professora Marina Baquerizo Martinez pela atenção e oportunidade concedida de me orientar e me ensinar durante o curso quando muitos fecharam suas portas e diziam que não podiam me receber;

À professora Carla Taddei, pelos momentos em que se dedicou a me auxiliar durante a execução da pesquisa;

À professora Tania Tardelli e à Dra Mônica Vieira pela execução dos ensaios de hibridação;

Aos meus pais Julio e Dolores, por me darem a vida e cuidarem de mim em todos os momentos, sem a ajuda de vocês eu jamais teria conseguido. Fica aqui a minha gratidão eterna;

À minha esposa Marília pelo apoio e por me incentivar a vir para São Paulo realizar esse sonho quando muitos diziam que eu não era capaz e mesmo com todas as adversidades;

À minha filha Giovanna, razão do meu viver. Agradeço-te, filha, por aprender todos os dias coisas novas com você. O papai te ama muito e te dedica essa vitória;

Aos meus irmãos Manoella e Julio Cesar, por me apoiarem e me ajudarem sempre que puderam;

Aos meus tios Norma e Heleno, obrigado pelo apoio;

Ao meu querido sogro Professor Fleury Santos (*in memoriam*), nunca me esquecerei do seu lema (MORRE O HOMEM, MAS NÃO MORRE O SEU EXEMPLO DE VIDA), nesse momento ao lado de Deus, está torcendo por mim e tenho a certeza de estar muito contente com a minha conquista. Sem a sua ajuda com seus ensinamentos e o auxílio prestado à Marília e à nossa pequena Giovanna eu jamais teria chegado lá;

À minha sogra Professora Maria Monteiro, pela sua atenção e torcida e por nos ajudar com a Giovanna mesmo nos momentos mais difíceis;

Aos meus queridos cunhados Flavio e Fleury Junior, a quem eu também considero meus irmãos, obrigado pela ajuda de vocês;

Às minhas cunhadas Nubia e Manu, valeu pela força em todos os aspectos;

Aos meus sobrinhos Fleury Neto e Flavinho, meus eternos amigos do peito;

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia Lucas, Fernanda, Hadassa, Renee, Beth, Isabel, Fabiana, Silvia Toledo, Silvinha, Daniela, Juliana Coutinho e Juliana Banwart, obrigado pela convivência do dia-a-dia. Apreendi muito com vocês e fico na esperança de um dia nos encontrarmos novamente;

Às Farmacêuticas do Hospital Universitário da USP Lilian Passadore, Silvia Regina (Silvinha), Stela e Angélica, o meu muito obrigado pela atenção de vocês;

Ao técnico do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP João, que muitas vezes me auxiliou na abordagem das mães para que fosse realizada a coleta da amostra da criança;

Aos médicos pediatras do Hospital Universitário da USP (Pronto Socorro Infantil), em particular à Dra Eloisa Correa Souza e ao Dr Alfredo Elias Gilio e a todos os residentes que ajudaram dando-me informação sobre os casos;

Às secretárias da Faculdade de Farmácia da USP Ana Dantas, Sueli, Dora e Edna, obrigado pelos esclarecimentos sempre que necessitei;

Ao Seu Elio, que virou um amigo muito especial pra mim. Obrigado por sua atenção comigo e com a minha família.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Agentes Etiológicos da Diarreia Aguda.....	14
2. OBJETIVOS.....	29
2.1. Objetivo Geral.....	29
2.2. Objetivos Específicos.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1. Casuística.....	30
3.2. Isolamento Bacteriano.....	31
3.3. Identificação dos Isolados.....	32
3.4. Sorotipagem dos Patógenos Isolados e Identificados Bioquimicamente.....	33
3.5. Pesquisa dos Fatores de Virulência de <i>Escherichia coli</i>	34
3.5.1. Preparo dos Filtros para Hibridação.....	35
3.5.2. Marcação de Fragmentos de DNA com Nucleotídeo Radioativo....	35
3.6. Pesquisa de Rotavírus e Adenovírus.....	36
3.7. Análise Estatística.....	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1. Prevalência de Enteropatógenos.....	37
4.2. Prevalência de Enteropatógenos isolados.....	40
4.3. Prevalência de Enteropatógenos de acordo com a Faixa Etária.....	40
4.3.1. <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	40

4.3.2. <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC).....	41
4.3.3. <i>Escherichia coli</i> enteroinvasora (EIEC).....	41
4.3.4. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	42
4.3.5. <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC).....	42
4.3.6. <i>Shigella</i>	42
4.3.7. <i>Salmonella</i>	43
4.3.8. <i>Campylobacter</i>	43
4.3.9. <i>Yersinia</i>	43
4.3.10. <i>Rotavírus</i>	44
4.3.11. <i>Adenovírus</i>	44
4.3.12. Infecções Mistas.....	45
4.3.13. Sorotipos de <i>E. coli</i> diarreiogênica.....	45
5. DISCUSSÃO.....	47
6. CONCLUSÃO.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ANEXO 1.....	71
ANEXO 2.....	77
ANEXO 3.....	78

RESUMO

A diarreia ainda persiste como um problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de mortalidade infantil nos países em desenvolvimento, principalmente em crianças abaixo de 5 anos. Este estudo teve por objetivo avaliar a etiologia das diarreias agudas em crianças de 0 a 5 anos atendidas no Hospital Universitário da USP em um estudo caso-controle. As fezes de 260 casos e 58 controles foram coletadas por suabe retal e conservadas em meio Cary-Blair até o momento da sementeira. As bactérias pesquisadas foram *Escherichia coli* diarreiogênicas (EPEC, EIEC, EAEC, EHEC, ETEC), *Salmonella* sp, *Shigella* sp, *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter* sp. Os meios de cultura utilizados para isolamento das bactérias foram Ágar SS e Ágar MacConkey. Após incubação por 24 horas a 37°C, as bactérias foram identificadas fenotipicamente utilizando-se EPM-MILI-Citrato. Posteriormente, as bactérias enteropatogênicas foram aglutinadas com anti-soros específicos polivalentes. Para isolamento de *Campylobacter* sp foi utilizado Ágar Karmali incubado a 42°C por 48 horas em microaerofilia. Foram também pesquisados os fatores de virulência de *Escherichia coli* por colony-blot, utilizando sondas genéticas marcadas radioativamente. Os agentes virais pesquisados foram Rotavírus e Adenovírus em 134 crianças utilizando-se kit ROTA-*VIKIA* ADENO pelo método imunocromatográfico. Neste trabalho foi possível observar que a prevalência dos agentes foi: EPEC – casos: 34(13%), controles: 5(8,6%); EAEC – casos: 27(10,3%), controles: 8(13,7%); EIEC – casos: 5(1,9%); controles: 0; *Shigella sonnei* – casos: 7(2,7%); controles: 0; *Shigella flexneri* – casos: 4(1,5%), controles: 0; *Salmonella* – casos: 7(2,7%), controles: 1(1,7%); *Campylobacter* sp – casos: 4(1,5%), controles: 0; Rotavírus – casos: 21(17,3%), controles: 1(7,7%); Adenovírus – casos: 6(5%), controles: 1(7,7%) e Rotavírus + Adenovírus – casos: 2(1,7%), controles: 1(7,7%). O agente etiológico mais encontrado foi *Rotavirus* e se caracterizou como o único patógeno que apresentou significância estatística entre casos e controles ($p<0,01$). Ocorreu uma maior prevalência de EPEC atípica em relação à EPEC típica, dados concordantes com outros trabalhos. Houve predominância de *Shigella sonnei* em relação à *Shigella flexneri*, resultados divergentes encontrados em estudos anteriores. *Rotavirus* foi o enteropatógeno mais prevalente, sendo que nove crianças acometidas estavam desidratadas. Dez crianças tiveram infecção mista entre os agentes isolados. Em dezessete crianças do grupo controle (sem diarreia) foram encontrados agentes patogênicos, a saber: EPEC (5), EAEC (8), *Salmonella* (1) e *Rotavirus* + *Adenovirus* (1).

ABSTRACT

Diarrhea remains an important problem worldwide and has been characterized as one of the main causes of infant death in developing countries, especially in children under five years old. The aim of this study was to evaluate the etiology of acute diarrhea in children by case-control attended in São Paulo University Hospital. Fecal samples of 260 cases and 58 matched controls were collected by rectal swabs and conserved in Cary-Blair medium until the moment of seeding. Researched bacterial were diarrheogenic *Escherichia coli* (EPEC, EIEC, EAEC, EHEC and ETEC), *Salmonella* sp, *Shigella* sp, *Yersinia enterocolitica* and thermophilic *Campylobacter* sp. Cultures for bacterium isolation were made in SS agar and MacConkey agar. After incubation at 37°C by 24 h, bacteria were tested using biochemical tests (EPM-MILI-Citrato). For *Campylobacter* isolation was used Karmali agar at 42°C by 48 h in 5% CO₂. Colony-blot hybridization using specific radiolabelled DNA probes was used to identify diarrheogenic *E. coli*. Rotavirus and Adenovirus were sought in 121 cases and 13 controls by ROTA-VIKIA ADENO by immunochromatographic assay. The prevalence of the pathogens were as follows: EPEC – cases: 34 (13%), controls: 5 (1,9%); EAEC – cases: 27 (10,3%), controls: 8 (13,7%); EIEC – cases: 5 (1,9%), controls: 0; *Shigella sonnei* – cases: 7 (2,7%), controls: 0; *Shigella flexneri* – cases: 4 (1,5%), controls: 0; *Salmonella* – cases: 7 (2,7%), controls: 1 (1,7%); *Campylobacter* sp – cases: 4 (1,5%), controls: 0; Rotavirus – cases: 21 (17,3%), controls – 1 (7,7%); Adenovirus – cases: 6 (5%), controls: 1 (7,7%) and Rotavirus + Adenovirus – cases: 2 (1,7%), controls: 1 (7,7%). The main etiologic agent found was *Rotavirus*, which was the only pathogen significant between cases and controls ($p < 0,01$). Atypical EPEC had major prevalence comparing to typical EPEC. *Shigella sonnei* was more isolated than *Shigella flexneri*, a different result found in other studies. Ten children had mixed infection between the isolated agents. In seventeen children of the control group (without diarrhea) were found pathogens, that is: EPEC (5), EAEC (8), *Salmonella* (1) and Rotavirus + Adenovirus (1).

1. INTRODUÇÃO

O trato digestório possui uma população heterogênea de bactérias comensais formando a microbiota intestinal do indivíduo com aproximadamente 10^{12} UFC/mL de conteúdo intestinal (BERG, 1996). Alguns componentes desta microbiota são associados a efeitos benéficos para o hospedeiro, como modulação imune e antagonismo contra bactérias patogênicas, evitando que estas possam eventualmente romper as barreiras de defesa ocasionando um processo infeccioso no intestino.

Quando esses mecanismos naturais de defesa do organismo (pH gástrico, microbiota intestinal, movimentos peristálticos, sais biliares, muco, tecido linfóide associado ao intestino - GALT) são vencidos instalam-se distúrbios, principalmente envolvidos com a regulação eletrolítica intestinal, que é responsável pelo balanço da absorção de água e íons. Dentre eles a síndrome mais comum é a diarreia.

A Organização Mundial da Saúde caracteriza a diarreia como três ou mais evacuações líquidas ou semi-líquidas em 24 horas, ou ainda uma única semi-líquida contendo muco e sangue no período de 12 horas.

A diarreia continua sendo uma das maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo (NATARO, 2006). Está geralmente associada a condições sanitárias precárias. Acomete cerca de 2 milhões de pessoas entre adultos e crianças e está relacionada a uma das principais causas de consulta ambulatorial, sobretudo em países em desenvolvimento (SOUZA et al 2002).

Estima-se que ocorram 2 bilhões de novos casos de diarreia por ano no mundo levando à morte 1,5 milhão de crianças todo ano (WHO, 2009). Em média, crianças abaixo de três anos de idade em países em desenvolvimento experimentam

três episódios de diarreia por ano (WHO, 2005). No Brasil, segundo a Organização Panamericana de Saúde, o número de óbitos de crianças abaixo de cinco anos por diarreia em 2005 foi de 25,2 por 1.000 nascidos vivos (DATASUS). Na Ásia e África, a diarreia é responsável por 8,5% e 7,7% de todas as mortes, respectivamente (WHO, 2009).

Deficiências na nutrição são reconhecidas como um grave problema de saúde e produzem sérias consequências, contribuindo para uma alta mortalidade, direta ou indiretamente, por diarreia (GUERRANT, 2008). Crianças que morrem por diarreia frequentemente apresentam desnutrição assim como a diarreia também é a principal causa de desnutrição em crianças abaixo de cinco anos de idade (WHO 2009). Dentre as causas de mortalidade em crianças menores de cinco anos de idade (Figura 1), a diarreia encontra-se em segundo lugar, com taxas de aproximadamente 17%, sendo precedidas apenas por pneumonia (WHO, UNICEF 2008).

Figura 1: Causas de mortalidade em crianças abaixo de cinco anos (Situação Mundial da Infância 2008 – WHO e UNICEF).

A diarreia constitui também uma das maiores causas de hospitalização especialmente em crianças (MAST, 2009), elevando bastante os custos do sistema de saúde. Nos Estados Unidos, o custo anual com diarreia aguda está em torno de 5 a 6 bilhões de dólares. Neste mesmo país, a diarreia associada à hospitalização tem diminuído, com estimativas de 1,5% entre adultos e 2% entre crianças abaixo de cinco anos, sendo o custo médio do binômio diarreia-hospitalização estimado em torno de 2,307.00 dólares (TALLEY et al 2007). O percentual de óbitos por doença diarreica aguda vem declinando progressivamente em todas as regiões brasileiras. Nas regiões Norte e Nordeste, mesmo tendo apresentado grande redução, os valores ainda permanecem em patamares elevados. A redução observada indica possível melhoria das condições de vida e de saneamento, bem como da atenção básica à saúde da criança.

A implementação de políticas de saúde adequadas pelas autoridades mundiais têm sido de fundamental importância para que se possa diminuir a morbidade e mortalidade da doença diarreica, revertendo o quadro caótico em que muitos países se encontram.

O Governo Brasileiro e os outros 188 países membros da ONU (Organização das Nações Unidas) estão envolvidos na execução de um plano para combater os principais problemas mundiais até 2015, principalmente pobreza e fome. Dentre esses objetivos, destacamos a redução da mortalidade infantil em pelo menos 2/3 (UNICEF, 2004). No Brasil, a taxa total de mortalidade infantil em crianças menores de um ano teve uma queda de 47,1 óbitos em 1990 para 19,3 mortes em 2007 para cada mil bebês nascidos vivos, correspondendo a uma redução de 59,7% nesse período (MINISTÉRIO DA SAÚDE – Pacto pela Redução da Mortalidade Infantil).

Como medidas necessárias no combate à doença diarreica destacamos melhorias no saneamento básico, acesso adequado à água e alimentos, promoção do aleitamento materno e a introdução da terapia de reidratação oral (TRO) como prática efetiva e de baixo custo no que diz respeito à redução da desidratação e consequentemente da morte por diarreia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1993). No entanto, parece que isso não tem sido suficiente, visto que a doença continua com altos índices em nosso meio, quando comparados com países desenvolvidos. Faz-se necessário, portanto, uma participação eficaz do sistema de saúde, principalmente no aspecto sanitário, quanto ao seu papel no combate às taxas de desidratação e morte pela mesma. Vale ressaltar também a importância da implantação de campanhas educativas sobre a doença.

Fatores como globalização da economia, intensa migração das populações em viagens nacionais e internacionais, novos hábitos alimentares, processos tecnológicos na produção dos alimentos (como uso de antibióticos na criação de animais), têm sido apontados como responsáveis pela mudança no perfil das diarreias no mundo e pelo surgimento de novos patógenos (CVE, 2008).

A diarreia é uma doença auto-limitada que geralmente não deve ser tratada com antibióticos. Somente nos casos em que a doença ocasiona uma desidratação grave juntamente com muco e sangue e dependendo da condição imunológica do paciente pode ser prescrito tratamento com antibióticos. Devem ser prescritos antibióticos também nos casos de cólera ou diarreia persistente.

Do ponto de vista clínico, a diarreia é classificada levando-se em conta certas características, como o aspecto das fezes (aquosas, gordurosas etc) e segundo o tempo de duração (aguda e persistente) (BALDI et al 2009). A diarreia aguda dura em média até quatorze dias, enquanto que a persistente ultrapassa esse

tempo. Através dessa análise, o médico pode melhor compreender os sintomas que o paciente apresenta e tomar as medidas necessárias para controle e prevenção. A diarreia secretória é a mais importante na clínica dentre as diarreias agudas em termos de frequência, prevalência e mortalidade. Caracteriza-se por um desequilíbrio entre absorção e secreção de íons e eletrólitos ao nível intestinal ocasionando fezes aquosas. O foco deste trabalho são as diarreias agudas, por serem importantes causas de desidratação, hospitalização e morte em crianças.

As principais causas de diarreia são infecções por bactérias, vírus e parasitas, presentes em água ou alimentos contaminados, alergias, medicamentos e doença inflamatória intestinal.

1.1 AGENTES ETIOLÓGICOS DA DIARREIA AGUDA

Escherichia coli diarreiogênica

E. coli coloniza o nosso intestino em poucas horas após o nascimento coexistindo com o hospedeiro saudável em mutualismo benéfico para ambos. Existem dois grandes grupos de *E. coli*: um está presente no intestino desde o nascimento até a morte e o outro causa diferentes tipos de infecção. As categorias que causam infecção intestinal são coletivamente chamadas de *E. coli* diarreiogênicas (DEC) e as associadas a infecções extra-intestinais são chamadas de EXPEC (*Extraintestinal Pathogenic E. coli*) (TRABULSI et al 2008). DEC compreendem seis patotipos ou categorias baseados nos distintos fatores de virulência, nos diferentes quadros clínicos, nos padrões de adesão às células epiteliais, nas diferenças epidemiológicas e nos diferentes sorotipos O:H. São elas:

E. coli enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* com padrão de adesão difuso (DAEC) (KAPER et al 2004). As EXPEC podem, quando apresentam propriedades virulentas, causar infecções urinárias (UPEC), meningites em recém-nascidos (MNEC), pneumonias e septicemias (TRABULSI et al 2008).

E. coli enteropatogênica clássica

Os primeiros estudos relacionando EPEC com diarreia humana foram publicados na Alemanha em 1920 e 1930 e em seguida confirmados na Inglaterra em 1945 (TRABULSI et al 2008). Constitui-se na maior causa de diarreia em crianças com idade inferior a um ano nos países em desenvolvimento. Contudo, estudos recentes têm mostrado um declínio acentuado na prevalência deste micro-organismo em casos de diarreia (OKEKE et al 2000, RODRIGUES et al 2004, ZAMBONI et al 2004, MORENO et al 2008). As EPECs podem ser classificadas em típicas (tEPEC) e atípicas (aEPEC) (TRABULSI et al 2002). As EPEC típicas, cujos principais sorotipos são O111:H2, O119:H6, O55:H6, O86:H34, O127:H6, O142:H6, O142:H34, estavam relacionadas a surtos de diarreia em países desenvolvidos nas décadas de 40 a 80. Atualmente, são pouco isoladas, havendo maior prevalência das EPEC atípicas, que fazem parte de um grupo que apresentam diversidade maior de sorotipos. Estas se caracterizam como patógenos emergentes de grande importância estando sua frequência aumentada nas diarreias, tanto no Brasil, como na Europa e Estados Unidos. Diferentemente das EPEC típicas, as atípicas não apresentam o plasmídio EPEC *Adherence Factor* (EAF), o qual codifica o *Bundle-*

Forming Pilus (BFP) (NATARO, 2004), este tendo como função principal promover agregação bacteriana com a célula hospedeira. Forma a lesão A/E “*attaching and effacing*” (histopatológica) no epitélio intestinal promovendo adesão íntima da bactéria ao enterócito, rearranjo das proteínas do citoesqueleto e formação do pedestal no sítio de adesão e consequentemente destruição das microvilosidades. Os genes que codificam as proteínas envolvidas na lesão A/E estão localizados numa ilha de patogenicidade de aproximadamente 35kb denominada região LEE (*locus of enterocyte effacement*) (McDANIEL et al 1995). Esta região apresenta 5 operons: LEE 1 a LEE 5. LEE 1, 2 e 3 são responsáveis por codificar o sistema de secreção tipo III. LEE 4 codifica a Esp (*EPEC secreted proteins*), proteínas do sistema de secreção referido anteriormente. LEE 5 (também conhecida como operon tir) codifica a proteína Intimina (eae), a qual se encontra localizada na membrana externa, sendo capaz de realizar aderência íntima da bactéria com a célula hospedeira e o receptor Tir, o qual é translocado para o citoplasma do enterócito através do sistema de secreção tipo III. A aderência de EPEC típica na célula epitelial da mucosa intestinal deve-se inicialmente à fímbria BFP, a mais importante sendo a do tipo IV(*bfpA*) e da proteína Esp-A, esta servindo de canal entre a bactéria e a célula hospedeira. Em seguida acontece a adesão íntima promovida pela Intimina. A partir daí, o receptor Tir se insere na célula hospedeira e, quando fosforilado, promove uma série de eventos responsáveis pela formação do pedestal na membrana apical do enterócito.

E coli enterotoxigênica

A ETEC causa uma diarreia aquosa intensa tanto na infância como na diarreia dos viajantes. Produzem as toxinas LT (termolábil) e ST (termoestável), ou uma das duas. Possuem fímbrias de colonização chamadas CFA (*colonization factor antigen*). A toxina LT é semelhante à toxina colérica sendo classificada em LT-I e LT-II. É composta por uma subunidade A e cinco subunidades B. A subunidade B liga-se a gangliosídeos (GM1 e GD1b) da superfície celular e a subunidade A, porção ativa mediada pela proteína G, é então internalizada. Ela é responsável pela ativação da adenil-ciclase e elevação na produção de AMP cíclico (segundo mensageiro). Este ativa canais de cloro com consequente saída de água, ocasionando a diarreia. A toxina ST pode ser classificada em STa (ou STI) e STb (ou STII). Seu principal mecanismo é ativação de guanilato ciclato c, que, quando da ligação junto com a toxina STa, aumenta os níveis de GMP cíclico (segundo mensageiro) estimulando a secreção de cloro e inibindo a absorção de NaCl resultando em desequilíbrio dos fluidos intestinais (NATARO & KAPER 1998).

E coli enterohemorrágica

A maioria das infecções são causadas pelo sorotipo O157:H7 responsável por vários surtos principalmente nos Estados Unidos. Porém, outros sorotipos tais como O26:H11, O103:H2, O111ac:H8, O113:H?, O118:H16 e O145:H28 possuem fatores de virulência que se caracterizam como EHEC. Sorotipos não-O157 são mais comuns na Europa, Austrália e América Latina, incluindo o Brasil, onde têm sido igualmente associados a casos de diarreia (HEDICAN et al 2009). Entre os

sorogrupos não-O157 associados à doença humana destacamos O26, O103, O111, O113 e O145. O fator de virulência é a produção de toxina shiga-like – similar à toxina produzida pela *Shigella* (Stx), também conhecida como verotoxina (VT). A toxina Stx é associada à colite hemorrágica e/ou síndrome hemolítico-urêmica (SHU) podendo levar à insuficiência renal grave. A toxina Stx é do tipo A/B na proporção de 1:5, respectivamente. A subunidade B faz a ligação da holotoxina ao seu receptor, o glicolípido globotriaosilceramida (Gb3), presente na célula alvo. A subunidade A é a responsável pela toxicidade interrompendo a síntese protéica da célula hospedeira através da clivagem do RNA ribossômico. Esta toxina pode ser dividida em Stx1 e Stx2, sendo que a Stx2 é mais tóxica que Stx1 e está associada mais frequentemente à SHU. Amostras de EHEC isoladas de casos de colite hemorrágica e SHU produzem uma enteroemolisina (Ehx), que pertence à família das toxinas citolíticas do tipo RTX (*repeats in toxin*), cujos genes necessários para sua produção estão contidos em um plasmídeo de alto peso molecular presentes em amostras O157 e não-O157. A contribuição de Ehx na patogênese das doenças causadas por STEC pode ser semelhante à de outras hemolisinas, principalmente em relação à aquisição de ferro, elemento necessário ao metabolismo bacteriano (TRABULSI et al 2008). Vale ressaltar que EHEC também apresenta a região LEE, a mesma presente em EPEC, capaz de codificar os genes responsáveis pela formação do sistema de secreção tipo III, a proteína Intimina e o receptor Tir.

E coli enteroagregativa

A EAEC adere às células epiteliais por um padrão agregativo formando um agregado celular que lembra tijolos empilhados. A EAggEC tem sido associada à

diarreia persistente (com duração superior a 14 dias) no Brasil e em vários outros países desenvolvidos e em desenvolvimento (UBER et al 2006). Toxinas e adesinas têm sido descritas em amostras protótipo de EAEC 17-2 e 042. A amostra 17-2 pertence ao sorotipo O3:H2 isolada em crianças com diarreia no Chile e a amostra 042 pertence ao sorotipo O44:H18 e foi isolada de uma criança com diarreia aguda no Peru. Assim como EPEC, alguns autores propuseram a divisão de EAEC em típicas e atípicas, sendo a diferença entre elas baseada na presença de genes regulados por AggR (típicas) e na ausência desses genes (atípicas) (KAPER et al 2004). Os mecanismos de patogenicidade ainda não estão completamente definidos, mas são descritas quatro toxinas e várias fímbrias importantes. Entre as toxinas podemos citar a *Shigella toxin 1* (ShET 1), *EAEC Stable toxin* (EAST1), *protein of intestinal colonization* (Pic) e *plasmid encoded toxin* (Pet). Entre as fímbrias podemos citar *Aggregative Adherence Factors* (AAF) I, II e III. Há ainda uma proteína de colonização denominada dispersina capaz de promover a dispersão de EAEC na mucosa intestinal aumentando a dispersão da infecção (TRABULSI et al 2008). Sua prevalência em estudos epidemiológicos tem aumentado bastante, sendo responsável por diversas epidemias no mundo (KAPER et al 2004).

E coli enteroinvasora

A primeira descrição de EIEC foi feita por Ewing e Grawatti em 1947. A amostra foi isolada a partir das fezes de soldados americanos durante a segunda guerra mundial. Embora as infecções provocadas por *E. coli* enteroinvasiva sejam raras (mais comuns em adultos e crianças acima de dois anos), essa bactéria é capaz de invadir as células do cólon de forma semelhante à *Shigella* (genes contidos

no plasmídio *pInV*). Durante o processo invasor ocorre uma intensa reação inflamatória na mucosa (PARSOT, 2005). Os fatores de virulência de EIEC são praticamente idênticos aos de *Shigella*. Como a *Shigella*, as EIEC produzem ceratoconjuntivite em cobaias (Teste de *Serény* positivo) e são invasivas em culturas de células Hep-2 (GILLIGAN et al 2004). Clinicamente, a doença causada por EIEC é acompanhada de febre, mal-estar, cólicas abdominais e diarreia aquosa seguida de disenteria consistindo de poucas fezes, muco e sangue (NATARO & KAPER 1998). Amostras de EIEC apresentam propriedades bioquímicas específicas: não descarboxilam a lisina e são frequentemente imóveis quando cultivadas em 0,4% de Agar (ANDRADE et al 2002). Os sorotipos isolados mais comuns são: O28acH-, O29:H-, O112ac:H-, O121:H-, O124:H-, O135:H-, O136:H-, O143:H-, O144:H-, O152:H-, O164:H-, O167:H- e O173:H-.

Salmonella sp

Salmonelose é um termo utilizado para diferenciar infecções intestinais causadas por salmonelas não pertencentes ao sorotipo Typhi ou Paratyphi, que causam a febre tifóide e paratifóide, respectivamente. As salmoneloses são conhecidas por provocarem as gastroenterites agudas sendo normalmente patogênicas para o homem e animais, podendo ocasionalmente invadir a circulação causando bacteremias e infecções extra intestinais. O gênero possui mais de 2000 sorotipos que podem estar envolvidos em infecções do ser humano. As salmonelas são capazes de produzir proteínas localizadas em ilhas de patogenicidade que atuam na membrana celular depois de serem introduzidas no enterócito. São elas as *Salmonella Pathogenicity island* I (SPI 1), SPI 2, SPI 3, SPI 4 e SPI 5. SPI 1 contém

um grupo de genes chamados de *invasive* (*inv*). O gene *inv* codifica, juntamente com outros genes, o sistema de secreção tipo III; SPI 2 também está envolvida na codificação do sistema de secreção tipo III, além de proteínas que são injetadas no hospedeiro; SPI 3 codifica um transportador com alta afinidade por magnésio relacionado à sobrevivência da bactéria nos fagossomos; SPI 4 ainda não tem função conhecida e SPI 5 codifica o gene *sopB* da proteína SopB, a qual está envolvida no aumento de fluidos a partir da secreção de cloro, constatado no processo diarreico. Possuem LPS (lipopolissacarídeos), antígenos O, H, K e Vi, este último confere virulência à bactéria. *Salmonella* entra no organismo por via oral, atravessa a barreira ácida do estômago e passa para o intestino, onde se adere invadindo a mucosa (KUHLE & HENSEL 2004). Para adesão, a bactéria ativa o sistema de secreção já referido injetando proteínas na célula epitelial. Para invadir, a bactéria interage com as células M, é fagocitada e dentro das células fagocitárias replica-se injetando proteínas no citosol do enterócito. A transmissão se dá por alimentos de origem animal contaminados como ovos, aves, carne de vaca, peixes, frutos do mar, sorvetes, leites e queijo de cabra. É importante citar a ocorrência de portador crônico onde 1% dos adultos infectados ainda é capaz de excretar a *Salmonella* nas fezes mesmo após um ano (COBURN et al 2007). A salmonelose constitui um importante problema de saúde pública mundial e no Brasil, principalmente por *S. Enteritidis*, devido ao consumo de ovos crus ou mal cozidos (CVE, 2008). Quando a bactéria é isolada em laboratórios clínicos, os casos devem ser notificados (notificação compulsória) a um centro de referência, como o Instituto Adolfo Lutz, para que os devidos cuidados sejam tomados evitando-se supostos surtos pela *Salmonella* (CVE, 2009). Estudos realizados pelo Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo no período de 1999 a 2007 mostraram, com base nas

notificações de surtos e diagnóstico laboratorial, que grande parte dos surtos de diarreia ocorridos no Estado de São Paulo deve-se à *Salmonella* spp, em particular à *Salmonella* Enteritidis, representando 43,2% desses surtos.

Shigella sp

A infecção provocada por *Shigella* é conhecida por disenteria bacilar caracterizada por uma infecção aguda do cólon podendo ocorrer diarreia com presença de muco e sangue. O gênero é constituído por quatro espécies: *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. dysenteriae*. Dentre estas, as mais frequentes e isoladas em casos de diarreia no Brasil são as espécies *S. sonnei* e *S. flexneri*. Estima-se que a *Shigella* seja responsável por 160 milhões de casos de diarreia em todo o mundo resultando em várias mortes, especialmente em crianças de países em desenvolvimento (KOTLOFF et al 1999). A shigelose se constitui como um grave problema de saúde pública mundial, cuja infecção está relacionada a baixas condições sanitárias e higiênicas (NIYOGI, 2005). A dose infectante de *Shigella* é bem pequena, cerca de 10 a 100 micro-organismos, o que aumenta a possibilidade de resistência ao pH ácido do estômago (SCHROEDER & HILBI, 2008), devendo a bactéria chegar ao intestino com facilidade para estabelecer a infecção. A *Shigella* produz mecanismos extraordinários de ruptura, invasão e destruição inflamatória das barreiras epiteliais, manipulando a célula hospedeira a seu favor (SANSONETTI, 2006). *Shigella* inicialmente invade o epitélio do cólon pela expressão de quatro proteínas denominadas Ipa A, B, C e D codificadas por um plasmídio de alto peso molecular (*pInv*). A infecção por *Shigella* se dá em duas etapas: a entrada no

enterócito e a disseminação nas células adjacentes, este último crucial para sua virulência (TRABULSI et al 2008).

Campylobacter sp

Importante agente etiológico causador de diarreia, pertence à família *Campylobacteraceae* caracterizando-se como um bacilo Gram negativo curvo, em forma de S ou espiralado. São móveis (monotríquios), sendo a grande maioria microaerófila estrita (precisam de 5 a 6% de O₂ para proliferar). Atualmente são conhecidas 17 espécies, tendo como reservatório natural aves e mamíferos (domésticos ou de vida livre). A espécie mais comum e a que apresenta maior prevalência em casos de diarreia é o *Campylobacter jejuni*, o qual cresce a 42-43°C. Seus fatores de virulência podem ser componentes estruturais ou toxinas. A bactéria possui adesinas que facilitam sua adesão ao epitélio intestinal (flagelo, algumas proteínas de membrana externa e o LPS), embora não possua fímbrias. Em seguida *C. jejuni* invade a célula hospedeira por mecanismos ainda não muito bem elucidados. Em muitos casos, ocorre a manifestação de diarreia, devendo-se principalmente a uma toxina semelhante à enterotoxina termolábil (LT) de *E.coli*, que ativa AMP cíclico levando a um aumento de secreção aquosa ao nível da mucosa intestinal. O único gene cromossomal identificado até agora é o *cdt*, o qual codifica para a toxina CLDT (*cytolethal distending toxin*). Esta provoca alterações morfológicas na célula epitelial com distensão progressiva e morte celular (TRABULSI et al 2008).

Yersinia sp

O gênero *Yersinia* compreende 12 espécies, sendo três patogênicas para o homem. As patogênicas são a *Y. enterocolitica*, *Y. pseudoparatuberculosis* e *Y. pestis*. A espécie responsável por síndromes gastrintestinais é a *Y. enterocolitica*, que é dividida em seis biotipos denominados 1A, 1B, 2, 3, 4 e 5 e a virulência dos biotipos é baseada na presença do plasmídio cromossomal *pYV* (SINGH, 2004). Possui acentuado tropismo pelo sistema linfático e as infecções podem ser adquiridas pela ingestão de alimentos ou água contaminada ou mesmo por transfusão de sangue. O micro-organismo adere e penetra no íleo, produzindo ileíte terminal, linfadenite e enterocolite aguda, com manifestações secundárias de eritema nodoso, poliartrite e, com frequência, septicemia e endocardite (KONEMAN et al 2001). O principal fator de virulência é uma proteína da membrana externa com propriedades de adesão e invasão (sistema de secreção tipo III) e uma enterotoxina termoestável chamada *Y. stable toxin* (*Yst*) (TRABULSI et al 2008).

ROTAVIRUS

Rotavirus são membros da família Reoviridae, gênero Rotavirus. Hoje são conhecidos sete sorotipos do vírus (A a G), sendo que a maioria das infecções em humanos pertencem ao grupo A, embora os grupos B e C já tenham sido encontrados (ESTES, 2001). Não possuem envelope, mas apresentam um nucleocapsídeo com simetria icosaédrica em forma de roda, além dos capsídeos externo e interno e do core viral, este último associado ao ácido ribonucléico (RNA)

de dupla cadeia. O core viral é composto pela enzima transcriptase, as proteínas VP1, VP2 e VP3 e um genoma de RNA com cadeia dupla. Há ainda a proteína VP6 circundando o core, a VP7 (representando a matriz do capsídio externo) e a VP4 (responsável pela penetração celular e virulência). A VP7 é a responsável pela diarreia no homem. A VP4, quando clivada, origina dois fragmentos (VP5 e VP8), sendo a VP5 relacionada à neutralização homotípica e a VP8 heterotípica. Quando Rotavirus ultrapassa as barreiras defensivas do trato digestório penetra em células epiteliais das vilosidades do intestino delgado, particularmente o jejuno e após estende-se até o íleo. As partículas virais são capazes de destruir microvilosidades e atuam alterando o papel da NaK-ATPase. O quadro diarreico advém da ligação de NSP4 (proteína não estrutural dos rotavírus) a receptores de enterócitos não infectados. Por consequência, sucedem-se desestabilização da membrana, aumento de concentração de cálcio do retículo endoplasmático e efluxo em alto grau de cloreto e água para o lúmen intestinal. As infecções por Rotavirus estão entre as principais em todo o mundo e constituem a mais importante causa de diarreia aguda, ocorrendo mais frequentemente no inverno. A taxa de mortalidade é alta por desidratação e acomete especialmente crianças abaixo de cinco anos de idade. A transmissão se dá através de contato pessoa-pessoa ou pela via fecal-oral. Nos Estados Unidos, respondem por cerca de 2,7 milhões de episódios de diarreia anualmente, 55.000 a 70.000 hospitalizações e em torno de 20 a 60 mortes (MAST et al 2009). Ao redor do mundo causa aproximadamente 610.000 mortes em crianças abaixo de cinco anos principalmente em países em desenvolvimento. Nos países em desenvolvimento, é responsável por mais de 80% das mortes em crianças (CORTESE & PARASHAR, 2009). Os casos de hospitalização têm sido estimados em torno de 12 a 42% (ANDREASI et al 2007). No Brasil, existem vários

sorotipos circulantes que permeiam a ocorrência de diarreia, dentre eles o principal é o tipo A, embora tenha sido relatado o sorotipo G5, característico de suínos, infectando crianças (TRABULSI et al 2008, MUNFORD et al 2007). O grupo A também é responsável por cerca de 80.000 hospitalizações de crianças no Brasil (MUNFORD et al 2007). A TRO (Terapia de Reidratação Oral) em muito auxilia a pacientes com sintomas de diarreia por Rotavirus e hoje é uma das principais estratégias de combate à infecção, embora dependendo do caso a recuperação se dê de forma mais lenta. É importante ressaltar que hoje já está no calendário brasileiro uma vacina monovalente que imuniza para o Rotavirus autorizada pelo *Global Advisory Committee on Vaccine Safety* (Rotarix) constatando ausência de evidência de riscos aumentados de intussuscepção (invaginações intestinais), sendo recomendada via oral em duas doses para bebês no período de dois a seis meses de idade (WHO). Já existe também, liberada nos Estados Unidos e no Brasil uma vacina pentavalente do Laboratório Merck destinada a imunizar crianças para o Rotavírus chamada Rotateq. Ao contrário da Rotarix, a Rotateq deve ser dada em três doses.

ADENOVIRUS

São vírus DNA classificados na família *Adenoviridae*, a qual contem quatro gêneros, a saber: Mastadenovirus (vírus de mamíferos), Aviadenovirus (vírus de aves), Atadenovirus (vírus de bovinos, ovinos, patos e marsupiais) e Siadenovirus (vírus de peru e sapo). Os sorotipos são diferenciados baseados em reações de neutralização. Infectam células epiteliais dos olhos, do trato respiratório, do trato digestório e em menor frequência do urinário e fígado. As gastroenterites têm sido

associadas aos sorotipos 40 e 41 acometendo principalmente crianças até 2 anos, mas recentemente tem sido encontrado também o sorotipo 31 causando infecções intestinais. O diagnóstico laboratorial baseia-se na pesquisa do vírus em células especializadas de origem humana, especialmente células de rim embrionário (TRABULSI et al 2008). Têm distribuição mundial e disseminam-se pela via fecal-oral ou por secreções respiratórias e fômites. Após o *Rotavirus*, o *Adenovirus* entérico é a causa mais frequente de diarreia viral em crianças e curiosamente aparece mais nos meses de verão, ao contrário do primeiro, cuja prevalência maior ocorre no inverno.

Em São Paulo, no Hospital Universitário da USP (HU-USP), que atende principalmente à comunidade SUS do bairro do Butantã, o número de atendimentos por diarreia é alto. Entre os anos 2007 e 2009 15.298 pacientes com diarreia foram atendidos no Pronto Socorro (SAME). Destes, 6.016 foram crianças atendidas no Pronto Socorro Infantil. Neste setor, os atendimentos por diarreia no estão em torno de 360 crianças por mês (SAME), o que justifica a realização de um estudo do perfil epidemiológico de enteropatógenos que causam diarreia. Além disso, atualmente verifica-se um crescente aumento de patógenos emergentes envolvidos na doença diarreica (SCHLENKER et al 2008).

Dois estudos epidemiológicos sobre diarreias agudas foram conduzidos no HU-USP, um na década de 1980 (LOMONACO et al 1983, PAVAN et al 1987) e outro na década de 1990 (SOUZA et al 2002). Foram detectados, contudo, nos dez últimos anos, micro-organismos emergentes que estão ganhando importância como agentes etiológicos das infecções gastrintestinais (BASTOS et al 2006, MORENO et al 2008, FRANZOLIN et al 2005, RODRIGUES et al 2004, ZAMBONI et al 2004). Esse trabalho tem como objetivo, portanto, avaliar a importância desses micro-

organismos emergentes como agente etiológico das infecções intestinais nesta população.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a etiologia das diarreias agudas em crianças de zero a cinco anos atendidas no Pronto Socorro Infantil do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo no período de abril de 2008 a março de 2010.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar a etiologia da diarreia aguda em crianças menores de cinco anos com e sem sintomas gastrintestinais;
- Caracterizar fenotípica e molecularmente os seguintes enteropatógenos: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* e *Y enterocolitica*
- Comparar a prevalência de Rotavirus no grupo de crianças desidratadas e não desidratadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

As amostras de fezes de 318 crianças (260 casos e 58 controles) atendidas no Pronto Socorro Infantil do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo foram coletadas usando suabe retal no período de abril de 2008 a abril de 2010 através de Estudo Caso-Controle. Os casos foram constituídos por crianças de zero a cinco anos com diarreia aguda definida como três ou mais evacuações aquosas ou fezes não formadas por dia com duração inferior a 14 dias. Os controles foram compostos por crianças da mesma idade sem sintomas gastrintestinais nos 30 dias anteriores ao atendimento e foram colhidos dentro da mesma semana dos casos. Tanto casos como controles foram provenientes da mesma instituição, a qual atende ao SUS (Sistema Único de Saúde). Os critérios de exclusão adotados foram diarreia além de 14 dias e o uso de antibiótico até 15 dias antes da coleta da amostra em ambos os grupos. As amostras foram semeadas no Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da USP (setor de Microbiologia) a fim de pesquisarmos as enterobactérias patogênicas da família *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli* e seus patotipos, *Salmonella*, *Shigella* e *Y. enterocolitica*) e da família *Campylobacteriaceae* (*Campylobacter* sp). *Rotavirus* e *Adenovirus* foram pesquisados nas fezes de 134 crianças (121 casos e 13 controles). A distribuição das crianças nas faixas etárias menor de 12 meses e acima de 12 até 60 meses pode ser encontrada na Tabela 1.

Tabela 1 - distribuição por faixa etária das 260 crianças com diarreia e 58 sem diarreia.

Faixa etária	Grupo diarreico	Grupo Controle
até 12 meses	127	32
>12 até 60 meses	133	26
TOTAL	260	58

A avaliação clínica das crianças foi realizada através de um questionário aplicado ao responsável, cujas questões formuladas estão descritas no anexo 1. Além disso, a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido descrito no anexo 2 pelo responsável era solicitada com as informações a respeito da pesquisa, número de telefone de contato e endereço eletrônico em caso de dúvidas, visto que uma via era fornecida ao mesmo. O resultado de cada coprocultura foi liberado em cinco dias ficando armazenado no prontuário da criança para que o médico solicitante pudesse também ter acesso. Após a coleta das amostras, as mesmas eram divididas em três grupos, a saber:

- Grupo A (caso): crianças com diarreia aguda que chegaram a desenvolver desidratação (56);
- Grupo B (caso): crianças com diarreia aguda sem desidratação (204);
- Grupo C (controle): crianças sem diarreia aguda (58).

3.2. ISOLAMENTO BACTERIANO

Para estudo bacteriológico, a metodologia utilizada está de acordo com MORENO et al 2008. Resumidamente, as fezes foram colhidas com suabe retal e conservadas em meio Cary-Blair a fim de se pesquisar as bactérias patogênicas

descritas a seguir: *E. coli* e seus patotipos (EPEC, ETEC, EIEC, EAEC, EHEC), *Shigella*, *Salmonella*, *Y. enterocolitica* e *Campylobacter* sp. Em seguida, o material foi semeado em placas de meio de cultura no setor de Microbiologia do Serviço de Laboratório Clínico do HU-USP na seguinte ordem: Ágar SS (*Salmonella-Shigella*), Ágar MacConkey, Ágar Karmalli e Caldo Selenito como enriquecimento e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas com exceção de Ágar Karmalli, o qual foi incubado a 42°C por 48 horas em microaerofilia. Após o período de incubação, as colônias foram identificadas bioquimicamente.

3.3. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

A identificação bioquímica das colônias foi realizada conforme descrito em MORENO et al 2008. Do Ágar SS (*Salmonella-Shigella*) foram escolhidas as colônias que não fermentavam a lactose suspeitas de serem *Shigella* e as produtoras de H₂S suspeitas de serem *Salmonella*. Essas colônias foram submetidas às provas bioquímicas em meios EPM (verificação de fermentação de glicose pelo micro-organismo, produção de H₂S, utilização de urease com liberação de amônia e de L-triptofano desaminase, além de produção de gás de glicose pela bactéria), MILI (prova de motilidade para observar se a bactéria é móvel ou imóvel, indol quando a mesma degrada o triptofano através da triptofanase e lisina descarboxilase) e Citrato de Simmons (verificação da capacidade do micro-organismo em utilizar citrato de sódio como única fonte de carbono) preparados de acordo com as recomendações do fabricante (TOLEDO & TRABULSI 1983). Além disso, foram escolhidas em média quatro a cinco colônias que fermentaram a lactose (lactose positivas) provenientes do ágar MacConkey com características de *E. coli*,

para identificação bioquímica pelo mesmo procedimento de identificação descrito para *Salmonella* e *Shigella*. Para identificação de *Campylobacter* foi realizado bacterioscópico com a coloração de Gram para visualização de bacilos Gram-negativos curvos a partir das colônias que cresceram no ágar Karmali, sendo consideradas positivas as colônias cuja morfologia microscópica era de bacilos pleomórficos em formato de asa de gaivota. Para isolamento de *Y. enterocolitica*, o Ágar MacConkey foi deixado à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) por 48 horas e colônias lactose negativas foram identificadas bioquimicamente pelos métodos padrão de identificação de enterobactérias.

3.4. SOROTIPAGEM DOS PATÓGENOS ISOLADOS E IDENTIFICADOS BIOQUIMICAMENTE

Os sorotipos das bactérias identificadas como *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella* e *Y. enterocolitica* foram triados a partir de reações de aglutinação com anti-soros polivalentes comerciais (PROBAC do BRASIL). Suspensões bacterianas foram preparadas segundo EDWARDS & EWING (1972). Os resultados positivos para um dos soros testados eram enviados para o Instituto Adolfo Lutz a fim de identificarmos o sorotipo monovalente de cada uma delas. Os isolados identificados como amostras com características bioquímicas de *E. coli* foram congelados a menos 80 °C para posterior pesquisa dos fatores de virulência.

3.5. PESQUISA DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Escherichia coli*

As colônias das bactérias caracterizadas bioquimicamente como *E. coli* foram estudadas por hibridação de colônias. Os genes de virulência dos patótipos de DEC foram identificados de acordo com a Tabela 2:

Tabela 2 - Características fenotípicas e genotípicas de DEC

Categorias DEC	Características	Descrição da sonda de DNA	Referências
EPEC típica	Presença do gene <i>eae</i> e do plasmídeo EAF	<i>eae</i> ¹ - pCVD434 (1-kb <i>SalI-KpnI</i>)	Jerse et al, 1990
EPEC atípica	Presença do gene <i>eae</i> e ausência do plasmídeo EAF	<i>EAF</i> ² - pJPN16 (1-kb <i>BamHI-SalI</i>) <i>eae</i> ¹ - pCVD434 (1-kb <i>SalI-KpnI</i>)	Nataro et al, 1985 Jerse et al, 1990
ETEC	Presença dos genes para ST e/ou LT ou a produção das toxina	LT-I ³ - pCVD403 (1.3-kb <i>BamHI</i>) ST-I _p ⁴ - pCVD426 (157-bp <i>PstI</i>) ST-I _h ⁵ - pCVD427 (216-bp <i>EcoRI</i>)	Mosely et al, 1982
EIEC	Presença do pINV ou teste de Serény positivo	pInv ⁶ - pPS55 (2.5-kb <i>HindIII</i>)	Small et al, 1986
EHEC	Presença do gene <i>eae</i> e de genes <i>stx</i> ou produção das toxinas Stx	Stx 1 ⁷ - pJN37-19 (1.142-kb <i>BamHI</i>) Stx2 ⁸ - pNN110-18 (842-bp <i>SmaI-PstI</i>)	Newland et al, 1988
EAEC	Presença do gene EAEC ou expressão do padrão agregativo (AA)	EAEC ⁹ - pCVD432 (1-kb <i>EcoRI-PstI</i>)	Baudry et al, 1990

Hibridação de colônias usando sondas de DNA específicas marcadas foram usadas para identificar os seguintes fatores de virulência de DEC: ¹ gene que codifica para intimina de *E. coli* "attaching and effacing", ² fator de aderência de *E. coli*, ³ enterotoxina termoestável tipo I, ⁴ enterotoxina termoestável tipo I de origem suína, ⁵ enterotoxina termoestável tipo I de humanos, ⁶ plasmídeo de invasão de *E. coli*, ⁷ toxina Shiga 1, ⁸ toxina Shiga 2, ⁹ plasmídeo de aderência de *E. coli* enteroagregativa (Adaptada de Moreno et al., 2008).

Os isolados congelados - 80°C foram incubados em TSB (*Sanofi Diagnostics Pasteur*) a 37°C por 24 horas. Três microlitros do crescimento em caldo foram semeados em ágar MacConkey de acordo com a figura 2. Foram utilizados dois controles positivos para cada gene e um controle negativo (*E. coli* HB101). As sondas pesquisadas estão descritas na Tabela 2. Essas placas foram levadas para a estufa a 37°C por 24 horas e observado o crescimento bacteriano em cada espaço. De posse das placas crescidas, estas eram enviadas ao Laboratório de

Microbiologia da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP) para realização das sondas de hibridação com CTP32 de acordo com técnica descrita a seguir:

3.5.1. PREPARO DOS FILTROS PARA HIBRIDAÇÃO

Inicialmente as amostras foram semeadas em ágar MacConkey utilizando-se palitos estéreis e em seguida as placas incubadas a 37°C. Após crescimento das bactérias nas placas, as mesmas foram, então, levadas ao Laboratório de Microbiologia (EPM-UNIFESP) para identificação das amostras através de ensaios marcados com material radioativo.

3.5.2. MARCAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA COM NUCLEOTÍDEO RADIOATIVO

A técnica de hibridação consiste na comparação das amostras crescidas em ágar MacConkey com as sondas radioativas marcadas com o radioisótopo Redivue deoxicitidina 5'-[α -32P] trifosfato (GENESES). Utilizando-se um papel de filtro sobreposto nas colônias das placas, realiza-se um tratamento de desnaturação e fixação do DNA das colônias no filtro e compara-se com a sonda radioativa observando-se a complementaridade de genes retidos e que são capazes de impressionar um filme de raio-X (X-Omat -K - EASTMAN KODAK, ROCHESTER, USA). A revelação foi realizada no setor de Radiologia do Hospital São Paulo.

3.6. PESQUISA DE ROTAVIRUS E ADENOVIRUS

Para pesquisa de *Rotavirus* e *Adenovirus* foi utilizado o kit da Biomérieux Vikia Rota-Adeno (MANUAL DO FABRICANTE - BIOMÉRIEUX) através de imunocromatografia, permitindo identificação qualitativa de ambos nas fezes humanas. A técnica consiste em homogeneizar as fezes da criança em tampão de diluição (tampão fostato pH 7,2 + azida sódica 0,9 g/L) fornecido e observar a corrida da amostra por capilaridade em placa sensibilizada com anticorpo policlonal de carneiro anti-IgG de rato + anticorpos monoclonais de rato anti-rotavirus e anti-adenovirus + microesferas de poliestireno sensibilizadas com anticorpos monoclonais de rato anti-rotavirus e anti-adenovirus + azida sódica 0,9 g/L. Após 15 minutos de cada teste foi realizada a leitura observando-se uma tira reativa na cor azul para *Rotavirus* e vermelha para *Adenovirus*. Aqueles testes que não apresentavam a tira reativa vermelha para o controle foram considerados inválidos e, portanto, repetidos.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos no estudo foram avaliados pelo software *GraphPad Prisma* através do teste Qui-quadrado e confirmados com teste exato de Fisher. Consideramos as amostras analisadas significativas quando p apresentou valor menor que 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. PREVALÊNCIA DE ENTEROPATÓGENOS

Dentre os 260 casos coletados (grupo A + grupo B), o número de amostras positivas foi de 107 (41,2%), enquanto que nos 58 controles (grupo C) foi de 14 (24%) ($p=0,01$).

A prevalência dos patógenos encontrados na pesquisa por grupo e por faixa etária pode se visualizada nas Figuras 2 a 5.

A Figura 2 mostra a alta prevalência de *Rotavirus* no grupo diarreico com desidratação.

Figura 2: Prevalência de enteropatógenos em crianças desidratadas e sem desidratação com diarreia e crianças sem diarreia

**micro-organismos pesquisados de 121 casos (27 com desidratação e 94 sem desidratação) e 13 controles (sem diarreia)

A Figura 3 mostra a alta prevalência de *Rotavirus* nos casos na faixas etárias de 0 a 12 meses e > 12 até 60 meses e *Rotavirus* + *Adenovirus* nos controles na faixa etária de 0 a 12 meses.

Figura 3: Prevalência de enteropatógenos em 318 crianças na faixa etária de 0 a 5 anos com e sem diarreia (A e B)

** micro-organismos pesquisados de 121 casos e 13 controles

A Figura 4 mostra a alta prevalência de *Rotavirus* no grupo diarreico com desidratação nas faixas etárias de 0 a 12 meses e > 12 até 60 meses. EAEC foi o segundo enteropatógeno mais isolado até 12 meses nesse grupo.

Figura 4: Prevalência de enteropatógenos em 56 crianças na faixa de 0 a 5 anos com diarreia desidratadas (A)

** micro-organismos pesquisados de 27 crianças (15 até 12 meses e 12 acima de 12 meses)

A Figura 5 mostra a alta prevalência de EPEC no grupo diarreico sem desidratação na faixa etária até 12 meses e a alta prevalência de *Rotavírus* na faixa etária > 12 até 60 meses no mesmo grupo.

Figura 5: Prevalência de enteropatógenos em 204 crianças na faixa de 0 a 5 anos com diarreia sem desidratação (B)

** micro-organismos pesquisados de 94 crianças (49 até 12 meses e 45 acima de 12 meses)

4.2. PREVALÊNCIA DE ENTEROPATÓGENOS ISOLADOS

Tabela 3 - Prevalência de enteropatógenos nas fezes de 260 crianças com diarreia e 58 controles sem diarreia

Enteropatógenos	Casos		Controles		Associação com diarreia aguda Valor p
	TPI	UP n(%)	TPI	UP n(%)	
Qualquer patógeno	107	99 (38,1)	14	12 (20,7)	<0,01
EAEC	27	22 (8,5)	8	8 (13,7)	0,21
EPEC	34	29 (11,1)	5	4 (6,9)	0,34
EIEC	5	4 (1,5)	0	0	0,34
Salmonella	7	7 (2,7)	1	0	0,21
Shigella	11	11 (4,2)	0	0	0,11
Campylobacter	4	0	0	0	-
Rotavirus*	21	19 (15,7)	1	0	<0,01
Adenovirus*	4	3 (2,5)	1	0	>0,05

TPI – Total de Patógenos Isolados

UP – Patógenos Únicos

E coli Enterohemorrágica, *E coli* Enterotoxigênica e *Yersinia enterocolitica* não foram isoladas na pesquisa

*Micro-organismos estudados em 134 crianças (121 casos e 13 controles)

4.3. PREVALÊNCIA DE ENTEROPATÓGENOS ISOLADOS DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA

4.3.1. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

A Tabela 4 mostra os resultados de prevalência de EPEC nos casos e controles. Nos casos, EPEC foi isolada de 34 (13,1%) crianças, enquanto que nos controles de 5 (8,6%) crianças. Desse total, 17 (6,5%) foram identificadas como EPEC atípica nos casos e três (5,1%) nos controles e somente duas (0,8%) foram identificadas como EPEC típica nos casos.

Tabela 4 – Prevalência de *Escherichia coli* enteropatogênica em 260 casos e 58 controles (p>0,05).

Idade (meses)	Casos		Controles	
	Nº(%)	EPEC(%)	Nº(%)	EPEC(%)
até 12 meses	127(48,8)	19(14,9)	32(55,2)	3(9,3)
>12 até 60 meses	133(51,2)	15(11,2)	26(44,8)	2(7,6)
Total	260(100)	34(13,1)	58(100)	5(8,6)

4.3.2. *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)

Não foram encontrados *Escherichia coli* enterotoxigênica nas 318 crianças estudadas (260 casos e 58 controles). Os genes para as toxinas ST e LT não foram detectados nos ensaios de hibridação com sondas.

4.3.3. *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC)

A Tabela 5 mostra os resultados de prevalência de EIEC nos casos e controles. EIEC foi isolada em cinco crianças nos casos e nenhuma criança nos controles. Considerando as faixas etárias, um isolado ocorreu de 0 a 12 meses e 4 acima de 12 meses.

Tabela 5 – Prevalência de *Escherichia coli* enteroinvasora em 260 casos 58 controles (p>0,05).

Idade (meses)	Casos		Controles	
	Nº(%)	EIEC(%)	Nº(%)	EIEC(%)
até 12 meses	127(48,8)	1(0,7)	32(55,2)	0
>12 até 60 meses	133(51,2)	4(3)	26(44,8)	0
Total	260(100)	5(1,9)	58(100)	0

4.3.4 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

A Tabela 6 mostra os resultados de prevalência de EAEC nos casos e controles. EAEC foi isolada em 27 (10,3%) casos e 8 (13,7%) controles, sendo 23 na faixa de 0 a 12 meses e 12 acima de 12 meses.

Tabela 6 – Prevalência de *Escherichia coli* enteroagregativa em 260 casos e 58 controles (p>0,05).

Idade (meses)	Casos		Controles	
	Nº(%)	EAEC(%)	Nº(%)	EAEC(%)
até 12 meses	127(48,8)	19(14,9)	32(55,2)	4(12,5)
>12 até 60 meses	133(51,2)	8(6)	26(44,8)	4(12,5)
Total	260(100)	27(10,3)	58(100)	8(13,7)

4.3.5. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

Não foi encontrado *Escherichia coli* enterohemorrágica nas 318 crianças estudadas (260 casos e 58 controles). Os genes para as toxinas Stx1 e Stx2 não foram detectados nos ensaios de hibridação com sondas.

4.3.6. *Shigella*

De 11(4,2%) crianças com diarreia foram isoladas *Shigella* sp, sendo que *S. sonnei* foi isolado em 7 crianças, enquanto que *S. flexneri* em 4 crianças. Todas as crianças tinham mais de 12 meses de idade. Este micro-organismo não foi isolado do grupo controle.

4.3.7. Salmonella

A Tabela 7 mostra os resultados de prevalência de *Salmonella* nos casos e controles. *Salmonella* foi isolada de oito crianças, sendo sete do grupo com diarreia e somente um do grupo controle.

Tabela 7 – Prevalência de *Salmonella* em 260 casos e 58 controles ($p>0,05$).

Idade (meses)	Casos		Controles	
	Nº(%)	<i>Salmonella</i> (%)	Nº(%)	<i>Salmonella</i> (%)
até 12 meses	127(48,8)	5(3,9)	32(55,2)	0
>12 até 60 meses	133(51,2)	2(1,5)	26(44,8)	1(3,8)
Total	260(100)	7(2,7)	58(100)	1(1,7)

4.3.8 Campylobacter

Campylobacter sp foi isolado de quatro crianças do grupo com diarreia sem desidratação, no entanto, não foi encontrado em nenhum controle ou em associação com outro patógeno.

4.3.9. Yersinia sp

Este estudo não identificou *Y. enterocolitica* tanto em casos como em controles.

4.3.10. *Rotavirus*

A Tabela 8 mostra os resultados de prevalência de *Rotavirus* em casos e controles. *Rotavirus* foi estudado em 134 crianças (121 casos e 13 controles) e foi isolado de 19 (15,7%) crianças do grupo com diarreia, sendo que 9 (33,3%) apresentavam desidratação (A) e 10 (10,6%) não (B). No grupo controle, *Rotavirus* como patógeno único não foi isolado, porém quando associado ao *Adenovirus* foi isolado de uma criança do grupo controle. Esta associação foi também encontrada em duas crianças do grupo diarreico.

Tabela 8 – Prevalência de *Rotavirus* em 121 casos e 13 controles (p<0,05).

Idade (meses)	Casos		Controles	
	Nº(%)	Rotavirus(%)	Nº(%)	Rotavirus(%)
até 12 meses	64(52,9)	08(12,5)	5(38,5)	0
>12 até 60 meses	57(47,1)	11(19,2)	8(61,5)	0
Total	121(100)	19(15,7)	13(100)	0

4.3.11. *Adenovirus*

A Tabela 9 mostra os resultados de prevalência de *Adenovirus* nos casos e controles. *Adenovirus* foi isolado de sete crianças, quatro em associação com outro enteropatógeno: três com *Rotavirus* e um com EPEC atípica.

Tabela 9 – Prevalência de *Adenovirus* em 121 casos e 13 controles (p>0,05).

Idade (meses)	Casos		Controles	
	Nº (%)	Adenovirus(%)	Nº(%)	Adenovirus(%)
0 – 12	64(52,9)	1(1,6)	5(38,5)	0
>12 até 60 meses	57(47,1)	2(3,5)	8(61,5)	0
Total	121(100)	3 (2,5)	13(100)	0

4.3.12. Infecções mistas

Em dez crianças foram encontradas associações de enteropatógenos, sendo que oito apresentavam diarreia e duas pertenciam ao grupo controle. A Tabela 9 mostra quais foram as associações de enteropatógenos encontradas.

Tabela 10 – Associações de enteropatógenos em 260 casos e 58 controles.

Associação	Quantidade
EAEC + EPEC atípica	3 (B)
EAEC + EPEC típica	1 (B)
EIEC + EAEC	1 (A)
Salmonella + EPEC atípica	1 (C)
Adenovirus* + EPEC atípica	1 (B)
Rotavirus* + Adenovirus*	2 (B); 1 (C)
Total	10

*micro-organismos pesquisados em 134 crianças; (A) Crianças pertencentes ao grupo diarreico com desidratação; (B) Crianças pertencentes ao grupo diarreico sem desidratação; (C) Crianças pertencentes ao grupo controle.

4.3.13. Sorotipos de *E. coli* diarreiogênica

A Tabela 11 mostra os sorotipos de *E. coli* encontrados no presente trabalho. Das 39 amostras de EPEC isoladas neste estudo, quatro foram O126:H2, O88:H8 e O160:H19 (4), sendo esses os sorotipos mais prevalentes. O sorotipo de EAEC mais encontrado foi O20:H30, seguido de O75:H49, O3:H2 e ONT:H2.

Tabela 11 - Sorotipos de *Escherichia coli* encontrados na pesquisa.

EPEC (n=39)	EAEC (n=35)	EIEC (n=5)
02:H1	03:H-(2)	06:H31
06:H-	03:H2(4)	025:H4
08:H19	020:30(5)	049:H10
011:HNT	038:H25(2)	073:H18
015:H18	075:H49(4)	086:H2
025:H4	078:H2(2)	OR:H-
026:H11	086:H2(2)	
033:H34(2)	092:H33	
038:H25(2)	0108:H34(2)	
049:H10	0153:H2(3)	
073:H18	ONT:H-(3)	
088:H8(4)	ONT:H2(4)	
0108:H34	ONT:H10	
0113:H19		
0126:H2 (4)		
0128:H12		
0157:H16		
0158:H53		
0160:H19(4)		
0176:H33		
ONT:H-		
ONT:H2(2)		
ONT:H9		
ONT:H19		
ONT:H45(2)		
OR:H45		

NT: não tipável

As bactérias do gênero *Salmonella* encontrados na pesquisa (8) foram sorotipadas pelo Instituto Adolfo Lutz e encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12 - Sorotipos de *Salmonella* sp encontrados na pesquisa.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C
<i>Salmonella Typhimurium</i>	2	1	0
<i>Salmonella Enteritidis</i>	0	1	0
<i>Salmonella Mbandaka</i>	0	1	0
<i>Salmonella Ohio</i>	0	1	0
<i>Salmonella Give</i>	0	1	0
<i>Salmonella Saintpaul</i>	0	0	1
Total	2	5	1

5. DISCUSSÃO

A diarreia aguda ainda representa um importante problema de saúde pública mundial, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento.

Mesmo com a introdução da Terapia de Reidratação Oral (TRO), em meados dos anos 80, o que constituiu um grande avanço no combate à mortalidade, a diarreia continua tendo especial atenção devido ao aparecimento de enteropatógenos emergentes, de sua relação com questões sanitárias e aos agravos dela decorrentes.

Crianças de zero a cinco anos foram o objeto do presente estudo, principalmente porque nessa faixa etária é onde se dá a maior frequência de diarreia aguda com possíveis complicações.

Das 318 amostras estudadas (260 casos e 58 controles), foram identificados enteropatógenos em 41,5% dos casos e 24% dos controles, sendo a diferença entre os dois grupos significativa ($p=0,0137$) e uma prevalência 1,7 vezes maior nos casos em relação aos controles. Estudos epidemiológicos anteriores em que foram realizados sondas de hibridação para pesquisa de *E. coli* diarreiogênica (ALMEIDA et al 1998, SOUZA et al 2002, MORENO et al 2008) mostraram uma proporção de prevalência maior entre casos e controles. A diminuição dessa relação no nosso estudo pode ser explicada também pela mudança do perfil epidemiológico de enteropatógenos envolvidos com a diarreia aguda. Hoje, com avanço das técnicas, novos agentes estão sendo identificados (SCHLENKER et al 2008). Dentre esses, estão descritas as bactérias *Clostridium difficile* (envolvida em casos após tratamento com antibióticos), *Klebsiella* sp, *Bacterioides fragilis*, *Campylobacter* sp, STEC (*E. coli* produtora da toxina de Shiga), *Edwardsiella tarda*, *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes* e *Laribacter*

hongkongensis. Dentre os agentes virais podemos citar *Astrovirus*, *Adenovirus* tipos 40 e 41, *Aichivírus*, *Norovirus* (atualmente provocando vários surtos) e *Sapovírus* (SCHLENKER et al 2008).

De há muito se relata a importância de EPEC como agente causador de diarreia aguda em crianças (TRABULSI, 1981).

No presente estudo, EPEC foi encontrada em uma prevalência de 13,1% nos casos e 8,6% nos controles. EPEC foi isolada em 12% das crianças com diarreia (tanto grupo A como grupo B). Anteriormente, EPEC constituía-se na principal causa de diarreia aguda em crianças até 2 anos de idade. Este estudo confirma a tendência de menor isolamento de EPEC de crianças com diarreia (RODRIGUES et al 2004; SCALETISKY et al 2002; ZAMBONI et al 2004, MORENO et al 2008). Outro estudo conduzido no mesmo local encontrou 16,2% de EPEC, sendo 9,1% como único agente nos casos e 4,7% nos controles (SOUZA et al 2002). No presente trabalho, das amostras identificadas como EPEC, 91% pertenciam ao grupo de EPEC atípicas. Este resultado mostra que EPEC atípica continua sendo mais prevalente que EPEC típica em estudos epidemiológicos de diarreia realizados com crianças (TRABULSI et al 2002, GOMES et al 2004, FRANZOLIN et al 2005, BUERIS et al 2007, MORENO et al 2008). Nessa pesquisa, os sorotipos de EPEC mais encontrados foram O126:H2, O88:H8 e O160:H19. Almeida et al 1998 encontrou O119, O111 e O128 como sorogrupos de EPEC mais isolados, divergentes com os encontrados nesse estudo. Gomes et al 2004 encontraram seis sorotipos iguais aos encontrados aqui. São eles: O49:H10, O157:H16, ONT:H-, ONT:H2, ONT:H9 e ONT:H19. Dentre os sorogrupos de EPEC encontrados por Rodrigues et al 2004, O26 e O126 foram comuns aos dessa pesquisa.

Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC) é um importante agente causador de diarreia em crianças nos países em desenvolvimento. Nesse trabalho, não encontramos nenhum marcador de virulência (ST e LT) característico de ETEC. Os primeiros ensaios realizados com sondas de hibridação para ETEC foram posteriormente repetidos e novamente caracterizaram-se como negativos. Esse resultado nos intrigou bastante, visto que outros estudos epidemiológicos com diarreia em crianças em São Paulo ainda têm encontrado esta bactéria como agente, cuja prevalência variou de 2,6% a 12,3% (GOMES et al 1989, GOMES et al 1991, ALMEIDA et al 1998, SOUZA et al 2002, ARAUJO et al 2007). Isso nos leva a sugerir que estão acontecendo mudanças no perfil epidemiológico das diarreias em crianças que vivem na região que é atendida pelo Hospital Universitário da USP (Regional do Butantan, zona oeste da cidade de São Paulo).

Escherichia coli enteroinvasora (EIEC) foi isolada em cinco crianças dos casos e em nenhum controle com maior prevalência na faixa etária acima de 12 meses. Uma criança pertencia ao grupo A (diarreia com desidratação) apresentando muco e sangue nas fezes, as outras quatro pertenciam ao grupo B (diarreia sem desidratação). Estudo conduzido anteriormente mostrou menor prevalência de EIEC (SOUZA et al 2002). Moreno et al 2008 encontraram a mesma frequência deste estudo. Além dessa pesquisa, outras conduzidas em outras regiões do país também mostraram baixas frequências de EIEC em crianças com diarreia (ALMEIDA et al 1998, ORLANDI et al 2001, FRANZOLIN et al 2005, SPANO et al 2008). Os sorotipos identificados das amostras não correspondem a nenhum já existente na literatura, devendo, por isso, serem investigados.

Escherichia coli enteroagregativa foi isolada em 10,3% dos casos e em 13,7% dos controles, sendo mais prevalente na faixa etária de 0 a 12 meses (15%).

Comparando-se a faixa etária até 12 meses e acima de 12 até 60 meses nos casos houve diferença estatística ($p=0,0182$). Não houve diferenças significativas entre casos e controles, dado este que corrobora com outros estudos realizados em São Paulo (SOUZA et al 2002; ALMEIDA et al 1998, RODRIGUES et al 2004, GOMES et al 1991). EAEC também foi encontrada em infecções mistas associadas com EPEC típica, EPEC atípica e EIEC. Tendo em vista a alta prevalência deste micro-organismo associado a outros patógenos podemos especular a importância dele como enteropatógeno em diarreias agudas em centros urbanos desenvolvidos como São Paulo (GOMES et al 1991, SOUZA et al 2002), uma vez que, em outros centros, os dados mostraram diferenças importantes entre o grupo diarreico e o grupo controle (MORENO et al 2008, ZAMBONI et al 2004). As limitações para identificação deste enteropatógeno no laboratório de rotina dificultam o diagnóstico, pois o patotipo não é constituído por sorotipos bem definidos, ao contrário de EIEC e EHEC (O157:H7). Atualmente, com o avanço das técnicas empregando biologia molecular, acreditamos que em futuro próximo será possível a caracterização de amostras de *E. coli* diarreiogênica na rotina laboratorial. Os sorotipos mais prevalentes de EAEC encontrados nessa pesquisa (O20:H30, O75:H49, O3:H2 e ONT:H2) foram diferentes dos encontrados por Franzolin et al 2005. Foram encontrados seis sorotipos comuns no estudo e em Moreno et al 2008. São eles O3:H2, O92:H33, O153:H2, ONT:H-, ONT:H2 e ONT:H10. Constatamos, então, uma variedade de sorotipos de EAEC no presente estudo, justificando a dificuldade do diagnóstico citada anteriormente.

Amostras de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 e/ou toxinas Stx não foram isoladas neste estudo. Os genes *stx1* e *stx2* pesquisados como marcadores de virulência por sondas radioativas não foram encontrados nas amostras pesquisadas.

Outros estudos também não detectaram este patótipo (MARANHÃO et al 2008, MORENO et al 2008, SOUZA et al 2002) estudando crianças com diarreia no Espírito Santo, na Paraíba e em São Paulo, respectivamente. Ao contrário dos Estados Unidos e outros países da América do Norte, como o Canadá, no Brasil a prevalência de EHEC é pequena e não está envolvida em surtos (ALMEIDA et al 1998, BUERIS et al 2007, FRANZOLIN et al 2005, CERGOLLE-NOVELLA et al 2007). No entanto, fazem-se necessárias várias precauções quanto a essa bactéria, pois devido ao consumo exagerado de carnes industrializadas e alimentos pouco cozidos podemos passar a ter casos esporádicos ou surtos deste enteropatógeno, cujas consequências podem ser bem sérias, principalmente em crianças, uma vez que há relatos de isolamento em fezes de bovinos (CERGOLLE-NOVELLA et al 2007).

A shigelose ainda é considerada um importante problema de saúde pública mundial, especialmente em países em desenvolvimento (NIYOGI, 2005). Segundo Jafari et al 2008, barreiras efetivas contra a doença consistem em manter uma vigilância continuada na segurança de alimentos, inclusive de quem os manipula e ter especial atenção quanto aos aspectos higiênicos e sanitários. *Shigella* sp foi isolada neste estudo em 11 (4,2%) casos na faixa etária acima de 12 meses, porém não foi encontrada em nenhum controle. Detectamos uma maior prevalência de *S. sonnei* em relação à *S. flexneri*, com proporção de 7 para 4 casos, respectivamente. Podemos sugerir que está havendo uma inversão dessas duas espécies de *Shigella* na população estudada, similar em países desenvolvidos (KOTLOFF et al 1999). Diniz-Santos et al 2005 acharam, estudando crianças com diarreia em Salvador, *S. sonnei* em 80,1% das crianças e *S. flexneri* em 19,9%, mesma prevalência de espécies do nosso estudo. Medeiros et al 2001 evidenciaram também uma maior

prevalência de *S. sonnei* (63,2%). Souza et al 2002 encontraram resultados de *S. flexneri* maior que *S. sonnei*. Outros estudos também relatam maior prevalência de *S. flexneri* em relação à *S. sonnei* (ORLANDI et al 2001, ASHKENAZI 2004, MORENO et al 2008). Nos países desenvolvidos, a prevalência de *S. sonnei* sempre foi na ordem de 70-80% quando comparada com *S. flexneri*. De 2005 a 2008 foram identificadas, no Hospital Universitário da USP, amostras de fezes com *Shigella* sp de coproculturas em pacientes com diarreia muitas vezes sanguinolenta. Das 82 amostras de *Shigella* isoladas, 73% eram *S. sonnei* e 27% *S. flexneri* (Dados do Serviço de Laboratório Clínico – Microbiologia).

Salmonella sp foi encontrada em oito crianças, sendo 7 (2,7%) casos e 1 (1,7%) controle. Nos casos, cinco destas crianças eram da faixa de 0 a 12 meses e 2 acima de 12 meses, enquanto que no controle a criança estava situada na faixa acima de 12 meses. O sorotipo mais prevalente foi o Thyphimurium, presente em duas crianças que desenvolveram desidratação e uma criança sem desidratação. Os outros sorotipos encontrados (*S. Enteritidis*, *S. Mbandaka*, *S. Ohio* e *S. Give*) foram isolados em apenas uma criança cada. *S. Saintpaul* foi isolada de uma criança do grupo controle (sem diarreia) em associação com EPEC atípica. No nosso trabalho, *Salmonella* foi o quarto patógeno mais isolado de crianças com diarreia e desidratação (grupo A). Medeiros et al 2001 encontraram *Salmonella* como quarto enteropatógeno mais isolado de casos em Ribeirão Preto. Spano et al 2008 isolaram *Salmonella* em 6 (2,7%) crianças com diarreia e em nenhum controle, inclusive associada com patótipos de *E. coli*. Orlandi et al 2001 encontraram *Salmonella* em 9 (6,9%) casos e 1 (2,4%) controle. Anteriormente, *Salmonella* aparecia como um dos principais agentes isolados de crianças com e sem diarreia (GOMES et al 1991), mas hoje o percentual de frequência de isolamento desta bactéria tem diminuído

bastante, principalmente devido à melhora no saneamento básico e preparo dos alimentos (PONTUAL et al 2006, SOUZA et al 2002).

Campylobacter sp foi encontrado em 4 (1,5%) crianças, sendo 1 na faixa etária de 0 a 12 meses e 3 na faixa etária acima de 12 até 60 meses. Porém, não foi isolado em nenhum controle. Moreno et al 2008 isolaram a bactéria em 7(2,4%) casos em estudo realizado no nordeste. Por dificuldades técnicas, *Campylobacter* sp se caracteriza como um patógeno que necessita de condições especiais para seu isolamento e identificação. Há necessidade, pois, de meios de cultura especiais e atmosfera de microaerofilia para seu isolamento, além de uma temperatura de 42° para que as espécies enteropatogênicas sejam selecionadas. Esses requerimentos dificultam a pesquisa desse agente na rotina laboratorial, podendo levar a dados subestimados. Observa-se que a prevalência deste micro-organismo vem diminuindo significativamente nos últimos anos na população estudada (PAVAN et al 1987,1991; SOUZA et al 2002). A frequência de isolamento desse agente é baixa em estudos epidemiológicos realizados no Brasil (ALMEIDA et al 1998, ORLANDI et al 2001, MEDEIROS et al 2001), no entanto, nos Estados Unidos estimam-se 2,5 milhões de casos por ano de gastroenterite causada por *Campylobacter jejuni* (CORTEZ et al 2006). Uma das principais consequências da infecção por *Campylobacter* é uma paralisia neuromuscular denominada Síndrome de *Guillain-Barré*. Por isso, são necessários mais estudos envolvendo esse patógeno e a diarreia em seres humanos inclusive para compreender melhor seu mecanismo de ação.

Rotavirus tem ocorrência mundial e é uma das maiores causas de desidratação severa hospitalização e por diarreia aguda principalmente em crianças. A cada ano estimam-se 111 milhões de episódios de diarreia por *Rotavirus*, 2

milhões de hospitalizações e 400.000 mortes em crianças abaixo de 5 anos (BINKA et al 2003, PARASHAR et al 2009). Na nossa pesquisa, foi o patógeno mais isolado em crianças com diarreia desidratadas (grupo A). Também foi encontrado no grupo controle em associação com *Adenovirus* (C). *Rotavirus* foi estudado em 134 crianças e foi encontrado em 19 (15,7%) crianças do grupo diarreico. Considerando as faixas etárias, *Rotavirus* esteve presente em 8 crianças de 0 a 12 meses e 11 crianças acima de 12 até 60 meses nos casos. A análise estatística não mostrou significância quando comparamos os casos em relação aos controles. O número de infecções por *Rotavirus* nas crianças estudadas foi pequeno quando comparado a outras décadas em que era bem mais elevado. Lomonaco et al 1983 encontraram *Rotavirus* em 55% das crianças estudadas no Hospital Universitário da USP na década de 80. Munford et al 2007 detectaram 54(28,9%) amostras de fezes com *Rotavirus* em estudo realizado no mesmo local na década de 90. Souza et al 2002 isolaram *Rotavirus* como patógeno único em 32 (20,8%) amostras de crianças de 0 a 5 anos também no Hospital Universitário da USP. Orlandi et al 2001 já obtiveram uma prevalência de 19,2% de *Rotavirus* em crianças de 0 a 5 anos em Porto Velho - Rondônia. Barnes et al 1998 reportaram infecção pelo patógeno em 39,6% de 3.785 crianças hospitalizadas com gastroenterite entre 1980 e 1993 na Austrália. Segundo o CDC (Center for disease and control), uma análise feita entre 2001 e 2008 indicou que aproximadamente 40% das hospitalizações por diarreia em crianças menores de 5 anos foi atribuída ao *Rotavirus*. Os dados apresentados no presente trabalho estão sendo ampliados para se poder avaliar ao papel da introdução da vacina na rede pública.

Adenovirus foi isolado em 2,5% dos casos sendo 1 na faixa etária de 0 a 12 meses e 2 acima de 12 até 60 meses. Nos controles, foi isolado em 1 criança de 0 a

12 meses associado com *Rotavirus*. Poucos são os estudos epidemiológicos que investigam a participação de *Adenovirus*, porém, após *Rotavirus*, ele é a principal causa de gastroenterite viral em crianças (SDIRI-LOULIZI et al 2009). Felizmente, não tem sido relacionado *Adenovirus* com diarreia severa. No mundo, *Adenovirus* é detectado em prevalência pequena. Em países industrializados, a prevalência fica em torno de 3 a 5 %, como Austrália, França e Japão. Nos países em desenvolvimento, a prevalência é variável: Vietnam (2,8%), Bangladesh (3,4%) e Tailândia (4,4%) (HERRMANN et al. 1988; JARECKI-KHAN et al. 1993; LI et al. 2005), ao passo que foram detectadas altas prevalências na Guatemala (31,2%) e Nova Guinéa (26%) (SIBA & SANDERS 1989; CRUZ et al 1990). No Brasil, Andreasi et al 2007 encontraram 3,6% de crianças infectadas com *Adenovirus*, prevalência acima da nossa (2,5%). Miagostovich et al 2008 detectaram, estudando a contaminação da água por vírus em regiões urbanas e rurais de Manaus, 30,8% de *Adenovirus*, sendo o segundo vírus mais prevalente. Magalhães et al 2007 detectaram uma prevalência de *Adenovirus* em crianças abaixo de 5 anos maior que a nossa (6,4%). Sugerimos, então, novos estudos no Hospital Universitário da USP para avaliar os sorotipos circulantes de *Adenovirus*.

Os percentuais de isolamento de *Salmonella* (2,7%) são diferentes quando comparamos com outras regiões do país. Moreno et al 2008 encontraram este patógeno em 4,1% dos casos. Diniz-Santos et al 2005 recuperaram *Salmonella* em 5% das crianças estudadas. Gomes et al 1991 isolaram esse agente em 8% das crianças. Almeida et al 1998 identificaram *Salmonella* em 5,6% das crianças, enquanto Souza et al 2002 encontraram este agente em apenas um caso estudando crianças na mesma região. *Shigella* sp é um dos patógenos isolados com maior prevalência no Nordeste (LIMA et al 1995, MARANHÃO et al 2008, MORENO et al

2008). Em São José do Rio Preto - SP, Almeida et al 1998 isolaram *Shigella* em 21% dos casos, sendo que a maior prevalência foi da espécie *S. flexneri*. Gomes et al 1991 encontraram 5% de espécies desse patógeno. Souza et al 2002 encontraram 3,9% do mesmo agente, percentual similar ao encontrado neste estudo. Esta pesquisa também isolou *S. sonnei* em maior prevalência em relação à *S. flexneri*. Sugerimos, então, que a mudança nessas espécies em São Paulo está de acordo com países desenvolvidos (KOTLOFF et al 1999, MAMMINA et al 2006, SIVAPALASINGAM et al 2006, DREWS et al 2010).

Surpreendentemente, até o momento não foram detectadas amostras de ETEC entre as 950 colônias de *E. coli*. Os resultados foram revistos quanto à positividade dos padrões utilizados em cada filtro sem que problemas fossem detectados. Cem colônias foram escolhidas aleatoriamente para serem novamente processadas e o resultado foi validado. ETEC é um importante agente causador de diarreia em crianças nos países em desenvolvimento. Este resultado é bastante intrigante, visto que outros estudos epidemiológicos com diarreia em crianças em São Paulo tiveram prevalência de 2,6% a 12,3% (GOMES et al 1989, GOMES et al 1991, ALMEIDA et al 1998, SOUZA et al 2002). Estudo mais recente, realizado com 447 crianças na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, mostra prevalência de 0,4% de ETEC (ARAUJO et al, 2007). Contudo, estudo conduzido no Piauí, região Nordeste do país, isolou ETEC em 9,2 % e 4 % dos casos e controles, respectivamente (NUNES et al 2011).

Dados obtidos pelo presente estudo mostram outros resultados interessantes que nos levam a sugerir que o perfil epidemiológico das diarreias em crianças menores de 5 anos que vivem em São Paulo está mudando. Podemos destacar o dado que nos mostra que não há a prevalência significativa de um

determinado agente, com exceção de *Shigella* sp e de *Rotavirus*, que permanecem como agente importante de diarreia, principalmente no grupo diarreico que apresentava desidratação ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Estes dados obtidos no presente trabalho poderiam estar indicando melhora nas condições sanitárias dessa população?

Ao contrário de Araujo e colaboradores (ARAUJO et al 2007), não foi encontrada prevalência significativa entre os patótipos de *E. coli* diarreiogênica. A comparação entre os dois estudos foi prejudicada, pois os autores não deixaram claro quantas crianças sem diarreia de baixo nível sócio-econômico foram incluídas no estudo, uma vez que eles estudaram dois grupos sociais diferentes e um grupo controle.

Além disso, as colônias de *E. coli* que foram negativas para os ensaios de hibridação (sonda genética) para a pesquisa de marcadores de patótipos de *E. coli* diarreiogênica foram submetidas a ensaios de adesão em linhagem de célula Hep2. Este fato deve ser salientado, pois, antes das adesões serem processadas, a prevalência de EPEC atípicas isoladas do grupo diarreico era de 12,1 %, enquanto a de EAEC foi de 7,7 %. Após a compilação dos dados obtidos pelo ensaio de adesão, aEPEC passou para o terceiro patótipo mais isolado, atrás de EAEC (12,5%) e de DAEC (10,4%), sem que nenhum deles mostrasse significância estatística. Temos ainda aproximadamente 400 colônias para realizar a adesão. Sendo assim esses dados poderão ser alterados. Dessa forma, os dados obtidos poderão permitir avaliar a importância de se pesquisar *E. coli* diarreiogênica apenas por adesão. O papel de cepas dessa categoria de patógeno, detectada unicamente pelo tipo de adesão, uma vez que os tradicionais marcadores genéticos não foram detectados, deve ser melhor estudado. No grupo controle do presente estudo foram detectados

35% das crianças que tinham uma cepa considerada enteropatogênica apenas pelo ensaio de adesão; no grupo diarreico sem desidratação 37 % e no grupo com diarreia com desidratação apenas 10 % ($p < 0,05$).

Outro dado que nos chama atenção é a prevalência de 8 % de EPEC atípica e 0,8 % de EPEC típica no grupo das crianças menores de 1 ano de idade. Esses dados são importantes, pois corroboram com estudos anteriores mostrando uma tendência de diminuição da importância de EPEC típica nos casos de diarreia em São Paulo (ALMEIDA et al 1998, ARAUJO et al 2007, RODRIGUES et al 2004, SOUZA et al 2002).

Estes resultados sugerem que o perfil etiológico da diarreia aguda na população estudada no período de abril de 2008 a abril de 2010 sofreu modificações quando comparamos com outros estudos epidemiológicos na mesma região (LOMONACO et al, 1983; PAVAN et al, 1987; PAVAN et al 1989, SOUZA et al, 2002).

Os dados aqui apresentados sugerem que nas últimas décadas a melhoria nas condições de saneamento básico em São Paulo tem refletido na diminuição dos casos de diarreia e uma redução no índice de mortalidade nas crianças até cinco anos (ANTUNES & WALDMAN 2002, RODRIGUES et al 2004, SACCARDO et al 2005, ROMA & LATORRE 2010).

6. CONCLUSÃO

A execução deste trabalho nos levou a concluir que:

1. *S. sonnei* teve maior prevalência de isolamento em relação à *S. flexneri*, dados que corroboram com outros encontrados em países desenvolvidos;
2. *Rotavirus* teve uma alta prevalência (25%) nas crianças que não apresentavam desidratação (94);
3. A diminuição no isolamento de micro-organismos considerados patogênicos, ausência de ETEC e a ausência de um enteropatógeno dominante sugerem que o perfil etiológico da diarreia aguda na população estudada sofreu modificações ao longo das últimas duas décadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M.T.G.; SILVA, R.M.; DONAIRE, L.M.; MOREIRA, L.E.; MARTINEZ, M.B. Enteropatógenos associados com diarreia aguda em crianças. Jornal de Pediatria, v.74, n.4, p.291-298, 1998.

ANDERSON, E.J. Rotavirus vaccines: viral shedding and risk of transmission. Lancet Infectious Diseases, v.8, n.10, p.642-649, 2008.

ANDRADE, A.; GIRÓN, J.A.; AMHAZ, J.M.K.; TRABULSI, L.R.; MARTINEZ, M.B. Expression and characterization of flagella in nonmotile enteroinvasive *Escherichia coli* isolated from diarrhea cases. Infection and Immunity, v.70, n.10, p.5882-5886, 2002.

ANDREASI, M.S.; BATISTA, S.M.F.; TOZETTI, I.A.; OZAKI, C.O.; NOGUEIRA, M.M.; FIACCADORI, F.S.; BORGES, A.M.T.; SANTOS, R.A.T.; CARDOSO, D.D.P. Rotavirus A em crianças de até 3 anos de idade, hospitalizadas com gastroenterite aguda em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.40, n.4, p.411-414, 2007.

ANDREASI, M.S.; CARDOSO, D.D.; FERNANDES, S.M.; TOZETTI, I.A.; BORGES, A.M.; FIACCADORI, F.S.; SANTOS, R.A.; SOUZA, M. Adenovirus, calicivirus and astrovirus detection in fecal samples of hospitalized children with acute gastroenteritis from Campo Grande, MS, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.103, n.7, p.741-744, 2008.

ANTUNES, J.L.F.; WALDMAN, E.A. Trends and spatial distribution of deaths of children aged 12–60 months in São Paulo, Brazil, 1980–98. Bulletin of the World Health Organization, 80, n.5, p.391-398, 2002.

ARAUJO, J.M.; TABARELLI, G.F.; ARANDA, K.R.; FABBRICOTTI, S.H.; FAGUNDES-NETO, U.; MENDES, C.M.; SCALETSKY, I.C. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. Journal of Clinical Microbiology, v.45, n.10, p.3396–3399, 2007.

ASHKENAZI, S. *Shigella* infections in children: new insights. Seminars in Pediatric Infectious Diseases, v.15, n.4, p.246-252, 2004.

BALDI, F.; BIANCO, M.A.; NARDONE, G.; PILOTTO, A.; ZAMPARO, E. Focus on acute diarrhoeal disease. World Journal of Gastroenterology, v.15, n.27, p.3341-3348, 2009.

BALOWS, A.; HAUSLER Jr., W.J.; HERRMANN, K.L.; ISENBERG, H.D.; SHADOMY, H.J. Manual of clinical microbiology. 5.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. 1364p.

BANGTRAKULNONT, A.; VIEIRA, A.R.; LO FO WONG, D.M.; PORNREONGWONG, S.; PULSRIKARN, C.; SAWANPANYALERT, P.; HENDRIKSEN, R.S.; AARESTRUP, F.M. *Shigella* from humans in Thailand during 1993 to 2006: spatial-time trends in species and serotype distribution. Foodborne Pathogens and Disease, v.5, n.6, p.773-784, 2008.

BARNES, G.L.; UREN, E.; STEVENS, K.B.; BISHOP, R.F. Etiology of acute gastroenteritis in hospitalized children in Melbourne, Australia, from April 1980 to March 1993. Journal of Clinical Microbiology, v.36, p.133-138, 1998.

BASTOS, F.C.; VAZ, T.M.; IRINO, K.; GUTH, B.E. Phenotypic characteristics, virulence profile and genetic relatedness of O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated in Brazil and other Latin American countries. FEMS Microbiology Letters, v.265, p.89–97, 2006.

BAUDRY, B.; SAVARINO, S.J.; VIAL, P.; KAPER, J.B.; KAPER, J.B.; LEVINE, M.M. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *E. coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. Journal of Infectious Diseases, v.161, p.1249–1251, 1990.

BERG, R.D. The Indigenous gastrointestinal microflora. Trends in Microbiology, v.4, p.430-435, 1996.

BINKA, F.N.; ANTO, F.K.; ODURO, A.R.; AWINI, E.A.; NAZZAR, A.K.; ARMAH, G.E.; ASMAH, R.H.; HALL, A.J.; CUTTS, F.; ALEXANDER, N.; BROWN, D.; GREEN, J.; GRAY, J.; ITURRIZA-GÓMARA, M. Incidence and risk factors of paediatric rotavirus diarrhoea in Northern Ghana. Tropical Medicine & International Health, v.8, n.9, p.840-846, 2003.

BUERIS, V.; SIRCILI, M.P.; TADDEI, C.R.; SANTOS, M.F.; FRANZOLIN, M.R.; MARTINEZ, M.B.; FERRER, S.R.; BARRETO, M.L.; TRABULSI, L.R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.102, n.7, p.839-844, 2007.

CAMPELLONE, K.G.; LEONG, J.M. Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. Current Opinion in Microbiology, v.6, n.1, p.82-90, 2003.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica. Monitorização das doenças diarreicas agudas: normas e instruções. 2.ed. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica, 2008.

CERGOLE-NOVELLA, M.C.; NISHIMURA, L.S.; SANTOS, L.F.; IRINO, K.; VAZ, T.M.; BERGAMINI, A.M.; GUTH, B.E. Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil. FEMS Microbiology Letters, v.274, 329–334, 2007.

COBURN, B.; GRASSL, G.A.; FINLAY, B.B. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. Immunology and Cell Biology, v.85, n.2, p.112-118, 2007.

CORNELIS, G.R. *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. Journal of Cell Biology, v.158, n.3, p.401-408, 2002.

CORTESE, M.M.; PARASHAR, U.D.; Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports, v.58, n.2, p.1-25, 2009.

CORTEZ, A.L.; CARVALHO, A.C.; SCARCELLI, E.; MIYASHIRO, S.; VIDAL-MARTINS, A.M.; BÜRGER, K.P. Survey of chicken abattoir for the presence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.48, n.6, p.307-310, 2006.

CRUZ, J.R.; CACERES, P.; CANO, F.; FLORES, J.; BARTLETT, A.; TORUN, B. Adenovirus types 40 and 41 and rotaviruses associated with diarrhea in children from Guatemala. Journal of Clinical Microbiology, v.28, p.1780-178, 1990.

CZECZULIN, J.R.; WHITTAM, T.S.; HENDERSON, I.R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J.P. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. Infection and Immunity, v.67, n.6, p.2692-2699, 1999.

DATASUS. Ministério da Saúde – informações epidemiológicas e morbidade. Disponível em: www.datasus.gov.br. Acesso em: 11 abr. 2010.

DINIZ-SANTOS, D.R.; SANTANA, J.S.; BARRETTO, J.R.; ANDRADE, M.G.; SILVA, L.R. Epidemiological and microbiological aspects of acute bacterial diarrhea in children from Salvador, Bahia, Brazil. Brazilian Journal of Infectious Diseases, v.9, n.1, p.77-83, 2005.

DREWS, S.J.; LAU, C.; ANDERSEN, M.; FERRATO, C.; SIMMONDS, K.; STAFFORD, L.; FISHER, B.; EVERETT, D.; LOUIE, M. Laboratory based surveillance of travel-related *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* in Alberta from 2002 to 2007. Globalization and Health, v.6, n.20, p.1-6, 2010. Disponível em: <http://www.globalizationandhealth.com/content/pdf/1744-8603-6-20.pdf>. Acesso em: 08 mai 2010.

EDWARDS, P.R.; EWING, W.H. Identification of enterobacteriaceae. 3.ed. Minneapolis: Burgess, 1972. 362p.

ESTES, M.K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E., eds. Fields virology. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.1747-1785.

FARHAT, C.K.; CARVALHO, E.S.; CARVALHO, L.H.F.R.; SUCCI, R.C.M. Infectologia Pediátrica. São Paulo: Atheneu, 1994. 617p.

FLETCHER, R.H.; FLETCHER, S.W. Epidemiologia clínica: elementos essenciais. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 288p.

UNICEF. Situação mundial da infância 2008. Brasília: Fundo das Nações Unidas para a Infância, cap.1, p.2-24, 2008.

FRANZOLIN, M.R.; ALVES, R.C.B.; KELLER, R.; GOMES, T.A.T.; BEUTIN, L.; BARRETO, M.L.; MILROY, C.; STRINA, A.; RIBEIRO, H.; TRABULSI, L.R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.100, n.4, p.359-363, 2005.

GUERRANT, R.L.; ORIÁ, R.B.; MOORE, S.R.; ORIÁ, M.O.; LIMA, A.A. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. Nutrition Reviews, v.66, n.9, p.487-505, 2008.

GILLIGAN, P.H.; JANDA, J.M.; KARMALLI, M.A.; MILLER, J.M. Laboratory diagnosis of bacterial diarrhea. Washington: American Society for Microbiology, 2004. 28p. (Cumitech: cumulative techniques and processes in clinical microbiology, 12A).

GOMES, T.A.T.; TRABULSI, L.R. Diagnóstico das infecções intestinais por meio de sondas genéticas. Revista Brasileira de Patologia Clínica, v.24, n.3, p.102-107, 1988.

GOMES, T.A.; BLAKE, P.A.; TRABULSI, L.R. Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse, and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. Journal of Clinical Microbiology, v.27, n.2, p.266-269, 1989.

GOMES, T.A.; RASSI, V.; MACDONALD, K.L.; RAMOS, S.R.; TRABULSI, L.R.; VIEIRA, M.A.; GUTH, B.E.; CANDEIAS, J.A.; IVEY, C.; TOLEDO, M.R. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. Journal of Infectious Diseases, v.164, n.2, p.331-337, 1991.

GOMES, T.A.; IRINO, K.; GIRÃO, D.M.; GIRÃO, V.B.; GUTH, B.E.; VAZ, T.M.; MOREIRA, F.C.; CHINARELLI, S.H.; VIEIRA, M.A. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? Emerging Infectious Diseases, v.10, n.10, p.1851-1855, 2004.

GLOBAL HEALTH. An overview of regional health. Pan American Health Organization, 2007. <http://www.paho.org/french/gov/csp/csp27-stp622-e.pdf>. Acesso em: 10 out. 2009.

HEDICAN EB, MEDUS C, BESSER JM, JUNI BA, KOZIOL B, TAYLOR C, SMITH KE. Characteristics of O157 versus Non-O157 Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Infections in Minnesota, 2000–2006. *Clinical Infectious Diseases*, 49:358–64, 2009.

HERRMANN, J.E.; BLACKLOW, N.R.; PERRON-HENRY, D.M.; CLEMENTS, E.; TAYLOR, D.N.; ECHEVERRIA, P. Incidence of enteric adenoviruses among children in Thailand and the significance of these viruses in gastroenteritis. Journal of Clinical Microbiology, v.26, p.1783–1786, 1988.

ISENBERG, H.D., ed. Clinical microbiology procedures handbook. Washington: American Society for Microbiology, 1992. v.1.

JAFARI, F.; SHOKRZADEH, L.; HAMIDIAN, M.; SALMANZADEH-AHRABI, S.; ZALI, M.R. Acute diarrhea due to enteropathogenic bacteria in patients at hospitals in Tehran. Japanese Journal of Infectious Diseases, v.61, p.269-273, 2008.

JAFARI, F.; HAMIDIAN, M.; REZADEHBASHI, M.; DOYLE, M.; SALMANZADEH-AHRABI, S.; DERA KHSHAN, F.; REZA ZALI, M. Prevalence and antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* species associated with acute diarrhea in Tehran, Iran. Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology, v.19, n.3, p.E56-E62, 2008.

JARECKI-KHAN, K.; TZIPORI, S.R.; UNICOMB, L.E. Enteric adenovirus infection among infants with diarrhea in rural Bangladesh. Journal of Clinical Microbiology, v.31, p.484–489, 1993.

JERSE, A.E.; JUN, Y.; TALL, B.D.; KAPER, J.B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cell. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.87, p.7839–7843, 1990.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology, v.2, n.2, p.123-140, 2004.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; CHRECKENBERGER, P.C.; WINN Jr., W.C.; CURY, A.E., Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465p.

KOTLOFF, K.L.; WINICKOFF, J.P.; IVANOFF, B.; CLEMENS, J.D.; SWERDLOW, D.L.; SANSONETTI, P.J.; ADAK, G.K.; LEVINE, M.M. Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bulletin of the World Health Organization, v.77, n.8, p.651-666, 1999.

KUO, H.W.; KASPER, S.; JELOVCAN, S.; HÖGER, G.; LEDERER, I.; KÖNIG, C.; PRIDNIG, G.; LUCKNER-HORNISCHER, A.; ALLERBERGER, F.; SCHMID, D. A food-borne outbreak of *Shigella sonnei* gastroenteritis, Austria 2008. Wiener Klinische Wochenschrift, v.121, n.3/4, p.157-163, 2009.

KUHLE, V.; HENSEL, M. Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enteric*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. Cellular and Molecular Life Sciences, v.61, n.22, p.2812-2826, 2004.

LI, L.; PHAN, T.G.; NGUYEN, T.A.; KIM, K.S.; SEO, J.K.; SHIMIZU, H.; SUZUKI, E.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. Molecular epidemiology of adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. Microbiology and Immunology, v.49, p.121–128, 2005.

LIMA, A.A.; LIMA, N.L.; PINHO, M.C.; BARROS Jr., E.A.; TEIXEIRA, M.J.; MARTINS, M.C.; GUERRANT, R.L. High frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim- sulfamethoxazole, streptomycin, chloramphenicol, and tetracycline isolated from patients with shigellosis in northeastern Brazil during the period 1988 to 1993. Antimicrobial Agents Chemotherapy, v.39, p.256–259, 1995.

LOMONACO, L.T.; MOURA, R.A.A.; PAVAN, M.F.B.; MAMIZUKA, E.M.; MARTINEZ, M.B. Incidência de *Rotavírus* em diarreias agudas infantis. Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo, v.19, p.56-62, 1983.

MAGALHÃES, G.F.; NOGUEIRA, P.A.; GRAVA, A.F.; PENATI, M.; SILVA, L.H.; ORLANDI, P.P. Rotavirus and adenovirus in Rondônia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.102, n.5, p.555-557, 2007.

MAMMINA, C.; ALEO, A.; ROMANI, C.; NASTASI, A. *Shigella sonnei* biotype g carrying class 2 integrons in Southern Italy: a retrospective typing study by pulsed field gel electrophoresis. BMC Infectious Diseases, v.6, p.117, 2006.

MCDANIEL, T.K.; JARVIS, K.G.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.92, p.1664-1668, 1995.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica. Monitorização das doenças diarreicas agudas: normas e instruções. 2.ed. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica, 2008. 60p. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/doc/mdda08_manual.pdf. Acesso em: 05 mar. 2010.

MARANHÃO, H.S.; MEDEIROS, M.C.; SCALETSKY, I.C.; FAGUNDES-NETO, U.; MORAIS, M.B. The epidemiological and clinical characteristics and nutritional development of infants with acute diarrhoea, in North-eastern Brazil. Annals of Tropical Medicine & Parasitology, v.102, n.4, p.357-365, 2008.

MAST, T.C.; DEMURO-MERCON, C.; KELLY, C.M.; FLOYD, L.E.; WALTER, E.B. The impact of rotavirus gastroenteritis on the family. BMC Pediatrics, v.9, n.11, p.1-9, 2009.

MEDEIROS, M.I.C.; NEME, S.N.; SILVA, P.; CAPUANO, D.M.; ERRERA, M.C.; FERNANDES, S.A.; VALLE, G.R.; AVILA, F.A. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto-SP, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.43, n.1, p.21-24, 2001.

MIAGOSTOVICH, M.P.; FERREIRA, F.F.; GUIMARÃES, F.R.; FUMIAN, T.M.; DINIZ-MENDES, L.; LUZ, S.L.; SILVA, L.A.; LEITE, J.P. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, Central Amazonia, Brazil. Applied and Environmental Microbiology, v.74, n.2, p.375-382, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Assistência e controle das doenças diarreicas. Brasília: Ministério da Saúde, 1993. 43p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Mortalidade Infantil. Pacto pela redução da mortalidade infantil. Diagnóstico no Brasil. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=32203&janela=1. Acesso em: 15 set. 2010.

MORENO, AC.R.; FERNANDES FILHO, A.; GOMES, T.A.T.; RAMOS, S.T.S.; MONTEMOR, L.P.G.; TAVARES, V.C.; SANTOS FILHO, L.; IRINO, K.; MARTINEZ, M.B. Etiology of childhood diarrhea in the Northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v.66, n.1, p.50-57, 2008.

MOSELY, S.L.; ECHEVERRIA, P.; SERIWATANA, J.; TIRAPAT, C.; CHAICUMPA, W.; SAKULDAIPEARA, T.; FALKOW, S. Identification of enterotoxin *Escherichia coli* by colony hybridization using three enterotoxin gene probes. Journal of Infectious Diseases, v.145, p.863-869, 1982.

MUNFORD, V.; SOUZA, E.C.; CARUZO, T.A.R.; MARTINEZ, M.B.; RÁCZ, M.L. Serological and molecular diversity of human rotavirus in São Paulo, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, v.38, n.3, p.459-466, 2007.

NAKANISHI, K.; TSUGAWA, T.; HONMA, S.; NAKATA, S.; TATSUMI, M.; YOTO, Y.; TSUTSUMI, H. Detection of enteric viruses in rectal swabs from children with acute gastroenteritis attending the pediatric outpatient clinics in Sapporo, Japan. Journal of Clinical Virology, v.46, n.1, p.94-97, 2009.

NATARO, J.P.; BALDINI, M.M.; KAPER, J.B.; BLACK, R.E.; BRAVO, N.; LEVINE, M.M. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. Journal of Infectious Diseases, v.152, p.560-565, 1985.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews, v.11, n.1, p.142-201, 1998.

NATARO, J.P.; MAI, V.; JOHNSON, J.; BLACKWELDER, W.C.; HEIMER, R.; TIRRELL, S.; EDBERG, S.C.; BRADEN, C.R.; GLENN MORRIS Jr., J.; HIRSHON, J.M. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. Clinical Infectious Diseases, v.43, n.4, p.402-407, 2006.

NAVANEETHAN, U.; GIANNELLA, R. Mechanisms of infectious diarrhea. Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology, v.5, n.11, p.637-647, 2008.

NEWLAND, J.W.; NEILL, R.J. DNA probes for Shiga-like toxins I and II and for toxin-converting bacteriophages. Journal of Clinical Microbiology, v.26, p.1292-1297, 1988.

NIYOGI, S.K. Shigellosis. Journal of Microbiology, v.43, n.2, p.133-143, 2005.

OKEKE, I.N.; LAMIKANRA, A.; STEINRÜCK, H.; KAPER, J.B. Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood diarrhea in provincial Southwestern Nigeria. Journal of Clinical Microbiology, v.38, p.7-12, 2000.

OLIVA, C.A.G.; SCALETISKY, I.; MORAIS, M.B.; FAGUNDES NETO, U. Diarreia aguda grave associada à *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC): características clínicas e perdas fecais em lactentes hospitalizados. Revista da Associação Médica Brasileira, 43, n.4, p.283-289, 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Disponível em: http://www.who.int/vaccine_safety/topics/rotavirus/statement/en/index.html. Acesso em: 09 jan. 2009.

ORLANDI, P.P.; SILVA, T.; MAGALHÃES, G.F.; ALVES, F.; ALMEIDA CUNHA, R.P.; DURLACHER, R.; SILVA, L.H.P. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants of poor urban areas of Porto Velho, Rondônia: a preliminary study. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.96, n.5, p.621-625, 2001.

PALUMBO, E.; MALORGIO, C.; SIANI, A.; BONORA, G. Diarrhoea in children: aetiology and clinical aspects. Infezioni in Medicina, v.17, n.2, p.95-99, 2009.

PARASHAR, U.D.; BURTON, A.; LANATA, C.; BOSCHI-PINTO, C.; SHIBUYA, K.; STEELE, D.; BIRMINGHAM, M.; GLASS, R.I. Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. Journal of Infectious Diseases, v.200, suppl.1, p.S9-S15, 2009.

PARSOT, C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. FEMS Microbiology Letters, v.252, p.11-18, 2005.

BORGES PAVAN, M.F.; MAMIZUKA, E.M.; BAQUERIZO MARTINEZ, M. *Campylobacter enteritis* in São Paulo, Brazil. In: RUIZ-PALACIOS, G.M.; CALVA, E., eds. Campylobacter. México: Instituto Nacional de la Nutricion. "Salvador Zubiram", 1991. p.5-8.

PAVAN, M.F.B.; MAMIZUKA, E.M.; MARTINEZ, MB. *Campylobacter* sp termofílico em fezes de crianças com diarreia: estudo com controles. Revista de Microbiologia, v.18, p.243-248, 1987.

PONTUAL, J.P.S.; FALBO, A.R.; GOUVEIA, J.S. Estudo etiológico da diarreia em crianças hospitalizadas no Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira, IMIP, em Recife, Pernambuco. Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil, v.6 supl.1, p.S11-S17, 2006.

REISINGER, E.C.; FRITZSCHE, C.; KRAUSE, R.; KREJS, G.J. Diarrhea caused by primarily non-gastrointestinal infections. Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology, v.2, n.5, p.216-222, 2005.

REMINGTON, J.S.; KLEIN, J.O., eds. Infectious diseases of the fetus newborn infant. 4.ed. Philadelphia: Saunders, 1995. 1373p.

RODRIGUES, J.; THOMAZINI, C.M.; MORELLI, A.; BATISTA, G.C. Reduced etiological role for enteropathogenic *Escherichia coli* in cases of diarrhea in Brazilian infants. Journal of Clinical Microbiology, v.42, p.398-400, 2004.

ROMA, T.C.R.O.; LATORRE, M.R.D.O. Trends in hospital admission and infant mortality from diarrhea: Brazil, 1995-2005. Revista de Saúde Pública, v.44, n.1, p.2010.

SABRÁ, A. ECEP, ECET, ECEA, ECEH, ECEI, ECAD: a *E. coli* revisitada no contexto da diarreia aguda. Jornal de Pediatria, v.78, n.1, p.5-7, 2002.

SACCARDO SARNI, R.O.; SUANO DE SOUZA, FI, CATHERINO, P.; KOCHI, C.; CERAGIOLI OLIVEIRA, F.L.; NÓBREGA, F.J. Treatment of severe malnourished children with WHO protocol: experience of a referral Center in São Paulo, Brazil. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, v.55, n.4, p.336-344, 2005.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Hospital Universitário. SAME: Serviço de arquivo médico e estatística. Disponível em: <http://www.hu.usp.br/>. Acesso em: 12 nov. 2010.

SANSONETTI, P.J. Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*: the yin and yang of innate immunity. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology, v.17, n.2, p.117-119, 2006.

SCALETISKY, I.C.; FABBRICOTTI, S.H.; SILVA, S.O.; MORAIS, M.B.; FAGUNDES-NETO, U. HEp-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, São Paulo, Brazil. Emerging Infectious Diseases, v.8, n.8, p.855-858, 2002.

SCHLENKER, C.; SURAWICZ, C.M. Emerging infections of the gastrointestinal tract. Best Practice & Research, Clinical Gastroenterology, v.23, n.1, p.89-99, 2008.

SCHROEDER, G.N.; HILBI, H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. Clinical Microbiology Reviews, v.21, n.1, p.134-156, 2008.

SDIRI-LOULIZI, K.; GHARBI-KHELIFI, H.; DE ROUGEMONT, A.; HASSINE, M.; CHOUCANE, S.; SAKLY, N.; POTHIER, P.; GUÉDICHE, M.N.; AOUNI, M.; AMBERT-BALAY, K. Molecular epidemiology of human astrovirus and adenovirus serotypes 40/41 strains related to acute diarrhea in Tunisian children. Journal of Medical Virology, v.81, p.1895–1902, 2009.

SHAH, N.; DUPONT, H.L.; RAMSEY, D.J. Global etiology of travelers' diarrhea: systematic review from 1973 to the present. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v.80, n.4, p.609-614, 2009.

SIBA, P.M.; SANDERS, R. Enteric adenovirus in paediatric patients with diarrhoea, Papua New Guinea. Virus Information Exchange Newsletter, v.6, n.3, 1989.

SILVA, C.H.P.M. Bacteriologia: um texto ilustrado. Teresópolis: Eventos, 1999. p. 481-488.

SINGH, I.; VIRDI, J.S. Production of *Yersinia* stable toxin (YST) and distribution of *yst* genes in biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica*. Journal of Medical Microbiology, v.53, p.1065-1068, 2004.

SMALL, P.L.; FALKOW, S. Development of a DNA probe for the virulence plasmid of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. In: LEIVE, L.; BONVENTRE, P.F.; MORELLO, J.A.; SILVER, S.D.; WU, W.C., eds. Microbiology. Washington: American Society for Microbiology, 1986. p.121–124.

SIVAPALASINGAM, S.; NELSON, J.M.; JOYCE, K.; HOEKSTRA, M.; ÂNGULO, F.J.; MINTZ, E.D. High prevalence of antimicrobial resistance among *Shigella* isolates in the United States tested by the National Antimicrobial Resistance Monitoring System from 1999 to 2002. Antimicrobial Agents Chemotherapy, v.50, n.1, p.49-54, 2006.

SOUZA, E.L.C.; MARTINEZ, M.B.; TADDEI, C.R.; MUKAI, L.; GIGLIO, A.E.; RACZ, M.L.; SILVA, L.A.; EINZEMBERG, B.; OKAY, Y. Perfil etiológico das diarreias agudas de crianças atendidas em Pronto Atendimento de Hospital Regional da cidade de São Paulo. Jornal de Pediatria, v.78, n.1, p.31-38, 2002.

SPANO, L.C.; SADOVSKY, A.D.; SEGUI, P.N.; SAICK, K.W.; KITAGAWA, S.M.; PEREIRA, F.E.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETISKY, I.C. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhea. Journal of Medical Microbiology, v.57, p.359–363, 2008.

TADDEI, C.R.; FASANO, A.; FERREIRA, A.J.; TRABULSI, L.R.; MARTINEZ, M.B. Secreted autotransporter toxin produced by a diffusely adhering *Escherichia coli* strain causes intestinal damage in animal model assays. FEMS Microbiology Letters, v.250, p.263–269, 2005.

TAKAHASHI, E.; SULTAN, Z.; SHIMADA, S.; AUNG, W.W.; NYEIN, M.M.; OO, K.N.; NAIR, G.B.; TAKEDA, Y.; OKAMOTO, K. Studies on diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea in Myanmar. Microbiology and Immunology, v.52, n.1, p.2-8, 2008.

TALLEY, N.J.; LOCKE III, G.R.; SAITO, Y.A., eds. GI epidemiology. Oxford: Blackwell, 2007. 270p.

TOLEDO, M.R.; TRABULSI, L.R. Correlation between biochemical and serological characteristics of *Escherichia coli* and results of the Serény test. Journal of Clinical Microbiology, v.17, n.3, p.419-421, 1983.

TOPOROVSKI, M.S.; MIMICA, I.M.; CHIEFFI, P.P.; PASCHOALOTTI, M.A.; DIAS, A.M.G.; SILVA, C.B. Diarréia aguda em crianças menores de 3 anos de idade: recuperação de enteropatógenos nas amostras fecais de pacientes comparada à de grupo controle. Jornal de Pediatria, v.75, n.2, p.97-104, 1999.

TRABULSI, L.R.; KELLER, R.; TARDELLI GOMES, T.A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. Emerging Infectious Diseases, v.8, p.508-513, 2002.

TRABULSI, L.R. Colibacilos enteropatogênicos clássicos. In: _____. Microbiologia das infecções intestinais. Rio de Janeiro: Atheneu, 1981. p.51-57 (Atualização em Microbiologia Clínica, v.1).

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; CAMPOS, L.C.; GOMPERTZ, O.F.; MARTINEZ, M.B.; RÁCZ, M.L. Microbiologia. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760p.

UNICEF. The state of world's children 2009: maternal and newborn health. New York: UNICEF, 2009. 168p. Disponível em: <http://www.unicef.org/sowc09/docs/SOWC09-FullReport-EN.pdf>. Acesso em: 02 jan. 2009.

YOUNG, K.T.; DAVIS, L.M.; DIRITA, V.J. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. Nature Reviews Microbiology, v.5, n.9, p.665-679, 2007.

VICTORA, C.G. Diarrhea mortality: what can the world learn from Brazil? Pelotas: Jornal de Pediatria, v.85, n.1, p.3-5, 2009.

VILCHEZ, S.; REYES, D.; PANIAGUA, M.; BUCARDO, F.; MÖLLBY, R.; WEINTRAUB, A. Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from León, Nicaragua. Journal of Medical Microbiology, v.58, p.630-637, 2009.

VISWANATHAN, V.K.; HODGES, K.; HECHT, G. Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea. Nature Reviews Microbiology, v.7, n.2, p.110-119, 2008.

WALKER, W.A.; HAMILTON, D.; WATKINS, W.S., eds. Pediatric gastrointestinal disease: pathophysiology, diagnosis, management. 2.ed. Philadelphia, Toronto: B.C. Decker, 1991. v.1.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The global burden of disease: 2004 update. Geneva: WHO, 2004. 160p. Disponível em: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf. Acesso em: 09 jun. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The treatment of diarrhoea: a manual for physicians and other senior health workers. Geneva: WHO, 2005. 50p. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241593180.pdf>. Acesso em: 15 set. 2010.

UNICEF. Situação mundial da infância 2008: sobrevivência infantil. Brasília: Fundo das Nações Unidas para a Infância, 2008. 164p. Disponível em: http://www.unicef.org/brazil/pt/sowc2008_br.pdf. Acesso em: 07 ago.2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Waterborn and water-related diseases: role of water treatment and sanitation, syndromes. Geneva: WHO, 2009. 74p. Disponível em: <http://ocw.tufts.edu/data/55/703050.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2010.

ZAMBONI, A.; FABBRICOTTI, S.H.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETISKY, I.C. Enteraggregative *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. Journal of Clinical Microbiology, v.42, p.1058-1063, 2004.

ANEXO 1

QUESTIONÁRIO PARA ESTUDO DE DOENÇA DIARREICA (CASO):

Definição de caso: Crianças até 5 anos, com diarreia (maior ou igual a três evacuações de fezes não formadas ou aquosas/ dia), por até quatorze dias.

A. Informações Demográficas

Código _____ No. _____
Nome _____
Idade(no começo da diarreia)____/____/____
sexo: Masc.____ Fem.____
endereço _____
Código _____

B. Informações Clínicas

Data desta visita: ____/____/____ Data do início da diarreia : ____/____/____

duração da diarreia _____(dias)

C. Informações Epidemiológicas

- O paciente foi hospitalizado (por outra causa desde o nascimento) nos últimos 30 dias que antecederam esta doença diarreica?

Sim () Não () Desconhece ()

Se Sim:

1. Nome do hospital da mais recente internação _____

2. Motivos da internação : a.diarreia ()

b. outros () Qual _____

c. desconhece ()

3. Quantos dias ficou no hospital? _____

4. Quantos dias antes do início da diarreia a criança recebeu alta? _____

5. Qual o leite que a criança estava tomando durante as duas semanas que precederam o início da diarreia? Desconhece Sempre Geralmente Raramente Nunca

Leite de peito: _____

Leite de vaca: _____

Leite de cabra: _____

Leite em pó(int.) _____

Outro(Qual?) _____

6. A criança começou a receber qualquer alimento que ela nunca havia ingerido, nos sete dias anteriores ao início da diarreia? (como: novo leite, fruta, carne, legumes, sucos, etc)

()sim ()não ()desconhece

se sim, nome do(s) alimento(s): _____

7. A criança tomou algum antibiótico nos sete dias antes do início desta diarreia?

()Sim ()Não ()Desconhece

Se sim,

Quantos dias antes da doença iniciou o tratamento? _____

Quantos dias antes da doença interrompeu o tratamento? _____

Completar a seguir, para cada antibiótico usado:

Nome do antibiótico: _____ Por qual Via? Oral, injetável, ambas, desconhece

8. A criança tomou algum antibiótico para essa diarreia?

() Sim () Não () Desconhece

Se sim,

Que data o tratamento iniciou? ____/____/____

Que data o tratamento terminou? ____/____/____

(Se está em uso de antibióticos, usar a data de hoje para o término do tratamento)

9. Nos sete dias que antecederam a diarreia, a criança foi cuidada durante o dia por?

Sim Não desconhece

Na creche

Em outra casa com crianças de outras casas

Outra situação fora de casa

Na sua casa por pelo menos quatro dias

Se a criança esteve na creche, quantas crianças havia em média?

2--4 ____ 5--9 ____ 10--14 ____ 15--19 ____ 20--29 ____ 30--39 ____

40--49 ____ 50--59 ____ 60--99 ____ +100 ____ desconhece ____

10. A criança tomou vacina para Rotavírus? () Sim () Não () Não sabe informar

Se Sim: Data da vacinação _____

11. Qual é a renda total (aproximadamente) mensal? valores em R\$

Menor que um salário mínimo ____

Acima de um salário mínimo ____

Acima de dois salários mínimos ____

Acima de três salários mínimos ____

Acima de quatro salários mínimos ____

Entre cinco e dez salários mínimos? ____

Desconhece ____

12. Para crianças menores de trinta dias no início desta doença diarreica:

Onde a criança nasceu? Hospital ____ casa ____ Outro _____

Se nasceu no Hospital ou procurou hospital no primeiro dia de vida, Qual Hospital _____

Número de dias no hospital _____

Em que tipo de alojamento ficou a criança?

Cuidados especiais _____

Prematuro _____

Normal _____

Outro _____ (especificar)

Desconhece _____

13. Presença de Sinais Clínicos:

Sintomas () Sim () Não () Desconhece

Febre () Sim () Não () Desconhece

Vômito () Sim () Não () Desconhece

Desidratação () Sim () Não () Desconhece

Presença de sangue nas fezes () Sim () Não () Desconhece

14. Informações Laboratoriais :

Data da obtenção da amostra ____/____/____

Tipo de amostra de fezes coletada fezes____ swab____

Foi isolado patógeno de alguma amostra? S____ N____

Se sim, especifique: _____

Quem fez a entrevista? _____

QUESTIONÁRIO PARA ESTUDO DE DOENÇA DIARREICA (CONTROLE)

Definição de controle: Pacientes sem sinais ou sintomas gastrointestinais nos últimos 30 dias, de grupo etário semelhante ao do paciente com doença diarreica aguda, ou, idade na visita clínica colhidos na mesma semana dos casos. Queremos saber se cada exposição (ex. hospitalização, consumo de água ou alimento suspeito) aconteceu durante o período especificado antes do início da doença aguda ou, se não tem doença aguda, a data da visita.

A. Informações Demográficas

Código _____ No. _____
Nome _____
Idade(no começo da diarreia)____/____/____
sexo: Masc.____ Fem.____
endereço _____
Código _____

B. Informações Clínicas

Data desta visita: ____/____/____ Data do início da diarreia : ____/____/____

duração da diarreia _____(dias)

C. Informações Epidemiológicas

- O paciente foi hospitalizado (por outra causa desde o nascimento) nos últimos 30 dias que antecederam esta doença diarreica?

Sim () Não () Desconhece ()

Se Sim:

1. Nome do hospital da mais recente internação _____

2. Motivos da internação : a.diarreia ()

b. outros () Qual _____

c. desconhece ()

3. Quantos dias ficou no hospital? ____

4. Quantos dias antes do início da diarreia a criança recebeu alta? _____

5. Qual o leite que a criança estava tomando durante as duas semanas que precederam o início da diarreia? Desconhece Sempre Geralmente Raramente Nunca

Leite de peito: _____

Leite de vaca: _____

Leite de cabra: _____

Leite em pó(int.) _____

Outro(Qual?) _____

6. A criança começou a receber qualquer alimento que ela nunca havia ingerido, nos sete dias anteriores ao início da diarreia? (como: novo leite, fruta, carne, legumes, sucos, etc)

()sim ()não ()desconhece

se sim, nome do(s) alimento(s): _____

7. A criança tomou algum antibiótico nos sete dias antes do início desta diarreia?

()Sim ()Não ()Desconhece

Se sim,

Quantos dias antes da doença iniciou o tratamento? _____

Quantos dias antes da doença interrompeu o tratamento? _____

Completar a seguir, para cada antibiótico usado:

Nome do antibiótico: _____ Por qual Via? Oral, injetável, ambas, desconhece

8. A criança tomou algum antibiótico para essa diarreia?

() Sim () Não () Desconhece

Se sim,

Que data o tratamento iniciou? ____/____/____

Que data o tratamento terminou? ____/____/____

(Se está em uso de antibióticos, usar a data de hoje para o término do tratamento)

9. Nos sete dias que antecederam a diarreia, a criança foi cuidada durante o dia por?

	Sim	Não	desconhece
Na creche	_____	_____	_____
Em outra casa com crianças de outras casas	_____	_____	_____
Outra situação fora de casa	_____	_____	_____
Na sua casa por pelo menos quatro dias	_____	_____	_____

Se a criança esteve na creche, quantas crianças havia em média?

2--4 _____ 5--9 _____ 10--14 _____ 15--19 _____ 20--29 _____ 30--39 _____
40--49 _____ 50--59 _____ 60--99 _____ +100 _____ desconhece _____

10. A criança tomou vacina para Rotavírus? () Sim () Não () Não sabe informar

Se Sim: Data da vacinação _____

11. Qual é a renda total (aproximadamente) mensal? valores em R\$

Menor que um salário mínimo _____

Acima de um salário mínimo _____

Acima de dois salários mínimos _____

Acima de três salários mínimos _____

Acima de quatro salários mínimos _____

Entre cinco e dez salários mínimos? _____

Desconhece _____

12. Para crianças menores de trinta dias no início desta doença diarreica:

Onde a criança nasceu? Hospital _____ casa _____ Outro _____

Se nasceu no Hospital ou procurou hospital no primeiro dia de vida, Qual Hospital _____

Número de dias no hospital _____

Em que tipo de alojamento ficou a criança?

Cuidados especiais _____

Prematuro _____

Normal _____

Outro _____ (especificar)

Desconhece _____

13. Presença de Sinais Clínicos:

Sintomas () Sim () Não () Desconhece

Febre () Sim () Não () Desconhece

Vômito () Sim () Não () Desconhece

Desidratação () Sim () Não () Desconhece

Presença de sangue nas fezes () Sim () Não () Desconhece

14. Informações Laboratoriais :

Data da obtenção da amostra ____/____/____

Tipo de amostra de fezes coletada fezes____ swab____

Foi isolado patógeno de alguma amostra? S____ N____

Se sim, especifique: _____

Quem fez a entrevista? _____

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado (a) Senhor (a),

Meu nome é Marina Baquerizo Martinez, sou professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, e estou solicitando a sua permissão para que o(a) menor sob sua responsabilidade possa participar do projeto de pesquisa **ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DAS DIARRÉIAS INFECCIOSAS INFANTIS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP)**. Este projeto está sendo desenvolvido por mim e pela equipe da Divisão de Clínica Pediátrica que estão fazendo seu atendimento no Hospital Universitário da USP. Tem como objetivo determinar quais bactérias e vírus além da prevalência deles em casos de diarreia em crianças menores de cinco anos, com sintomas de diarreia, atendidas no pronto atendimento do Hospital Universitário da USP. A caracterização do perfil etiológico da diarreia das crianças é importante para o estabelecimento de políticas locais de vigilância, tratamento e profilaxia da doença diarreica.

Para que o(a) menor sob sua responsabilidade possa participar desta pesquisa precisarei do seu consentimento e de amostras de fezes do(a) menor, que serão coletadas pelos médicos assistentes deste Hospital. Não haverá risco à saúde do(a) menor. Além dele (a), outras crianças também participarão do estudo. Precisarei, ainda, que você responda algumas perguntas sobre doenças existentes nas pessoas da família, hábitos alimentares e uso de medicamentos pelo(a) menor. Caso o médico solicite exames de sangue, para melhor avaliação clínica, peço autorização para guardar uma amostra de soro para posterior avaliação da resposta imunológica contra rotavírus e outros enteropatógenos.

Os resultados dos exames de laboratório ficarão disponíveis no prontuário da criança para quaisquer dúvidas. Suas informações serão mantidas em sigilo e somente serão disponibilizadas com seu consentimento. **Caso você não concorde em participar da pesquisa, não haverá nenhum prejuízo de seu atendimento no Hospital Universitário.**

Caso você tenha alguma dúvida em relação à pesquisa, pode entrar em contato comigo mbmartin@usp.br (telefone: (11) 3091-9303), ou com o Comitê de Ética do HU/USP cep@hu.usp.br. (3091-9457) Av. Prof. Lineu Prestes 2565, Cidade Universitária, São Paulo-SP

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado consinto em participar da presente Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de 200

Assinatura do responsável

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será fornecida a você pelo médico do estudo.

ANEXO 3

São Paulo, 18 de abril de 2008.

Il^{mo(a)}. S^{ra(a)}.

Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez
Serviço de Laboratório Clínico
Hospital Universitário
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** “*Estudo epidemiológico das diarreias infecciosas infantis no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo*” - **Co-autor(es):** *Francisco Milton P. Ventura, Alfredo Elias Gilio, Heloisa Sousa* – **CEP-HU/USP:** 790/07 – **SISNEP CAAE:** 0001.0.198.018-08.

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 18 de abril de 2008, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, item VII.13.d.

O primeiro relatório está previsto para 18 de abril de 2009.

Atenciosamente,

Dr. Maurício Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 6343974/1 - Francisco Milton Pinto Ventura

Email: milventura@usp.br
Data de Nascimento: 07/03/1974
Cédula de Identidade: RG - 90015017015 - CE
Local de Nascimento: Estado do Ceará
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Universidade Federal do Ceará - Ceará - Brasil - 2000

Curso: Mestrado
Programa: Farmácia (Análises Clínicas)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 13/02/2008
Início da Contagem de Prazo: 13/02/2008
Data Limite: 11/12/2010
Orientador: Prof(a). Dr(a). Marina Baquerizo Martinez - 13/02/2008 até o presente.
E.Mail: mbmartin@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 13/02/2008
Prorrogação: 120 dias
Período de 13/08/2010 a 11/12/2010
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 27/10/2009

Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 13/02/2008
Prorrogação em 07/06/2010
Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2010

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2010

Impresso em: 06/12/10 21:16:09

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 6343974/1 - Francisco Milton Pinto Ventura

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMM5793-2/2	Regulação da Expressão Gênica em Bactérias	05/03/2008	18/04/2008	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5793-8/2	Seminários em Análises Clínicas	11/03/2008	23/06/2008	30	2	93	A	N	Concluída
BMM5747-5/5	Bioquímica Bacteriana	25/04/2008	27/06/2008	90	6	90	B	N	Concluída
FBC5757-1/3	Seminários em Análises Clínicas II	11/08/2008	24/11/2008	30	2	85	A	N	Concluída
BMM5811-4/3	Toxinas de Escherichia coli	18/08/2008	27/10/2008	30	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBC5701-4/2	Fatores de Virulência no Diagnóstico das Infecções Bacterianas	01/09/2008	05/10/2008	75	5	100	A	N	Concluída
FBC5719-2/1	Trato Gastrointestinal: Imunomodulação da Colonização e Infecção Bacteriana	09/03/2009	21/06/2009	90	6	95	A	N	Concluída
HEP5705-9/7	Epidemiologia I (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	02/04/2009	14/05/2009	60	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBA5728-2/10	Aprimoramento Didático	21/09/2009	18/10/2009	60	4	87	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	25	25	29
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			

Total:	25	25	29
---------------	----	----	----

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2010

Impresso em: 06/12/10 21:16:09