



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA DOENÇA
DIARRÉICA AGUDA NO MUNICÍPIO DE JURUTI, PARÁ**

EVELINE BEZERRA SOUSA

Belém – Pará

2010

EVELINE BEZERRA SOUSA

**ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA DOENÇA
DIARRÉICA AGUDA NO MUNICÍPIO DE JURUTI, PARÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof.Dr. Edvaldo Carlos Brito Loureiro

Belém – Pará

2010

EVELINE BEZERRA SOUSA

**ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA DOENÇA
DIARRÉICA AGUDA NO MUNICÍPIO DE JURUTI, PARÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo Carlos Brito Loureiro
Instituto Evandro Chagas / SVS / MS

Banca Examinadora: Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Profa. Dra. Karla Tereza Silva Ribeiro
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Dra. Lena Lillian Canto de Sá
Instituto Evandro Chagas / SVS / MS

Profa. Dra. Antonia Benedita Rodrigues Vieira (Suplente)
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Belém, 20 de dezembro de 2010

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar ao meu lado, iluminando o meu caminho e guiando os meus passos. E obrigada por sempre me dar força de vontade, coragem, paciência e sabedoria para superar os momentos mais difíceis.

Aos meus pais, por todo amor, dedicação, educação de qualidade, apoio infinito e por terem me ensinado que os obstáculos servem como degraus para subida e para a realização dos objetivos. A vocês, toda a minha admiração, respeito e muito obrigada.

À minha irmã Tiene, pela imensa amizade, pelo carinho e cuidado.

Ao meu irmão Dyhone pelo apoio.

Ao Hudson (ex-namorado) pelo companherismo, atenção e apoio nos momentos difíceis em grande parte dessa jornada.

Ao Dr. Edvaldo Loureiro, pela orientação, colaboração e oportunidade de desenvolver o meu trabalho da melhor maneira possível.

À MSc Cintya Souza, pela grande amizade, pelo carinho, pela confiança e oportunidade de entrar no Projeto Juruti, do Instituto Evandro Chagas, o qual foi de suma importância para o desenvolvimento dessa dissertação.

À Dra. Daniela e Karla Lima e à MSc Flávia, do Instituto Evandro Chagas pelo apoio, colaboração com ensinamentos e experiência profissional.

Às amigas Ismari, Tatiana, Nathalia e Márcia pelo apoio e amizade.

Aos técnicos do Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas da SABMI/IEC/MS, pelo apoio e ajuda, durante as viagens de coleta.

Aos estagiários do Laboratório de Biologia Molecular/SABMI/IEC/MS, pela atenção e ajuda em algumas situações de aperreio.

Aos professores Max Reis e Manuel Ayres que me ensinaram a beleza e a grandeza da pesquisa e que não são os obstáculos e nem os outros que nos fazem parar, mas somente Deus e a nós mesmos.

Aos demais professores, que tive a oportunidade de conhecer durante as disciplinas e que colaboram com a minha aquisição de novos conhecimentos.

Ao Instituto Evandro Chagas pelo suporte estrutural, que permitiu a execução deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, pela oportunidade de crescimento profissional.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo suporte financeiro que possibilitou que eu realizasse o meu mestrado com qualidade.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E QUADROS	7
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A DIARRÉIA AGUDA.....	12
1.1.1 Aspectos Epidemiológicos da Diarréia	14
1.2 ETIOLOGIA DA DIARRÉIA AGUDA.....	19
1.2.1 <i>Rotavírus</i>	19
1.2.2 Agentes Parasitários	20
1.2.3 Agentes Bacterianos	23
1.2.3.1 <i>Escherichia coli</i> Diarreiogênicas.....	23
1.2.3.1.1 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica clássica – EPEC.....	24
1.2.3.1.2 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica – ETEC.....	25
1.2.3.1.3 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasora – EIEC.....	27
1.2.3.1.4 <i>Escherichia coli</i> produtora da toxina de Shiga – STEC.....	27
1.2.3.1.5 <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa – EAEC.....	29
1.2.3.2 Gênero <i>Shigella</i>	31
1.2.3.3 Gênero <i>Salmonella</i>	33
1.2.3.4 Espécie <i>Vibrio cholerae</i>	37
1.2.3.5 Gênero <i>Campylobacter</i>	40
1.2.3.6 Gênero <i>Aeromonas</i>	42
1.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	43
1.3.1 Diagnóstico Viral	43
1.3.2 Diagnóstico Parasitológico	44
1.3.3 Diagnóstico Bacteriológico	44
1.3.4 Emprego da Técnica da PCR Multiplex para a identificação das Categorias Diarreiogênicas de <i>Escherichia coli</i>	45
1.4 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA DIARRÉIA EM JURUTI.....	47
1.5 PREVENÇÃO E CONTROLE.....	49
1.6 OBJETIVOS.....	51

1.6.1	Objetivo Geral.....	51
1.6.2	Objetivos Específicos.....	51
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	52
2.1	ASPECTOS GEOGRÁFICOS DO MUNICÍPIO DE JURUTI.....	52
2.2	AMOSTRAGEM.....	53
2.2.1	Amostras Clínicas.....	53
2.2.2	Etapas do Trabalho no Campo.....	54
2.2.3	Coleta e Transporte das Amostras.....	55
2.3	PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS.....	55
2.3.1	Pesquisa Parasitológica.....	55
2.3.2	Pesquisa Bacteriológica.....	56
2.3.2.1	Métodos Convencionais.....	56
2.3.3	Método Imunoenzimático para a Pesquisa de <i>Campylobacter jejuni/coli</i>	59
2.3.4	Método Imunoenzimático para a Pesquisa de <i>Rotavírus</i>	59
2.3.5	Pesquisa Molecular de <i>Escherichia coli</i> Diarreio gênicas.....	59
2.3.5.1	Extração de DNA bacteriano.....	60
2.3.6	Sequências Iniciadoras Utilizadas nos Ensaios da PCR Multiplex.....	61
2.3.7	Padronização da PCR Multiplex.....	62
2.3.8	Deteção das Sequências Alvos Amplificadas.....	64
2.3.9	Aspectos Éticos.....	64
2.3.10	Análise Estatística.....	65
3	RESULTADOS.....	66
3.1	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA DOENÇA DIARRÉICA NO MUNICÍPIO DE JURUTI, ESTADO DO PARÁ.....	66
3.1.1	Identificação de Enteropatógenos Bacterianos, Parasitários e de <i>Rotavírus</i> dos Casos Positivos de Diarréia Aguda e do Grupo Controle.....	70
3.1.2	PCR Multiplex para a Identificação das Categorias de <i>Escherichia coli</i> diarreio gênicas.....	77
3.1.2.1	Ensaio da PCR Multiplex.....	77
4	DISCUSSÃO.....	82

5	CONCLUSÓES.....	99
	REFERÊNCIAS.....	101
	ANEXOS	

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1-	Mortalidade proporcional por doença diarréica aguda em menores de 5 anos de idade, Brasil e grandes regiões nos anos de 1990, 1995, 2000 e 2004.....	17
Tabela 2-	Distribuição dos participantes do estudo, de acordo com a faixa etária e o sexo, Juruti, Pará. Fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009.....	66
Tabela 3-	Distribuição dos clientes do estudo, de acordo com a renda familiar mensal e o número de co-habitantes, no município de Juruti, Pará. Fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009.....	67
Tabela 4-	Frequência de enteropatógenos bacterianos, parasitários e de <i>Rotavírus</i> segundo o grupo diarréico e controle, Juruti, Pará. Fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009.....	72
Tabela 5-	Distribuição de enteropatógenos bacterianos, parasitários e de <i>Rotavírus</i> por faixa etária, Juruti, Pará. Fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009.....	73
Tabela 6-	Frequência geral de bactérias enteropatogênicas, como agentes únicos de infecção ou em infecções de etiologia mista dos 261 indivíduos incluídos no estudo, segundo o grupo diarréico e controle, Juruti, Pará. Fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009.....	75
Tabela 7-	Distribuição das categorias de <i>Escherichia coli</i> diarreiogênicas isoladas dos indivíduos do grupo diarréico e controle, Juruti, Pará. Fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009.....	79
Tabela 8-	Distribuição das categorias patogênicas de <i>Escherichia coli</i> , Juruti, Pará. Fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009.....	80
Quadro 1-	Cepas de referência de <i>Escherichia coli</i> para PCR.....	60
Quadro 2-	Classificação molecular das categorias patogênicas de <i>Escherichia coli</i>	60

Quadro 3-	Oligonucleotídeos utilizados na PCR multiplex e seus respectivos produtos de amplificação.....	62
Quadro 4-	Componentes do ensaio da PCR multiplex.....	63
Quadro 5-	Condições cíclicas utilizadas nos ensaios da PCR multiplex.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Distribuição proporcional das causas específicas de mortes, entre crianças menores de 5 anos de idade, no ano de 2004.	12
Figura 2-	Distribuição da mortalidade por doenças diarreicas, nos países em desenvolvimento, em 5 regiões abrangidas pela OMS.	15
Figura 3-	Mapa ilustrando a mortalidade proporcional de menores de 5 anos, por doenças diarreicas no ano de 2002 (em %), nas regiões brasileiras.	16
Figura 4-	Taxa de mortalidade da DDA no Brasil e Regiões, 2000 a 2007.	18
Figura 5-	Casos de diarreia notificados em 2006 no município de Juruti, distribuídos por unidade de atuação do PACS/PSF.	48
Figura 6-	Localização do município de Juruti, Estado do Pará.	52
Figura 7-	Fluxograma de isolamento e identificação de enteropatógenos bacterianos a partir de amostras de fezes.	58
Figura 8-	Distribuição das amostras positivas, segundo o mês de ocorrência, Juruti, Pará. Fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009.	68
Figura 9-	Distribuição sazonal das amostras positivas por faixa etária, Juruti, Pará. Fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009.	69
Figura 10-	Frequência dos casos de diarreia aguda de acordo com o sexo e a faixa etária, Juruti, Pará. Fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009.	70
Figura 11-	Proporção das amostras positivas, município de Juruti, Pará. Fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009.	71
Figura 12-	Ensaio da PCR multiplex, 1 – Ladder 1Kb, 2- controle positivo (mix das 5 categorias padrões de <i>E. coli</i> diarreiogênicas). Amostras clínicas: 3 e 4 – ETEC (<i>elt</i> , <i>est</i>), 5 e 6 – ETEC (<i>est</i>), 7 – ETEC (<i>elt</i>), 8 EPEC (<i>eae</i>) e 9 controle negativo (<i>E.coli</i> K12 DH5 α).	77

RESUMO

O presente estudo descreveu os aspectos epidemiológicos e etiológicos da diarreia aguda no município de Juruti, Pará, Brasil. Foram avaliadas 261 amostras de fezes (170 diarreicas e 91 controles) de pacientes atendidos em Unidades de Saúde Pública, no período de fevereiro a julho de 2009. Para o isolamento de bactérias enteropatogênicas, utilizou-se meios seletivos indicadores e de enriquecimento. A caracterização bioquímica foi realizada utilizando os Sistemas API-20E e a sorologia, através de antisoros polivalentes e monovalentes. Para a detecção das categorias de *E. coli* diarreio gênicas foram executados dois ensaios de PCR multiplex. A pesquisa de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* e *Rotavírus* foi executada através da técnica de ELISA, nas amostras de fezes. No exame parasitológico foram utilizados os métodos diretos (salina/Lugol) e sedimentação espontânea. Das 154 amostras positivas (118 diarreicas e 36 controles), 75,4% eram de infecções únicas e 24,6% de infecções mistas. A maioria dos casos incluiu crianças menores de 10 anos de idade (55,9%), sem diferença significativa entre os sexos feminino e masculino. Os enteropatógenos mais frequentes no grupo diarreico foram *E. histolytica/E. dispar* (26%), *Shigella* spp (15,7%), *G. lamblia* (13,3%) e *E. coli* diarreio gênicas (12,8%), com *Shigella* spp associada à diarreia aguda ($p = 0,0028$). Quanto às categorias patogênicas de *E. coli*, a ETEC (7,2%) foi o tipo mais frequente nos casos de diarreia aguda, seguido de EAEC (5,9%). Os agentes menos frequentes nos casos diarreicos foram representados por *C. jejuni/C. coli* (4,7%), *Rotavírus* (2,8%), *Salmonella* Panama, *A. hydrophila* e *A. sóbria* (0,5%). Os resultados encontrados fornecem subsídios importantes para a vigilância epidemiológica e ambiental da doença diarreica aguda, no município de Juruti.

Palavras chave: Diarreia aguda; Enteropatógenos; Juruti, Pará.

ABSTRACT

The present study described the epidemiological and etiological aspects of acute diarrhea in Juruti, Pará, Brazil. A total of 261 fecal samples were investigated (diarrheogenic, n = 170 and control, n = 91), from patients attended in Public Health Units in the period from February to July 2009. Samples were investigated for bacterial, *Rotavirus* and parasitic enteropathogens using microscopic examination, immunological tests (ELISA) and bacterial culture techniques. Two multiplex PCR were designed for the detection of all categories of diarrheogenic *Escherichia coli*. A total of 154 samples were positive (diarrheogenic, n = 118 and control, n = 36), in which 75,4% were represented for mono infections and 24,6% for mixed infections. Most of cases included children less than 10 years of age (55,9%), which no significant difference were found between female and male. The most common enteropathogens in diarrhoeal samples were *E. histolytica/E. dispar* (26%), *Shigella* spp (15,7%), *Giardia lamblia* (13,3%) and diarrheogenic *E. coli* (12,8%), from which *Shigella* spp ($p = 0,0028$) were shown to be associated to the cases of acute diarrhea. The most frequent categories of *E. coli* in diarrhoeal cases were ETEC (7,2%) and EAEC (5,9%). The less frequent enteropathogens, in diarrhoeal samples were *Campylobacter jejuni/coli* (4,7%), *Rotavirus* (2,8%), *Salmonella* Panama, *A. hydrophila* and *A. sóbria* (0,5%). These results are useful for environmental and epidemiological surveillance of acute diarrhea disease in Juruti.

Key words: Acute diarrhea; Enteropathogens; Juruti, Pará.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A DIARRÉIA AGUDA

A diarreia aguda ainda é uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade infantil, em especial nos lactentes e pré-escolares e ainda permanece como a segunda causa principal de morte, entre crianças menores de 5 anos de idade, sendo responsável pelo maior número de óbitos em crianças do que a AIDS, malária e sarampo juntas (Figura 1) (Motta & Silva, 2002; Rodrigues *et al.*, 2002; Kosek *et al.*, 2003; Tinuade *et al.*, 2006; Melo *et al.*, 2007; Loulizi *et al.*, 2008; OMS, 2009).

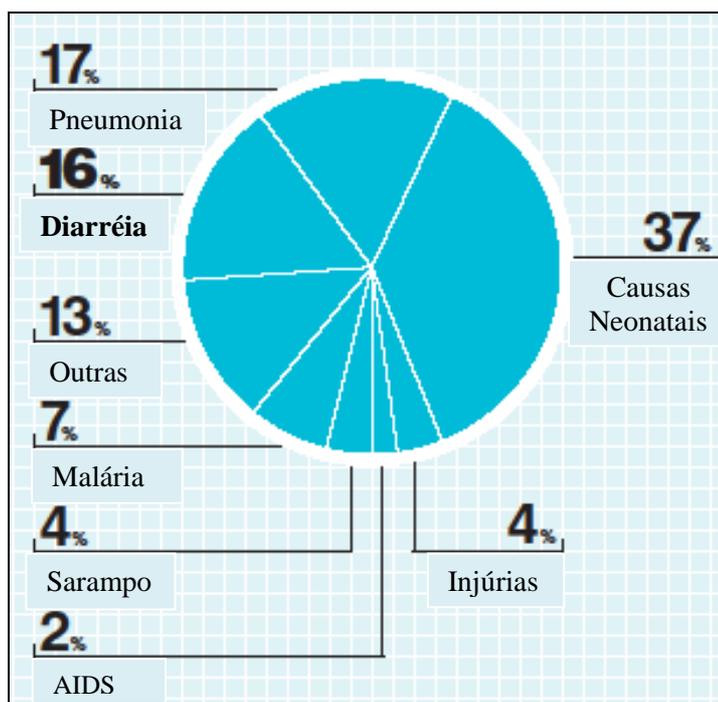


Figura 1 – Distribuição proporcional das causas específicas de mortes, entre crianças menores de 5 anos de idade, no ano de 2004 (Fonte: OMS, 2009).

É estimado a ocorrência de 2,5 bilhões de episódios de diarreia e cerca de 2 milhões de mortes anualmente, em crianças menores de 5 anos, a maioria residindo nos países em desenvolvimento e tendo como fatores predisponentes o abandono

precoce do aleitamento materno, baixo nível educacional e más condições higiênico-sanitárias, em decorrência da inexistência ou precariedade dos serviços de saneamento (Andrade *et al.*, 1999; OMS, 2002; Podewils, *et al.*, 2004; Hien *et al.*, 2007; Paniagua *et al.*, 2007; Ochoa *et al.*, 2008; Fontaine *et al.*, 2009). Associada a estes fatores, corrobora para o problema, o crescimento populacional que na maioria das vezes, não é acompanhado da melhoria das condições de vida da população.

A doença diarréica aguda (DDA), também conhecida como diarréia, disenteria e gastroenterite é de curso auto-limitado, com duração máxima de 14 dias. É caracterizada pela perda excessiva de água e eletrólitos pelas fezes e/ou vômitos, que se manifesta clinicamente com aumento do número de evacuações e/ou diminuição da consistência das fezes sendo que, a maioria dos episódios diarréicos dura de algumas horas a cinco dias (Gomes *et al.*, 2005; Cesario & Neto, 2006; BRASIL, 2009a).

As complicações ocorrem devido à desidratação e ao desequilíbrio hidroeletrólítico, sendo este relacionado, com frequência, à assistência e tratamento instituídos de forma inadequada, podendo, inclusive, levar à letalidade. Os episódios diarréicos repetidos podem ocasionar desnutrição crônica, com retardo do desenvolvimento ponderal e, até mesmo, da evolução intelectual (Façanha & Pinheiro, 2005). Apesar dos importantes avanços alcançados na prevenção e controle das doenças infecciosas, as doenças diarréicas agudas, ainda continuam como um dos principais problemas de saúde pública e um grande desafio às autoridades sanitárias em todo o mundo (BRASIL, 2006b).

A transmissão ocorre, de forma indireta, através da água e alimentos contaminados com fezes, vômitos e/ou urina de paciente ou portador e contatos com

objetos contaminados e pela propagação de pessoa a pessoa e de animais para pessoas, por contato direto (BRASIL, 2009a).

1.1.1 Aspectos Epidemiológicos da Diarréia

As doenças diarreicas são responsáveis por 18% da mortalidade infantil no mundo (Fontaine *et al.*, 2009). Estimativas globais apontaram um declínio de aproximadamente, 5 milhões de mortes por diarréia desde os anos 1980, para uma estimativa corrente de 1,6 a 2,1 milhões, mas não na incidência da doença (Petri Jr. *et al.*, 2008; Oliveira & Latorre, 2010). Aproximadamente, 12 milhões de crianças residentes nos países em desenvolvimento morrem antes de completar os 5 anos de idade, e 70% dessas mortes são devidos aos problemas de saúde que acomete esta faixa de idade, incluindo a doença diarreica aguda (Nguyen *et al.*, 2006; Petri Jr. *et al.*, 2008).

Estimativas globais têm mostrado reduções consideráveis das taxas de mortalidade infantil e pré-escolar nos últimos 25 anos, porém as doenças diarreicas ainda persistem como um marcante problema de saúde populacional, representando em muitos países, a principal causa de morte entre crianças de um a quatro anos (Oliveira & Latorre, 2010). Em 2004, aproximadamente, 1,87 milhões de mortes por diarréia acometeram menores de 5 anos em todo o mundo, correspondendo a 19%, das 10 milhões de ocorrências diarreicas neste grupo populacional. A África e a Ásia ainda são os países que mais sofrem com a mortalidade infantil causada pela doença diarreica. Foi registrado em 2004, um total de 1,46 milhões de mortes (78%), por conta da diarréia aguda nesses países (Pinto *et al.*, 2008) (Figura 2).

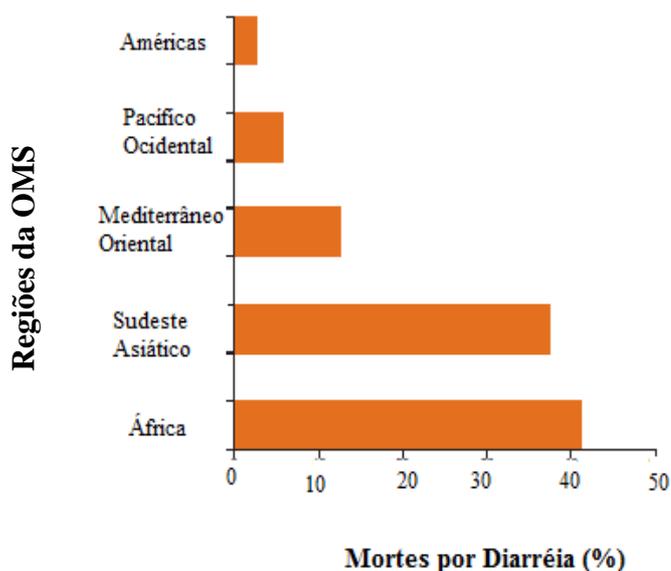


Figura 2 – Distribuição da mortalidade por doenças diarréicas, nos países em desenvolvimento, em 5 regiões escolhidas pela OMS (Fonte: Adaptado de Pinto *et al.*, 2008).

Vários estudos têm demonstrado a tendência da diminuição das taxas de mortalidade infantil (Menezes *et al.*, 1996; Guimarães *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2003). No Brasil, a queda de mortalidade por diarreia aconteceu na segunda metade do século XX. Políticas de saneamento básico implantadas no País, a partir de 1970 tiveram grande impacto na queda da mortalidade infantil, principalmente pela queda da mortalidade por doenças infecciosas intestinais (Oliveira & Latorre, 2010).

Outras medidas, como a introdução da terapia de reidratação oral, diminuição da desnutrição infantil e melhorias no acesso aos serviços de saúde, podem ser apontadas, como as principais responsáveis pelo declínio da mortalidade por diarreia no território brasileiro (Oliveira & Latorre, 2010). Em 1990 a proporção de óbitos por diarreia em relação ao total de óbitos com causas definidas era de 10,8%, em 2002, caiu para 4,4% (Figura 3).

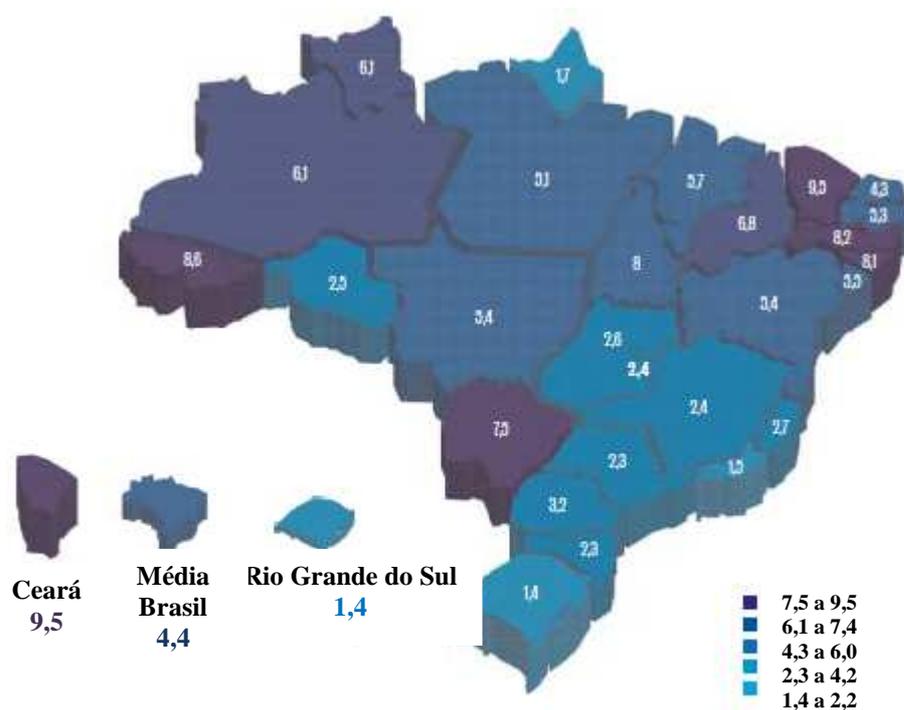


Figura 3 – Mapa ilustrando a mortalidade proporcional de menores de 5 anos, por doenças diarreicas no ano de 2002 (em %), nas regiões brasileiras (Fonte: Adaptado de <http://www.ipea.gov.br/Destaques/livroradar/05.saude.pdf>).

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 permanecem em patamares elevados (RIPSA, 2008) (Tabela 1).

Tabela 1 – Mortalidade proporcional por doença diarréica aguda em menores de 5 anos de idade, Brasil e grandes regiões nos anos de 1990, 1995, 2000 e 2004.

Regiões	1990	1995	2000	2004
Brasil	10,8	8,3	4,5	4,0
Norte	19,0	9,2	5,0	4,9
Nordeste	12,6	13,0	6,7	6,2
Sudeste	8,2	5,4	2,6	1,9
Sul	9,5	5,8	3,2	2,1
Centro-Oeste	9,7	6,8	4,5	3,9

(Fonte: Adaptado do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM)/SVS - Ministério da Saúde, 2008).

De acordo com os dados informados no DATASUS, o Brasil apresentou altas taxas de internações e óbitos por diarréia em menores de cinco anos, correspondendo a uma média de 119.489,75 internações e 378.25 óbitos durante o período de 2000 a 2003 (Dias, 2007).

Em torno de 1.800.000 vidas poderiam ser salvas (mais de 90,0%), uma vez que a diarréia pode ser prevenida ou tratada (Façanha & Pinheiro, 2005). Estudos longitudinais encontraram uma média de 4 a 6 episódios diarréicos por criança a cada ano em áreas urbanas pobres do Nordeste brasileiro, correspondendo de 20 a 40 dias com diarréia por ano, dentre crianças de 3 a 24 meses (Orlandi *et al.*, 2006). Um estudo longitudinal executado de 1990 a 1992 na cidade de Belém, na região leste da Amazônia, encontrou uma média de 5,9 episódios diarréicos por criança/ano (Linhares, 1997).

De acordo com dados da Monitorização das Doenças Diarréicas Agudas (MDDA), no período de 2000 a 2007, foram notificados 17.763.546 casos de DDA no Brasil. Segundo dados do Sistema de Informação de Mortalidade (SIM), neste mesmo

período, o Brasil teve 39.757 óbitos por diarreia e gastroenterite de origem infecciosa presumível. A taxa de mortalidade, variou de 0,34 a 0,75 em menores de 1 ano, de 0,06 a 0,12 na faixa etária de 1 a 4 anos, de 0,01 a 0,06 na faixa etária de 5 a 9 anos e de 0,87 a 1,07 em maiores de 10 anos. Na região Norte, a taxa de mortalidade por DDA, nos anos de 2000 a 2007, variou de 0,24 a 0,43, na região Nordeste de 0,47 a 0,63, na região Sudeste variou de 0,57 a 0,88, na região Sul de 0,34 a 0,54 e na região Centro-Oeste de 0,28 a 0,92 (BRASIL, 2010). A figura 4 apresenta a taxa de mortalidade da DDA, por 100.000 habitantes e por regiões brasileiras, durante o período de 2000 a 2007.

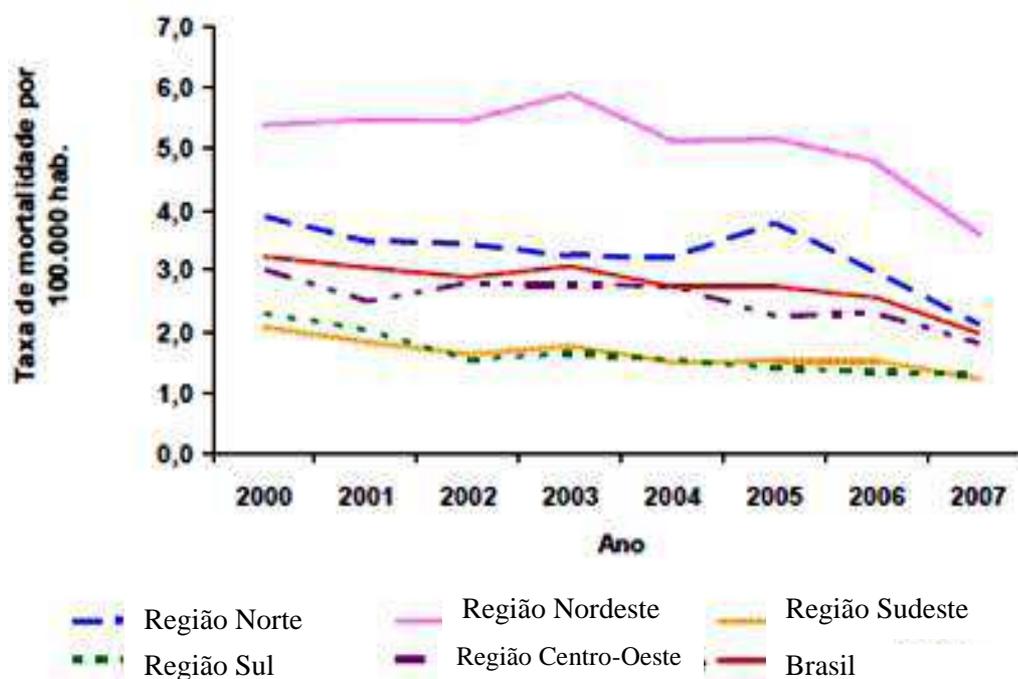


Figura 4 – Taxa de mortalidade da DDA no Brasil e Regiões, 2000 a 2007 (Fonte: Adaptado do DATASUS/SVS - Ministério da Saúde, 2010).

A diarreia aguda é classificada como infecciosa (85% dos casos) ou não infecciosa (15% dos casos). As infecciosas são causadas por agentes virais, bacterianos e parasitários. Os agentes infecciosos podem, ainda, ser caracterizados como aqueles

que causam diarreia inflamatória ao invadir a mucosa colônica e/ou os que causam diarreia secretória, pela produção de citotoxinas (Nguyen *et al.*, 2005; BRASIL, 2008a).

1.2 ETIOLOGIA DA DIARRÉIA AGUDA

Dentre as causas infecciosas da diarreia aguda, destacam-se: os *Rotavírus*, *Shigella* spp, *Escherichia coli* diarreio gênicas, *Campylobacter jejuni/C. coli*, *Salmonella* spp, *Vibrio cholerae*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e o *Cryptosporidium* spp (Polis *et al.*, 1986; Gomes *et al.*, 1991; Levine *et al.*, 1993; Fagundes *et al.*, 1995; Toporovski *et al.*, 1999; Linhares, 2000; El-Sheikh & El-Assouli, 2001; Newman *et al.*, 2001; Podewils *et al.*, 2004; Nataro *et al.*, 2006; Tinuade *et al.*, 2006; Wongstitwilairoong *et al.*, 2007; Jafari *et al.*, 2008).

1.2.1 *Rotavírus*

O gênero *Rotavírus* faz parte da família *Reoviridae* e é classificado em sorogrupos e sorotipos. Entre os sete sorogrupos (A, B, C, D, E, F e G) identificados até o momento, o grupo A tem a maior frequência no homem e possui grande importância epidemiológica por causar diarreia severa em crianças abaixo de dois anos, e estar relacionado a surtos em creches, escolas e hospitais (Costa *et al.*, 2004; BRASIL, 2006b; Gràrcia, 2008).

As infecções por *Rotavírus* representam a causa mais comum de diarreia aguda grave na infância, tanto nos países em desenvolvimento, quanto nos desenvolvidos (Bishop *et al.*, 1973; Schnack *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2004; Olesen *et al.*, 2005; Cauás *et al.*, 2006). Globalmente, este vírus é responsável por 139 milhões de episódios de gastroenterites, 24 milhões de visitas aos serviços de emergência, 2,4

milhões de admissões em hospitais e cerca de 527.000 óbitos a cada ano, em crianças menores de 5 anos de idade e com mais de 80% dessas mortes, ocorrendo nos países mais pobres do mundo, como o Sul da Ásia e a África Subsariana (CDC, 2008; Dennehy, 2008; Gràcia, 2008; Nokes *et al.*, 2008; CDC, 2009; Palma *et al.*, 2010).

Estudos recentes indicaram que as infecções causadas por *Rotavírus*, são responsáveis por aproximadamente 39% das hospitalizações por diarreias na infância em todo o mundo, e por 5 a 10% de todos os episódios de gastroenterites, entre crianças menores de 5 anos de idade, nos Estados Unidos (Dennehy, 2008).

As primeiras investigações, sobre gastroenterites por *Rotavírus* na América Latina remontam a meados da década de 1970, poucos anos após a descoberta deste enteropatógeno por Bishop *et al.* (1973). No Brasil, a primeira descrição ocorreu em 1976, na cidade de Belém-Pará, quando Linhares *et al.* (1977), detectaram as primeiras partículas de transmissão através da microscopia eletrônica.

Nas infecções por *Rotavírus*, observa-se um espectro que abrange as formas assintomáticas, subclínicas e o quadro clássico, este último, em geral caracterizado pelo início abrupto com vômitos e febre alta, sobrevivendo à diarreia aquosa profusa, não sanguinolenta e com cólicas abdominais. Esses sintomas, dependendo da intensidade, culminam com a desidratação do tipo isotônica, considerada como o principal determinante de óbito por esses agentes, entre crianças no seu primeiro ano de vida (Oliveira & Linhares, 1999).

1.2.2 Agentes Parasitários

Na maioria dos casos, independentemente da região geográfica, a diarreia tem como agentes etiológicos os vírus e as bactérias. No entanto, algumas vezes, os

parasitas intestinais principalmente os protozoários, também podem causar o processo diarréico, nas áreas onde as enteroparasitoses são endêmicas. *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium* spp são as espécies de protozoários intestinais geralmente associadas com a doença diarréica (Mangini *et al.*, 1992; Toporovski *et al.*, 1999; Bernal *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2002; Schnack *et al.*, 2003; Haque *et al.*, 2009). A virulência varia de elevada, como ocorre com o *Cryptosporidium* spp, associado a grandes números de infecções sintomáticas e a leve e intermediária, causada pela *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica* (Motta & Silva, 2002).

No Brasil, as parasitoses intestinais apresentam frequências elevadas nas diversas regiões do país, acometendo indivíduos de todas as faixas etárias e níveis sociais (Motta & Silva, 2002).

Dentre os protozoários, o *Cryptosporidium* spp tem sido associado a quadros diarréicos, especialmente nos primeiros anos de vida (Mangini *et al.*, 1992; Pereira *et al.*, 2002). Ocorre em todos os continentes, nos países desenvolvidos, a prevalência estimada é de 1% a 4,5%, nos países em desenvolvimento, pode atingir até 30%. Os grupos mais atingidos são os menores de 2 anos, pessoas que interagem com animais, viajantes e pessoas que entram em contatos íntimos com infectados. Há relatos de epidemias, a partir de água potável contaminada, banhos de piscina ou lagoas contaminadas (Haque, 2007; BRASIL, 2008a). Em Criciúma (Santa Catarina), o emprego de testes imunoenzimáticos apontou o *Cryptosporidium* spp, como o agente etiológico mais prevalente em menores de 5 anos de idade (Schnack *et al.*, 2003).

A criptosporidíase é responsável por diarréia esporádica em todas as idades, diarréia aguda em crianças e diarréia dos viajantes. Em indivíduos imunocompetentes, o quadro diarréico por *Cryptosporidium* spp apresenta duração

média de 10 dias. Nos imunodeprimidos, particularmente, os infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana, ocasiona enterite grave, caracterizada por diarreia aquosa, acompanhada de dor abdominal, mal-estar, anorexia, náuseas, vômitos e febre. (BRASIL, 2008a).

A *Entamoeba histolytica* é um dos principais agentes responsáveis pela mortalidade por doenças parasitárias em todo o mundo, apresentando um grande impacto nas pessoas residentes nos países mais pobres do mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que existe aproximadamente, 50 milhões de pessoas no mundo sofrendo de infecção por *E. histolytica* a cada ano, resultando de 40-100 mil mortes anualmente (Haque, 2007).

No México e na Índia, a *E. histolytica* mostrou associação significativa com a diarreia (Bernal *et al.*, 2000). Entretanto, no Brasil este agente, não tem mostrado forte associação com a doença diarreica (Okasaki *et al.*, 1988; Toporovski *et al.*, 1999). Alta prevalência de *E. histolytica* (56,4%) foi detectada por método imunoenzimático em menores de 5 anos com diarreia, porém, geralmente associada a outro patógeno (Schnack *et al.*, 2003).

A maioria das infecções causadas pela *E. histolytica* é assintomática e ocorre tanto em adultos, quanto nas crianças. A infecção sintomática pode apresentar-se de forma aguda com diarreia, acompanhada de dor abdominal (enterite aguda) ou de natureza crônica, caracterizada por fezes amolecidas, com aspecto gorduroso, fadiga, anorexia, flatulência e distensão abdominal (BRASIL, 2008a).

A *Giardia lamblia*, parece ter a menor importância na patogênese da diarreia na infância, apresentando uma baixa prevalência, entre as crianças nos países desenvolvidos, aproximadamente 2 a 5%, porém alta, de 20 a 30% nas regiões em

desenvolvimento (Podewils *et al.*, 2004; Haque, 2007). Epidemias podem ocorrer, principalmente, em instituições fechadas que atendam crianças, sendo o grupo etário mais acometido, situado entre 8 meses e 10 a 12 anos (BRASIL, 2008a).

Assim como acontece com *E. histolytica*, a maioria das infecções pela *G. lamblia* também é assintomática e ocorre tanto em adultos, quanto nas crianças. A infecção sintomática pode apresentar-se de forma aguda com diarreia, acompanhada de dor abdominal (enterite aguda) ou de natureza crônica, caracterizada por fezes amolecidas, com aspecto gorduroso, fadiga, anorexia, flatulência e distensão abdominal (BRASIL, 2008a).

1.2.3 Agentes Bacterianos

1.2.3.1 *Escherichia coli* Diarreio gênicas

As *Escherichia coli* são classificadas em sorogrupos e sorotipos de acordo com diferentes combinações dos antígenos O (somático – LPS, lipopolissacarídeo da parede celular), K (capsular) e H (flagelar). O sistema de classificação sorológica leva em consideração a fórmula O:H, em que o antígeno O identifica os sorogrupos e o antígeno H os sorotipos (Holt *et al.*, 1994; Campos *et al.*, 2004).

As *E. coli* diarreio gênicas compreendem pelo menos 5 categorias principais: *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC), com base nas características clínicas e epidemiológicas distintas, determinantes de virulência específicos e associações com certos sorotipos (Nataro & Kaper, 1998; Scaletsky *et al.*, 2001; Teng *et al.*, 2004; Vidal *et al.*, 2004).

1.2.3.1.1 *Escherichia coli* enteropatogênica clássica – EPEC

A EPEC foi a primeira categoria de *E. coli* diarreiogênica identificada, os primeiros estudos epidemiológicos relacionando EPEC com diarreia humana foram publicados na Alemanha nas décadas de 20 e 30 e confirmados de maneira definitiva na Inglaterra em 1945 (Trabulsi & Ordoñez, 2005).

A EPEC é considerada nos países em desenvolvimento, a causa mais importante de diarreia aguda e eventual diarreia persistente em crianças menores de 5 anos de idade, com maior prevalência em menores de 2 anos (Albert, 1996; Gomes *et al.*, 1996; Müller *et al.*, 2006; Hien *et al.*, 2007; Ochoa *et al.*, 2008). Foi reportada como sendo responsável por surtos de diarreia hospitalar em berçários, durante o período de inverno (Smith *et al.*, 1996).

A diarreia causada por EPEC apresenta-se aquosa, com muco e raramente sangue, com 5-10 evacuações/dia, acompanhada de febre e vômito (Fagundes-Neto & Scaletsky, 2000; Orlandi *et al.*, 2001). Os principais sorogrupos identificados em casos de diarreia são: O18, O44, O55, O88, O111, O112, O114, O119, O125, O126, O127, O128 ab e O 142 (Levine, 1987).

A EPEC abriga uma ilha de patogenicidade, denominada região LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*), esta região consiste num grupamento de genes associados à virulência, que codifica os fatores responsáveis pela lesão A/E (*Attaching and Effacing*) aos enterócitos do hospedeiro (Nataro & Kaper, 1998). Os principais fatores de virulência das EPEC incluem a fímbria BFP (*Bundle-forming pilus*) codificada pelo gene *bfpA* localizado no plasmídeo EAF (*EPEC Adherence Factor*), a proteína intimina, codificada pelo gene cromossomal *eaeA* (*E. coli attachment-*

effacement) e um aparelho de secreção de proteínas tipo III, conhecido como Esp (*EPEC secreted proteins*), (Knutton *et al.*, 1996; Nataro & Kaper, 1998).

A *E. coli* enteropatogênica é dividida em duas categorias, EPEC típica: apresenta gene *eaeA* e o plasmídeo EAF e EPEC atípica: apresenta apenas o gene *eaeA* (Nataro & Kaper, 1998; Aranda *et al.*, 2007). EPEC típica é bem reconhecida como causa importante de gastroenterite na infância, por outro lado, o papel da EPEC atípica na diarreia infantil, ainda continua controverso. Porém muitos estudos têm demonstrado alguma associação significativa entre a EPEC atípica com a diarreia (Dulger *et al.*, 2003; Afset *et al.*, 2004).

O mecanismo pelo qual a EPEC promove diarreia é complexo e provavelmente resulta dos efeitos de adesão à célula epitelial que inclui alterações na estrutura da membrana e no processo de transporte intestinal (Knutton *et al.*, 1996). De acordo com Ochoa *et al.* (2008), o processo enteropatogênico ocorre resumidamente em três estágios: 1º) aderência localizada da bactéria às células do hospedeiro; 2º) sinais de transdução que leva a translocação da bactéria, via um complexo sistema de secreção de proteínas tipo III e 3º) aderência íntima da bactéria à célula hospedeira, com formação de um pedestal.

1.2.3.1.2 *Escherichia coli* enterotxiogênica – ETEC

A *E. coli* enterotoxigênica emergiu no final dos anos 60 e início de 70, devido principalmente ao trabalho desenvolvido por Gorbach, Sack e outros pesquisadores em Calcutá (Sack *et al.*, 1971). As cepas de ETEC causam diarreia com maior incidência em crianças na faixa etária de 2 a 3 anos de idade (Levine *et al.*, 1993; Albert *et al.*, 1995). Esta bactéria é responsável por dois a três episódios diarreicos em

crianças nos 2 primeiros anos de vida, representando mais de 25% de todas as doenças diarreicas e conta com aproximadamente 200 milhões de episódios diarreicos e 170 mil mortes a cada ano, além de ser o principal agente causador de diarreia nos viajantes, afetando indivíduos dos países desenvolvidos que viajam para as regiões mais pobres do mundo (Black, 1990; Hien *et al.*, 2007; Grimes *et al.*, 2008; OMS, 2010).

A vigilância hospitalar tem mostrado a ocorrência de uma larga proporção dos casos de diarreia por ETEC, nos indivíduos acima de 10 anos de idade (OMS, 2010). A tendência de ETEC causar diarreia com desidratação nas crianças menores de 5 anos é baixa (aproximadamente 5% dos episódios), quando comparada com *Rotavírus* (aproximadamente 36% dos episódios). Entretanto, o fato da incidência da diarreia por ETEC acometendo as crianças ser consideravelmente maior que a causada por *Rotavírus*, o número absoluto dos episódios diarreicos com desidratação causada por ETEC é cerca de 70%, comparando-se com os episódios por *Rotavírus* (OMS, 2010).

A ETEC causa diarreia aquosa profusa, acompanhada de câimbras abdominais leves, raros casos de vômitos e febre, a diarreia geralmente é leve e autolimitada, mas em alguns casos, pode ser grave (Angeles, 2002). O mecanismo pelo qual a ETEC promove diarreia é bem conhecido: aderência na mucosa intestinal e elaboração de enterotoxinas. A aderência à mucosa intestinal está relacionada às adesinas conhecidas como *Pili* tipo 1 e CFA I e II (Fatores de colonização). A partir da colonização inicia-se a elaboração de enterotoxinas. As cepas de ETEC produzem dois tipos de enterotoxinas: toxinas termolábeis LT - I e LT - II (*heat-labile toxin*) e toxinas termoestáveis STa e STb (*heat-stable toxin*) (Yamamoto & Echeverria, 1996; Ugrinovich *et al.*, 2002).

1.2.3.1.3 *Escherichia coli* enteroinvasora – EIEC

DuPont et al. (1971) descreveram certas amostras de *E. coli* que causavam doença diarréica invasiva ou disenteria nos voluntários. Estas amostras, de sorotipos distintos de EPEC e ETEC eram extremamente semelhantes à *Shigella* (Levine, 1987). Hoje há evidências de que EIEC e *Shigella* spp estão relacionadas genética e bioquimicamente, tendo como fatores de virulência, as proteínas de invasão Ipa, Ics e IpgC contidas no plasmídeo denominado pInv (Angeles, 2002).

As EIEC produzem uma doença semelhante à shigelose, sendo mais comumente descrita em surtos do que em casos esporádicos (Gordillo *et al.*, 1992; Gibotti *et al.*, 2004). Crianças de baixa renda nos países em desenvolvimento são as mais afetadas (Levine *et al.*, 1993), causando uma diarréia aguda aquosa que precede a disenteria bacilar (fezes contendo muco, sangue e leucócitos), acompanhada de dor abdominal, vômito, tenesmo e febre (Taylor *et al.*, 1988; Orlandi *et al.*, 2001).

Os mecanismos patogênicos incluem a capacidade de invadir os enterócitos do cólon e proliferar-se no interior dessas células, resultando em um processo inflamatório, morte celular e propagação para células vizinhas (Levine *et al.*, 1993; Nataro & Kaper, 1998).

1.2.3.1.4 *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga – STEC

Em 1982, um surto de colite hemorrágica, ocorrido nos Estados Unidos, chamou a atenção para uma síndrome clínica incomum de doença diarréica e para um novo patógeno bacteriano entérico. O agente etiológico se tratava da *E. coli* O157:H7, um sorotipo até então não reconhecido, como causador de doença diarréica em humanos (Riley *et al.*, 1983).

A *E. coli* enterohemorrágica – EHEC ou STEC é considerada um dos patógenos emergentes mais importantes, envolvida em casos esporádicos e em surtos diarreicos de origem alimentar (Levine, 1987). A STEC causa diarreia aquosa, sanguinolenta com desenvolvimento da colite hemorrágica e Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), principalmente nos Estados Unidos, Canadá, Reino Unido e Japão, (Holfinger *et al.*, 1998; Morabito *et al.*, 1998; Guth *et al.*, 2003; Vaz *et al.*, 2003; Irino *et al.*, 2004). Por outro lado, as infecções causadas pelas amostras de STEC não O157:H7 têm sido cada vez mais reportadas em muitos países, principalmente nos menos desenvolvidos (Irino *et al.*, 2004).

Diferentes quadros clínicos são observados nas infecções por STEC: quadros de diarreia, cujo período de incubação é de 3 a 4 dias e perduram por 5 a 10 dias, são acompanhados por câimbras e dores abdominais, febre baixa e vômito em 30 a 50% dos casos. O quadro da Síndrome Hemolítica Urêmica é caracterizado por manifestações de insuficiência renal aguda, trombocitopenia e anemia hemolítica microangiopática (López *et al.*, 2000). Segundo Rivas *et al.* (2008), a taxa de mortalidade entre crianças com SHU é de 5%.

A Argentina apresentou altas taxas de SHU, 10,4% e 12,2% dos casos/100,000 crianças menores de 5 anos de idade, em 2001 e 2002 respectivamente. Neste país, a SHU é responsável por 20% dos transplantes renais entre crianças e adolescentes (Rivas *et al.*, 2008).

A STEC tem sido isolada de espécimes fecais de muitos animais, incluindo ruminantes (gado, carneiro e búfalos) e não ruminantes (cavalo, cachorro, coelho e porcos) (Rivas *et al.*, 2008). A maioria dos casos e dos surtos causados por

STEC tem sido atribuída, ao consumo de carne bovina e suína (Stephan & Schumacher, 2001; Irino *et al.*, 2004).

As manifestações diarréicas promovidas por STEC são atribuídas a duas enterotoxinas, denominadas SLT-I e SLT-II (*Toxina Shiga Like*), também conhecidas como Verotoxinas (VT-1 e VT-2) e toxina de Shiga (Stx-1 e Stx-2). Outros fatores de virulência foram identificados em amostras de STEC como, enterotoxina EAST codificada pelo gene cromossomal *ast*, proteínas codificadas pela ilha de patogenicidade LEE (*Locus of enterocyte effacement*) e uma enterohemolisina produzida pela maioria das EHEC isoladas de casos de colite hemorrágica e SHU (Levine, 1987; Nataro & Kaper, 1998).

1.2.3.1.5 *Escherichia coli* enteroagregativa – EAEC

A *E. coli* enteroagregativa foi descrita por pesquisadores em 1987, ao examinarem amostras de *E. coli* isoladas em um estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarréia no Chile, identificaram amostras que apresentavam um padrão exclusivo de aderência, semelhante a empilhados de tijolos que foi chamado aderência agregativa – AA (Nataro *et al.*, 1987). O padrão AA permite que se diferencie *E. coli* enteroagregativa de duas outras categorias diarreogênicas de *Escherichia coli*: EPEC e difusamente aderente, as quais apresentam aderência localizada e difusa, respectivamente (Elias Jr. & Gomes, 2005).

A EAEC é cada vez mais reconhecida como um patógeno entérico emergente, além de ser responsável pela diarréia persistente e causar má nutrição em crianças e pessoas infectadas com o HIV (Hung *et al.*, 2006). É também a segunda causa mais comum de diarréia nos viajantes (ETEC é a primeira). Um estudo recente

mostrou que a EAEC foi o único enteropatógeno identificado em 19% dos visitantes de Goa, Índia, em 26% dos visitantes da Jamaica, e em 33% dos estudantes durante um curto período de tempo em Guadalajara, México (Huang, *et al.*, 2006; 2007).

As EAEC são cada vez reportadas como agente causador da diarreia aguda em crianças e adultos, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (Hien *et al.*, 2007; Weintraub, 2007). Esta bactéria causa diarreia aguda em média de 15%, nas crianças que moram nos países em desenvolvimento e 4%, nas vivem nos países desenvolvidos (Huang, *et al.*, 2006). Alguns surtos de gastroenterites por EAEC foram relatados no Japão, envolvendo crianças em idade escolar e na Iugoslávia entre recém-nascidos de 2-11 dias de idade, internados em unidades neonatais (Itoh *et al.*, 1997).

A doença típica causada por EAEC é caracterizada por uma diarreia secretora, mucóide e aquosa e em alguns casos apresenta pouco ou nenhum sintoma como vômito e febre baixa (Weintraub, 2007). O fator de virulência mais estudado é o *aggR*, o regulador principal da virulência de EAEC, o qual controla a expressão dos fatores de aderência, da proteína dispersina, e de um conjunto de genes codificados pelo cromossomo de EAEC (Hung *et al.*, 2006). O padrão AA nas amostras de *E. coli* enteroagregativa requer estruturas fimbriais, denominadas fatores de aderência agregativa (AAF), os quais apresentam três subunidades estruturais que são codificadas por plasmídios *aggA* (AAF/ I), *aafA* (AAF/ II) e *agg-3* (AAF/ III) (Hung *et al.*, 2006).

O mecanismo de patogenicidade da EAEC envolve três estágios: (1) aderência a mucosa intestinal através dos AAF; (2) produção de muco pela bactéria, formando um biofilme na superfície dos enterócitos das células hospedeiras; e (3)

liberação de toxinas, obtenção da resposta inflamatória, toxicidade da mucosa e secreção intestinal (Hung *et al.*, 2006).

1.2.3.2 Gênero *Shigella*

A importância do gênero *Shigella* como agente etiológico da diarreia depende da localização geográfica e da condição imune do hospedeiro (Hien *et al.*, 2007). A *Shigella* tem alta incidência em crianças menores de 5 anos de idade, e é responsável por 10% de todos os episódios diarreicos neste grupo etário (Podewils *et al.*, 2004; Hien *et al.*, 2007). Globalmente, causa cerca de 90 milhões de gastroenterites e 108, 000 mortes a cada ano, com 60% dessas mortes, ocorrendo em crianças menores de 5 anos de idade, principalmente nas que residem nas regiões mais pobres do continente (OMS, 2010).

No Brasil, a prevalência de *Shigella* é de 8% a 10% em menores de 1 ano e de 15% a 18% em maiores de 2 anos. Os índices de prevalência nos adultos são semelhantes aos encontrados em crianças com mais de 2 anos (BRASIL, 2008a).

O gênero *Shigella* é constituído de quatro espécies: *S. dysenteriae* (sorogrupo A; 13 sorotipos), *S. flexneri* (grupo B; 6 sorotipos), *S. boydii* (grupo C; 18 sorotipos) e *S. sonnei* - grupo D; 1 sorotipo (Campos, 2005a). *Shigella* infecta principalmente o homem e, excepcionalmente, outros primatas como macacos e chimpanzés, causando shigelose ou disenteria bacilar (Campos, 2005a).

A shigelose é uma infecção bacteriana de expressão clínica pleomórfica, que pode se manifestar através de formas assintomáticas ou subclínicas e formas graves e tóxicas. Nas formas graves, a shigelose é uma doença aguda toxêmica, caracterizada por febre e diarreia aquosa, que pode ser volumosa e com dor abdominal. A dor

abdominal tem característica de cólica difusa, geralmente precedendo à diarreia, que constitui o sintoma mais frequente, presente em cerca de 90% dos casos. Depois de 1 a 3 dias, as fezes tornam-se mucossanguinolentas, a febre diminui e aumenta o número de evacuações, geralmente de pequeno volume e frequentes, com urgência fecal e tenesmo (colite exsudativa). Além da febre alta, outras manifestações podem estar presentes, tais como: anorexia, náuseas, vômitos, cefaléia, calafrios, estados toxêmicos, convulsões e sinais meningíticos. Ao exame físico, pode-se observar hipotermia, desidratação, hipotensão, dor à palpação abdominal e ruídos hidroaéreos exacerbados. Nas formas leves ou moderadas, a shigelose pode se manifestar apenas por diarreia aquosa, sem aparecimento de fezes disentéricas (BRASIL, 2008a).

Shigella sonnei é o agente mais importante da shigellose em países desenvolvidos, contando com 77% dos casos (comparando-se com 15% nos países em desenvolvimento). *Shigella flexneri* é endêmica nos países em desenvolvimento (60%), além de ser o tipo mais freqüente em todo o mundo (Kotloff *et al.*, 1999; OMS, 2010). Os outros dois sorogrupos compreendem menos de 5% dos isolados na maioria dos estudos realizados, mas é digna de nota, a *S. dysenteriae*, pois este sorogrupo é responsável pela doença mais severa (Podewils *et al.*, 2004).

A *S. dysenteriae* tipo 1, produz a toxina de Shiga semelhante à produzida por STEC, e tem sido responsável por epidemias de diarreia sanguinolenta, associadas em aproximadamente 10% dos casos de óbitos na Ásia, África, e América Central (Kotloff *et al.*, 1999; Podewils *et al.*, 2004).

No Brasil, a *Shigella* é considerada o segundo enteropatógeno bacteriano isolado nos casos de diarreia aguda em crianças. Estudos realizados em São Paulo e Rio de Janeiro demonstraram o percentual de 12% e 7,6% de isolados de *Shigella* spp em

amostras de crianças com diarreia aguda (Andrade *et al.*, 1999; Fagundes-Neto & Scarletsky, 2000), sendo a *S. flexneri* e *S. sonnei*, as espécies mais frequentemente isoladas (Orlandi *et al.*, 2001).

O mecanismo de patogenicidade consiste basicamente na colonização do cólon e porção terminal do íleo, aderência às células M localizadas nos folículos linfáticos e invasão das células epiteliais da mucosa pelo processo de fagocitose. A habilidade invasiva é devido a vários fatores de virulência como as proteínas IpaA, IpaB, IpaC, IpgD e VirA. Após alguns minutos, a *Shigella* lisa a membrana dos vacúolos fagocitários e escapa para o citoplasma, provocando intensa resposta inflamatória que resulta na infiltração de leucócitos poli e mononucleares, edema, ulceração e morte das células da mucosa intestinal; as bactérias se disseminam para as células vizinhas determinando danos de extensas áreas da mucosa. A patogenicidade também é devido as várias toxinas entéricas, como a toxina de Shiga (Stx), produzida pela *S. dysenteriae* tipo 1 e as toxinas ShET 1 e 2 produzidas pelas outras espécies de *Shigella* (Sansonetti *et al.*, 1987; Fasano *et al.*, 1995; OMS, 2010).

1.2.3.3 Gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies: *Salmonella enterica*, constituída de seis subespécies e *Salmonella bongori*, obedecendo a seguinte forma de citação: *Salmonella enterica* subespécie enterica sorovar Typhimurium, ou, simplesmente, *Salmonella* Typhimurium, com o nome do gênero em itálico e o do sorovar em tipo romano (Le Minor & Popoff, 1987; Reeves *et al.*, 1989). Na rotina, utiliza-se o esquema de Kauffmann-White na caracterização antigênica de *Salmonella*, determinando-se as

frações dos antígenos somáticos (O) de natureza polissacarídica, e as estruturas flagelares (H), que são de natureza protéica (Ferreira & Campos, 2008).

São reconhecidos atualmente 2.541 sorovares, dentre os quais 2.519 pertencem à espécie *S. enterica*, e são considerados como potencialmente patogênicos tanto para o homem como para animais ou para ambos (Campos, 2004). As *Salmonellas* spp são importantes causas de gastroenterites agudas em crianças e adultos, tanto em países em desenvolvimento, como desenvolvidos (Germani *et al.*, 1994; Fernandes *et al.*, 1997).

A salmonelose constitui-se em uma zoonose de importante problema de saúde pública. As formas clínicas são representadas por gastroenterites aguda, a mais comum e febres entéricas (febre tifóide e paratifóide) (Grimont *et al.*, 2000; Caetano *et al.*, 2004). O hábitat das espécies de *Salmonella* se limita ao trato intestinal de humanos e de uma variedade de animais. Dentre os sorovares de *Salmonella* adaptados ao homem, destaca-se a *Salmonella enterica* sorotipo Typhi, agente da febre tifóide, doença infecciosa aguda e sistêmica e *Salmonella* Paratyphi A, B, e C, enquanto que outros sorovares, *S. Pullorum*, *S. Gallinarum*, *S. Abortusovis* e *S. Choleraesuis* estão mais adaptados aos animais domésticos e silvestres, que atuam como fontes de infecção, podendo se propagar à espécie humana (Lins, 1970; 1971; Loureiro, 1985; Humphrey, 2000).

No Brasil, pouco se conhece sobre a problemática da salmonelose. Hofer (1974) identificou *Salmonella* nas fezes de crianças e adultos no Rio de Janeiro, durante 10 anos e encontrou 33 sorovares diferentes, sendo *S. Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Anatum* e *S. Thompson*, os mais frequentes. Em São Paulo, Calzada *et al.* (1984) identificaram 124 sorotipos de *Salmonella* de origem humana e não humana, no período

de 1977-1982, com destaque para um aumento acentuado de *S. Agona*. Em um estudo realizado no Recife, Pernambuco, durante o triênio 1978-1980, Leal *et al.* (1987) analisaram 1720 *Salmonellas* spp isoladas de 13.196 coproculturas de pacientes adultos e crianças portadoras de problemas entéricos e identificaram *S. Typhimurium* (43,2%), *S. Saintpaul* (13,9%), *S. Poona* (11,7%) e *S. Derby* (1,4%) como as mais frequentes. Em Salvador, Bahia, Santos *et al.* (2005) identificaram *Salmonella* spp como o segundo mais importante agente bacteriano, em quadros de diarreia aguda entre crianças abaixo de 15 anos de idade, depois da *Shigella* spp.

As gastroenterites são ocasionadas por quase todas as *Salmonellas* spp. Atualmente as epidemias continuam acontecendo na maioria das vezes associada ao sorovar *Salmonella* Enteritidis sendo as carnes, leite e ovos de galinha os principais veículos de contaminação envolvidos (Badrinath *et al.*, 2004; CDC, 2004; Braden, 2006; Zheng *et al.*, 2007). Nos Estados Unidos há uma estimativa de que ocorram 1,4 milhões de casos de salmonelose a cada ano, sendo que, na atualidade, os surtos epidêmicos, em sua maioria, estão associados ao sorovar *S. Enteritidis* (Crump *et al.*, 2004).

Alguns estudos confirmaram a ampla distribuição de *Salmonella* em vários tipos de alimentos de origem animal como carne bovina moída, quibe cru, carnes de eqüinos, e asininos para exportação, vísceras de animais, frutos do mar, farinhas de origem animal para preparo de ração e vegetais (Calzada *et al.*, 1984; Pelavo & Saridakis, 1988; Hofer *et al.*, 2000; Takayanagui *et al.*, 2001) . Esses dados mostram a importância desses meios de transmissão na manutenção da salmonelose em uma população.

No Brasil, as epidemias de enfermidades transmitidas por alimentos causadas por *S. Enteritidis* tem sido registradas em Curitiba (Mota *et al.*, 1983), São Paulo (Araújo *et al.*, 1995; Kaku *et al.*, 1995; Peresi *et al.*, 1998), Brasília (Carmo *et al.*, 1996), Blumenau (Santos & Kupek, 2000) e Rio Grande do Sul (Costaluanga & Tondo, 2002). No estado de São Paulo, foram estudados 3.554 casos de *Salmonella* de origem humana, no período de 1996 a 2003, e identificaram-se 68 sorovares, com destaque para *S. Enteritidis* (Fernandes *et al.*, 2006).

A febre tifóide apresenta distribuição mundial, associada a baixos níveis socioeconômicos, principalmente em situações de precárias condições de saneamento, higiene pessoal e ambiental. Estimativas no ano de 2000 têm sugerido a ocorrência de 21,5 milhões de infecções e 200.000 mortes por febre tifóide a cada ano, em todo o mundo (Mweu & English, 2009). No Brasil, a febre tifóide ocorre sob forma endêmica, com superposição de epidemias, especialmente nas regiões Norte e Nordeste, e está associada a baixos níveis socioeconômicos e de saneamento básico (BRASIL, 2005a).

Estudos realizados no estado do Pará, no período de 1975 a 1986, apontaram a importância da febre tifóide na Região Norte, onde identificaram-se 59 sorovares de *Salmonella* de infecção humana, com destaque para *S. Typhi* (14,6%), seguido de *S. Typhimurium* (9,6%), *S. Give*, (9,0%), *S. Agona* (7,4%) e *S. Newport* (6,2%) (Loureiro, 1990). Na Amazônia, o estado do Pará tem registrado a maioria dos casos de febre tifóide. Foram identificados 443 casos de febre tifóide, no período de 1987 a 2004, oriundos de diversos municípios do estado do Pará, incluindo a ocorrência de epidemias em Marabá, Óbidos, Abaetetuba, Moju, Limoeiro do Ajuru e Anajás (Ramos, 2005).

No estudo sobre a investigação dos sorovares de *Salmonella* envolvidos nas infecções humanas da região Amazônica, no período de 1991 a 2008, Loureiro et al. (2010) estudaram 890 isolados de *Salmonella*, de indivíduos sintomáticos residentes em diferentes municípios do estado do Pará, com destaque para Belém (65,5%), Abaetetuba (5,7%), Ananindeua (4,9%) e Anajás (2,9%), os quais representaram 79% (704 amostras) do total de amostras analisadas. E dentre os sorovares mais frequentes, destacaram-se *S. Typhi* (492), *S. Enteritidis* (45) e *S. Panama* (18).

De modo geral, a patogenicidade da *Salmonella* está associada a diferentes fatores ligados ao hospedeiro e à bactéria, ou seja, varia com o sorotipo, idade e condições de saúde. A febre tifóide acomete exclusivamente o homem e causa febre, mal estar geral, anorexia, cefaléia, obstipação intestinal ou diarreia e tosse seca (Trabulsi *et al.*, 2002).

1.2.3.4 Espécie *Vibrio cholerae*

Muitas espécies de vibrios podem causar diarreia, mas destaca-se o *V. cholerae* como a espécie mais importante responsável por epidemias (Lahiri *et al.*, 1982). Os sorogrupos *V. cholerae* O1, biotipo clássico ou El Tor (sorotipos Inaba, Ogawa ou Hikogima) e O139, também conhecido como Bengal, são os agentes etiológicos da cólera epidêmica e pandêmica. Uma doença infecciosa intestinal aguda, cujas manifestações clínicas variam, desde formas inaparentes passando por quadros caracterizados por diarreia, vômitos e dor abdominal, até casos graves, que cursam com câimbras, inúmeras dejeções diárias com fezes aquosas, abundantes e incoercíveis, desidratação e choque (Campos, 2005b).

O *Vibrio cholerae*, foi identificado por Koch em 1896. Um total de sete pandemias de cólera foi observado nos últimos 500 anos. A OMS estima, entre 1970 e 2000, um total de 4.400.000 casos de cólera notificados com aproximadamente 200.000 óbitos e taxa de letalidade de 4,5% (BRASIL, 2004). Os vibrios encontram-se naturalmente distribuídos em ambientes aquáticos marinhos, estuarinos e de água doce (Colaço *et al.*, 1998; Barbieri *et al.*, 1999; Hervio-Heath *et al.*, 2002). São encontrados, com frequência, na superfície e cavidade intestinal de animais marinhos (crustáceos, moluscos e peixes) que funcionam como potenciais fontes de infecção para o homem (Levine & Griffin, 1993; Biffone *et al.*, 2000).

A sétima pandemia de cólera, iniciada em 1961 emergiu da Indonésia, espalhando-se para outros países da Ásia e do Oriente Médio. Foi causada pelo *V. cholerae* El Tor e chegou ao Brasil em 1991, pela fronteira do Amazonas com o Peru, expandindo-se, de forma epidêmica, para as regiões Norte e Nordeste e fazendo incursões ocasionais nas demais regiões (BRASIL, 2008b).

A partir de 1995 a doença tornou-se endêmica, com 95% dos casos concentrados na região Nordeste. Em 2001, foram registrados sete casos procedentes dos estados do Ceará, Alagoas, Sergipe e Pernambuco. A interrupção da ocorrência dos casos a partir de 2002, certamente, decorre de vários fatores, destacando-se aqueles relacionados aos indivíduos, como o esgotamento de suscetíveis e fatores ligados ao agente etiológico e ao meio ambiente, hipótese que pode ser reforçada pela mesma tendência de redução ocorrida a partir de 1995, em outros países das Américas e em outros continentes (BRASIL, 2008b).

Em fevereiro de 2003, em continuidade à pesquisa das amostras de água de lastro, realizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA foi

verificada a presença de duas cepas patogênicas de *V. cholerae* O1 toxigênico, em amostras coletadas em navios, nos portos de Belém-PA e Recife-PE. Foram intensificadas as ações nesses municípios, com a adoção de medidas emergenciais em um trabalho integrado das equipes das esferas nacional, estadual e municipal das áreas de vigilância epidemiológica, ambiental, sanitária, portos, aeroportos, fronteiras e laboratórios de saúde pública. Em 2004, foram confirmados 21 casos da doença, sendo 18 pelo critério laboratorial (*V. cholerae* O1 Ogawa toxigênico) e 3 pelo critério clínico-epidemiológico, todos procedentes do município de São Bento do Una, localizado na zona agreste do estado de Pernambuco, caracterizando o recrudescimento da doença no país. Em 2005, foram confirmados 5 casos: 4 no município de São Bento do Una e 1 em Recife (BRASIL, 2008b).

Em 2006, um total de 236,896 casos de cólera foram notificados pela OMS em 52 países, sendo que, 46 países da África responderam por 202,407 casos com 5.259 mortes (OMS, 2010). Relatos recentes, estimam a morte de 120,00 pessoas por cólera a cada ano, e um total de 3 a 5 milhões de casos novos de cólera em todo o mundo (OMS, 2010).

O registro de casos é maior nos períodos mais secos do ano, quando o volume baixo da água nos reservatórios e mananciais proporciona a concentração de vibriões. Em algumas áreas, as condições socioeconômicas e ambientais favorecem a instalação e rápida disseminação do *Vibrio cholerae*. Assim, a deficiência do abastecimento de água tratada, destino inadequado dos dejetos, alta densidade populacional e carências de habitação, higiene, alimentação e educação favorecem a ocorrência da doença. Nas áreas epidêmicas, o grupo etário mais atingido são os

maiores de 15 anos, sendo que nas áreas endêmicas, a faixa mais jovem que a anterior é a mais acometida (BRASIL, 2005b).

O *V. cholerae* O1 produz toxina colérica (CT), que é a enterotoxina responsável pela diarreia profusa. De modo geral, a patogênese da cólera está intimamente associada à produção e ação desta toxina sobre as células epiteliais do intestino delgado. Os bacilos penetram no organismo humano por via oral e, após ultrapassarem a barreira gástrica colonizam o intestino delgado produzindo a toxina colérica, seu principal fator de virulência (OMS, 2010).

1.2.3.5 Gênero *Campylobacter*

Campylobacter spp são frequentes causas de infecções entéricas em humanos. Esses organismos foram reconhecidos como patógeno humano pela primeira vez, em 1970 e desde então, a importância destes só tem aumentado, e atualmente é um dos agentes bacterianos mais frequentemente associados com os casos de gastroenterites (Mshana *et al.*, 2009). A prevalência de *Campylobacter* spp nos países desenvolvidos alcança 1-13% nas crianças com diarreia aguda e 1,5% entre as crianças sem diarreia, enquanto, nos países em desenvolvimento é da ordem de 5-35% (Mshana *et al.*, 2009), podendo ser responsável aproximadamente de 5 a 14% pelos episódios de diarreia em todo o mundo (Wang *et al.*, 2007).

Estudos realizados em comunidades nos países em desenvolvimento têm estimado a incidência de *Campylobacter* spp na ordem de 40.000 a 60.000/100.000 crianças menores de 5 anos de idade (Mshana *et al.*, 2009). Atualmente esta bactéria é considerada, um potencial agente bacteriano etiológico de gastroenterites, tanto em crianças quanto em adultos jovens (Podewils *et al.*, 2004; Mshana *et al.*, 2009). Nos

países desenvolvidos, *Campylobacter* spp juntamente com a *Salmonella* são os organismos mais comuns, nos casos de diarreia bacteriana de origem alimentar, incluindo crianças menores de 1 ano de idade (Gallay *et al.*, 2008; OMS, 2010). Estudos prévios têm mostrado que as infecções por *Campylobacter* spp são frequentemente adquiridas por meio dos alimentos contaminados durante o processamento de abate dos animais, leite não pasteurizado e alimentos contaminados pela água de esgoto (Gallay *et al.*, 2008; OMS, 2010).

As campylobactérias são consideradas bactérias zoonóticas. Atualmente são reconhecidas 17 espécies, as quais reconhecem como reservatório natural a mamíferos e aves, tanto domésticos como de vida livre (Fernandez, 2005). Para o homem, as espécies *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* são consideradas os agentes mais importantes de diarreia em adultos e crianças, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (Popovic-Urioc, 1989; Fernandez, 1992). *Campylobacter jejuni* tem distribuição mundial, sendo responsável por 400 milhões de casos de diarreia em todo o mundo, sendo 1,5 milhões só nos Estados Unidos (OMS, 2010).

No Brasil, o gênero *Campylobacter* se revela como importante causa de diarreia aguda em crianças menores de 3 anos, sendo menos frequentes em outras faixas etárias. Em um estudo realizado em Ribeirão Preto – SP, nos anos de 1994 a 1997, os autores avaliaram amostras de 1.836 crianças menores de 10 anos, com gastroenterite aguda e observaram que este gênero foi o terceiro grupo enteropatogênico bacteriano mais comumente isolado (5,4%), Medeiros *et al.* (2001). Outro estudo realizado no Rio de Janeiro, com 406 crianças com diarreia menores de 3 anos, revelou a presença de

Campylobacter spp nas amostras, sendo mais frequente na faixa etária de 6-11 meses (Mangia *et al.*, 1993).

As infecções entéricas por *C. jejuni* e *C. coli* podem resultar em processo inflamatório caracterizado por diarreia com fezes sanguinolentas, dor abdominal aguda, acompanhada de febre e mal estar, evoluindo mais tarde em diarreia aquosa; ou em processo não inflamatório, ocasionando apenas diarreia aquosa sem sangue e muco. As observações a partir das manifestações clínicas, infecções experimentais e estudos epidemiológicos sugerem que a expressão da patogenicidade das espécies de *C. jejuni* e *C. coli* resulte da combinação de diferentes fatores de virulência envolvidos nos processos de adesão, invasão, produção de toxinas, citotoxinas, e mais recentemente de enterotoxinas (Ketley, 1997; Lench, 1997; Wang *et al.*, 2007).

1.2.3.6 Gênero *Aeromonas*

As *Aeromonas* spp são bactérias distribuídas universalmente em ambientes aquáticos (Koneman *et al.*, 2008), tendo sido isoladas de peixes de origem marinha e fluvial, crustáceos, moluscos, hortaliças, águas do mar, rios, lagos, poços e inclusive água clorada de abastecimento público (Parveen *et al.*, 1995; Ghenghesh *et al.*, 2001). Em humanos, *Aeromonas* spp foi reconhecida como patógeno emergente e oportunista de imunocomprometidos (Parveen *et al.*, 1995; Ghenghesh *et al.*, 2001). Além disso, as espécies de *Aeromonas* têm sido implicadas como agentes causadores de diarreia em crianças e adultos. Vários estudos relataram que a ingestão de água não tratada é a maneira mais provável, de adquirir estes organismos (Ghenghesh *et al.*, 2001).

Pelo menos, 13 espécies estão incluídas no gênero *Aeromonas* hoje em dia, sendo três espécies: *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. sobria* as mais comumente associadas com a doença em humanos (Krovacek *et al.*, 1994; Koneman *et al.*, 2008; Ghenghesh *et al.*, 2001). A distribuição das espécies varia com a área geográfica, apresentando picos de incidência no verão, predominando a *A. hydrophila*, *A. veronii* (variedade *sobria*) na Austrália, na Tailândia e no Brasil, enquanto na Europa e nos EUA ocorre maior isolamento de *A. caviae* (Ghenghesh *et al.*, 2001; Franzolin, 2005).

No Brasil, um estudo realizado durante 1995 a 1996 com crianças menores de 5 anos com diarreia, na cidade de Goiânia-GO, demonstrou que 21,9% (20/91) das amostras avaliadas foram positivas para o gênero *Aeromonas* (Nojimoto *et al.*, 1997). A patogenicidade das *Aeromonas* é devido à produção de vários produtos extracelulares biologicamente ativos, tais como, hemolisinas, citotoxinas, enterotoxinas, proteases, leucocidina, fosfolipases e endotoxina (Singh & Sanyal, 1992; Merino *et al.*, 1995; Chopra & Houston, 1999).

As manifestações intestinais mais comumente observadas são diarreia aquosa por mais de duas semanas com 2-10 evacuações por dia, acompanhada de dor abdominal/cólica, náuseas/vômitos e febre (Kuijper *et al.*, 1989).

1.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

1.3.1 Diagnóstico Viral

Desde a descoberta dos *Rotavírus*, que se têm multiplicado os procedimentos de diagnóstico laboratorial fundamentados na detecção de partículas ou antígenos virais, bem como do seu material genético. O microscópio eletrônico representou o recurso diagnóstico pioneiro, sucedendo-se o desenvolvimento de

métodos diversos, como: a imunofluorescência em substrato celular; técnica imunoenzimática (ELISA); aglutinação de partículas de látex (APL) sensibilizadas com anticorpos; eletroforese do ácido nucléico em gel de poliacrilamida; hibridização de sondas radioativas ou biotiniladas com o ácido ribonucléico (RNA) viral; isolamento viral em linhagens celulares suscetíveis; e mais recentemente, a Reação em Cadeia da Polimerase precedida de transcrição reversa (Oliveira & Linhares, 1999).

1.3.2 Diagnóstico Parasitológico

O diagnóstico parasitológico é realizado através do método direto a fresco dos espécimes fecais e de sedimentação espontânea em água: método de Lutz, Hoffmam, Pons e Janer e pelas técnicas sorológicas: ELISA, imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta, radioimunoensaio etc e métodos especiais de coloração como Ziehl-Neelsen modificado, Kinyoun modificado, Giemsa etc além dos ensaios moleculares, como a PCR e suas variantes (Neves, 2007).

1.3.3 Diagnóstico Bacteriológico

O diagnóstico dos casos de gastroenterites é realizado pelo isolamento das bactérias a partir das amostras de fezes com posterior identificação das colônias suspeitas, por meio de provas bioquímicas e sorológicas. Além da cultura bacteriana, outros métodos têm sido muito utilizados, como: ensaios fenotípicos, técnicas de hibridização de ácido desoxirribonucléico (DNA), técnicas moleculares como a Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (PCR) e suas variantes (PCR multiplex, PCR em tempo real, RT-PCR), Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE), técnica de Sequenciamento, dentre outros.

1.3.4 Emprego da Técnica da PCR Multiplex, para Identificação das Categorias Diarreio gênicas de *Escherichia coli*

De acordo com Nataro & Kaper (1998), as *E. coli* diarreio gênicas representam importante causa de diarreia endêmica e epidêmica no mundo. Porém, provavelmente, a frequência desses patógenos é subestimada, devido sua detecção exigir métodos diagnósticos específicos, que não são utilizados na prática clínica. A identificação de *E. coli* diarreio gênicas requer sua diferenciação das espécies não patogênicas da microbiota normal (Toma *et al.*, 2003; Aranda *et al.*, 2007).

Essas categorias podem ser identificadas através de ensaios sorotípicos, fenotípicos e moleculares. O primeiro requer a identificação de antígenos somáticos (O) e flagelares (H). Na rotina laboratorial é realizada apenas a pesquisa dos sorogrupos pela determinação dos antígenos somáticos. Apesar de aproximar algumas vezes com essas categorias, este método, não é suficiente para identificar uma amostra como diarreio gênicas, devido não estar correlacionando em alguns casos, com a presença de fatores de virulência (Nataro & Kaper, 1998). Portanto a identificação deve ser direcionada às características que determinam a virulência desses microorganismos.

Os ensaios fenotípicos para a detecção de toxinas, padrão de aderência ou invasão podem identificar amostras de *E. coli* diarreio gênicas, porém requer elevados investimentos, conhecimento especializado, técnicas especiais e aplicação de vários sistemas de detecção (ex: cultura de células, material radioativo, ensaios de citotoxicidade), além de consumir um longo período de tempo (Saucedo *et al.*, 2003; Aranda *et al.*, 2007).

Com a aplicação da PCR é possível detectar genes envolvidos com a patogenicidade de diversos isolados bacterianos, permitindo uma identificação com

resultados confiáveis, visto que esta técnica apresenta alta sensibilidade e especificidade (Nguyen *et al.*, 2005).

Na investigação de patógenos, a PCR é indicada para a amplificação de uma região específica do DNA que permite a detecção de determinado *locus* de virulência. Técnicas de PCR convencionais para a pesquisa de *E. coli* diarreio gênicas têm sido relatadas, porém, a investigação dos isolados bacterianos requer um grande número de reações individuais para a detecção de vários fatores de virulência, tornando essa técnica laboriosa e com demanda de muito tempo (Kimata *et al.*, 2005).

Para reduzir o número de testes necessários para a identificação de *E. coli* diarreio gênicas, vários sistemas de PCR multiplex para a identificação simultânea de dois ou mais *loci* em uma única reação, têm sido desenvolvidos (Kimata *et al.*, 2005). Esses sistemas de detecção múltipla representam apropriada solução para a identificação das categorias patogênicas de *E. coli*, além de se mostrar como uma tecnologia eficiente e mais econômica (Saudecedo *et al.*, 2003; Kimata *et al.*, 2005). Entretanto, usualmente mais de uma PCR multiplex é requerida para a identificação dos fatores de virulência de *E. coli* (Toma *et al.*, 2003).

Dada a importância das *E. coli* diarreio gênicas como causa de diarreia aguda em crianças no Brasil, Aranda *et al.* (2004) utilizaram previamente dois ensaios de PCR multiplex, para detectar EPEC, ETEC, EIEC, STEC e EAEC em amostras de fezes. Com o intuito de simplificar ainda mais o diagnóstico, Aranda *et al.* (2007) desenvolveram um sistema de PCR multiplex que permitiu identificar simultaneamente, as 5 categorias patogênicas de *E. coli* através de uma única reação.

A execução da técnica de PCR multiplex única, desenvolvida por Aranda *et al.* (2007) por este trabalho, obedeceu três critérios. O primeiro foi devido esse

sistema ser inovador, visto que permitia detectar todas as categorias de *E. coli* diarreio gênicas em um único ensaio, ao combinar 7 pares de *primers* e produzir amplicons com tamanhos bem distintos entre eles. O segundo critério foi que até então, ainda não tinha sido testada uma multiplex única no Laboratório de Biologia Molecular da Seção de Bacteriologia e Micologia do IEC, para a pesquisa dessas categorias. O terceiro e último critério foi o mais importante, visto que, a otimização dessa técnica ofereceria uma possibilidade prática, para a identificação rápida e com menos custos, das categorias de *E. coli* patogênicas em um único tubo de reação, podendo assim, ser aplicada facilmente no laboratório.

1.4 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA DIARRÉIA EM JURUTI

No Oeste do Pará, à margem direita do Rio Amazonas, está Juruti, um município que vem passando por muitas transformações no curso de sua história. Juruti teve origem em uma aldeia de índios Munduruku, no século XIX, e mantém influência marcante da cultura indígena. Tem população de cerca de 35 mil habitantes, sendo que 60% vive na área rural. O município apresenta consideráveis carências: possui infraestrutura de saneamento pouco estruturada, a maioria da população vive com menos de R\$ 75,5 de renda per capita mensal e 21% das pessoas com mais de 25 anos de idade são analfabetas (Allan, 2009).

O município já viveu importantes ciclos econômicos, como os da extração do pau-rosa e da juta, que não o conduziram a um desenvolvimento estável e duradouro. A economia se concentra nas lavouras temporárias, destacando-se o cultivo da mandioca. Pesca, extrativismo vegetal e, mais recentemente, pecuária, comércio e

serviços de pequeno porte (portuários, mercearias, alimentação) são outras atividades presentes no território e que visam a subsistência e o mercados locais (Allan, 2009).

Segundo a Secretaria de Saúde de Juruti, a diarreia constitui um dos principais agravos da população e, devido à carência de pessoal técnico qualificado e das metodologias utilizadas para o diagnóstico, pouco se conhece sobre as causas da doença (Juruti, 2005; 2008).

O coeficiente de mortalidade por diarreia no município de Juruti em 2006 foi de 10,1/100 habitantes (Juruti, 2005; 2008). A Figura 5 mostra o número de casos de diarreia notificados em 2006.

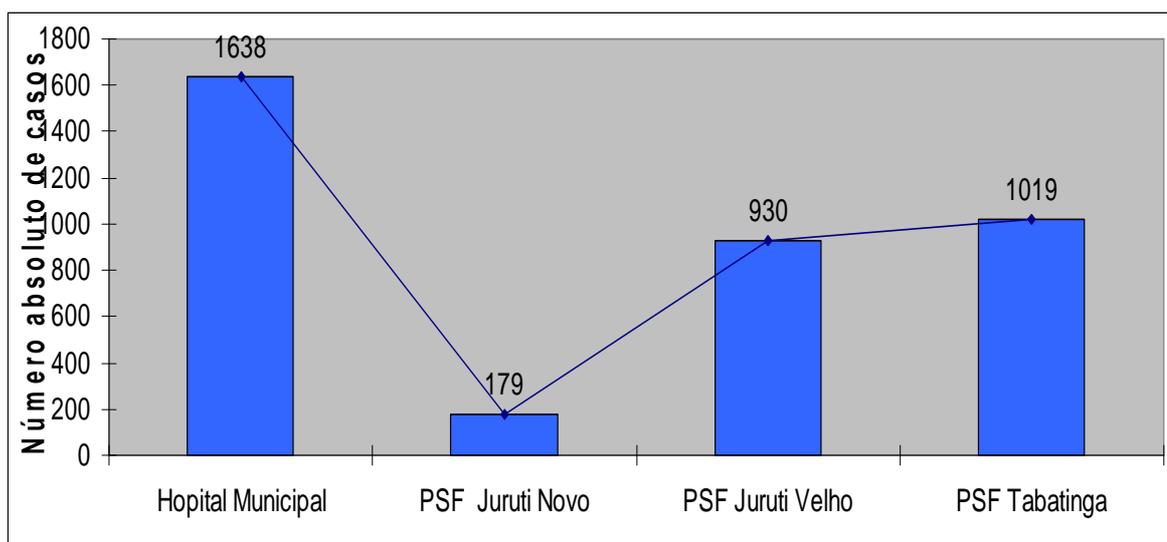


Figura 5 – Casos de diarreia notificados em 2006 no município de Juruti, distribuídos por unidade de atuação do PACS/PSF (Fonte: MDDA - Secretaria Municipal de Saúde de Juruti).

O número absoluto de casos diarreicos em 2006, de acordo com o mês de ocorrência pode ser assim distribuídos: janeiro (268), fevereiro (404), março (431), abril (290), maio (292), junho (281), julho (403), agosto (370), setembro (304), outubro (293), novembro (68) e dezembro (362), respectivamente (Juruti, 2005; 2008). A

ocorrência das doenças diarreicas agudas (DDA) em Juruti, no ano 2007 foi de 2.151 casos, e em 2008, o número de casos por DDA apresentou uma redução de 76,6%, correspondendo a um total de 1.647 casos (Allan, 2009).

1.5 PREVENÇÃO E CONTROLE

A doença diarreica apresenta-se como condição de grande complexidade causal, no entanto passível de medidas que possibilite o bem estar do indivíduo. Dentre as medidas profiláticas que visam à redução dos números ainda expressivos de morbidade e mortalidade por diarreia, principalmente em menores de cinco anos de idade e residentes em áreas pobres do mundo, podemos citar ações que levem a melhoria da qualidade da água, destino adequado de lixo e dejetos, controle de vetores, higiene pessoal e alimentar. Vigilância mais apurada dos locais de uso coletivo, tais como colégio, creches, hospitais e penitenciárias, que podem apresentar riscos maximizados quando as condições sanitárias não são adequadas. Estimular o uso de águas tratadas através de sistemas coletivos ou domiciliares, no caso de crianças de creches, deve ser feito o isolamento daquelas que apresentarem diarreia, além de reforçar as orientações às manipuladoras e às mães. O incentivo ao prolongamento do tempo de aleitamento materno; aumento da ingestão de líquidos, como o soro caseiro, para reidratação oral das crianças; e a melhoria do acesso aos serviços de saúde de qualidade.

Na década de 1990, ocorreu uma redução significativa da mortalidade entre as crianças com menos de 5 anos de idade, graças à melhora da cobertura vacinal e ao impacto de procedimentos simplificados de saúde, capazes de evitar as mortes provocadas por diarreias (BRASIL, 2009b). Com a liberação da vacina, em 2006 contra

o *Rotavírus*, pelo Ministério da Saúde, mais de 800 mortes anuais, entre menores de 5 anos de idade foram evitadas no Brasil. A redução, correspondeu a pelo menos 34% do total de óbitos, que acometiam as crianças pequenas afetadas com a doença diarréica aguda. Outro impacto que a vacina trouxe foi uma redução de até 42% das internações por gastroenterite infecciosa que têm associação com o *Rotavírus*, na faixa etária de menores de cinco anos, significando menos de 44.469 atendimentos nas unidades de saúde (BRASIL, 2006c).

1.6. OBJETIVOS

1.6.1. Objetivo Geral

Descrever os aspectos epidemiológicos e etiológicos da diarreia aguda no município de Juruti, Pará.

1.6.2. Objetivos Específicos

- Descrever as variáveis epidemiológicas (sexo, faixa etária, distribuição temporal) associadas à transmissão dos enteropatógenos pesquisados;
- Descrever a ocorrência dos principais enteropatógenos bacterianos (*Salmonella* spp, *Shigella* spp, *E. coli* diarreio gênicas, *Campylobacter jejuni/coli*, *Vibrio* spp, *Aeromonas* spp), parasitários (*E. histolytica*, *G. lamblia* e *Cryptosporidium* spp) e de *Rotavírus* nos casos de diarreia aguda e nos controles;
- Pesquisar genes codificantes dos fatores de virulência da *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC), e demonstrar a frequência dos grupos enteropatógenicos de *Escherichia coli* nos casos diarreicos e não diarreicos nas amostras estudadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ASPECTOS GEOGRÁFICOS DO MUNICÍPIO DE JURUTI

O município de Juruti localiza-se no Estado do Pará, na mesorregião do Baixo Amazonas e na microrregião de Óbidos, fazendo fronteira ao Norte com os municípios de Oriximiná e Óbidos, a Leste com Santarém, ao Sul com Aveiro e a Oeste com Parintins e Nhamundá (no Estado do Amazonas) e Faro (Allan, 2009) (Figura 6). A sede do município dista 950 km, em linha reta da capital Belém e tem as seguintes coordenadas geográficas: 02° 09'09" de latitude Sul e 56°05'42" de longitude Oeste de Greenwich, estando a uma altitude de 36 metros. Ocupa uma área de 8.304,00 Km², apresentando uma densidade geográfica de 4,57 habitantes/Km² (Juruti, 2007).

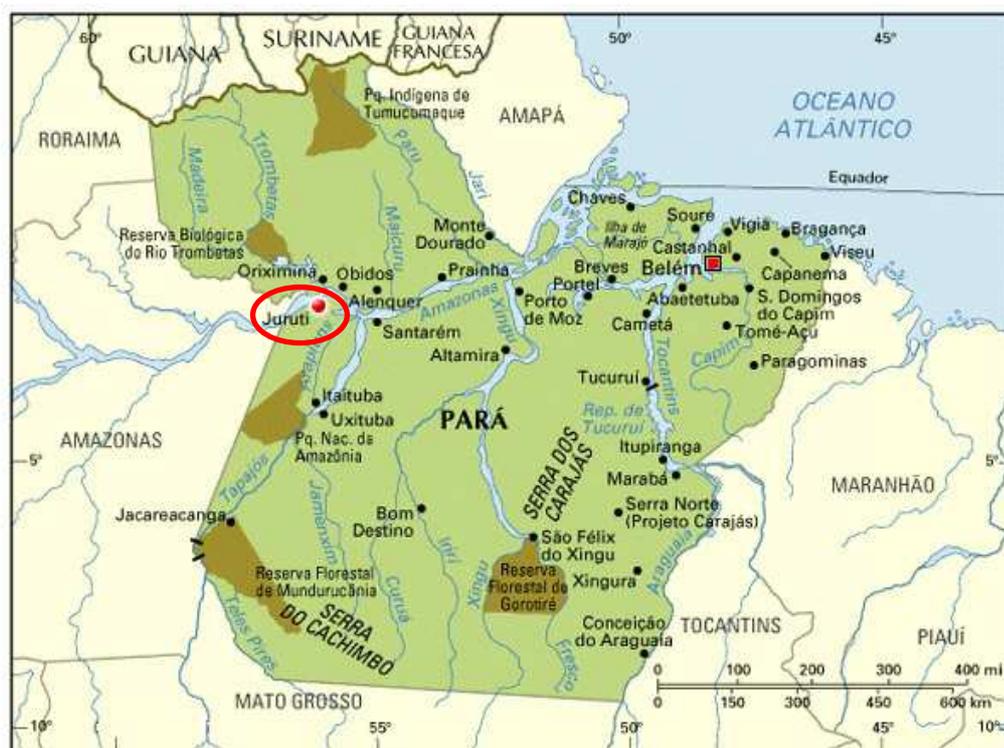


Figura 6 – Localização do município de Juruti, Estado do Pará (Fonte: Allan, 2009).

O município de Juruti teve uma população recenseada pelo IBGE em 2007 de 33.775 habitantes, sendo distribuídos em zona urbana, 12.069 indivíduos (35,7%) e 21.706 (64,3%) na zona rural (Allan, 2009). A temperatura do ar é sempre elevada, com média anual de 25,6° C, apresentando valores médios para as máximas de 31 °C e para as mínimas de 22,5 °C. Quanto à umidade relativa, apresenta valores acima de 80%, em quase todos os meses do ano (Juruti, 2007).

A pluviosidade se aproxima dos 2.000 mm anuais. Entretanto, é um tanto irregular durante o ano. As estações chuvosas coincidem com os meses de dezembro a maio e as menos chuvosas, com os meses de junho a novembro. A área rural tem características próprias com diversidades fisiográficas reunidas na mesma área, com diferentes aspectos da região amazônica: várzea, região de rios e planaltos. O principal acidente hidrográfico é o rio Amazonas, que recebe o rio Juruti e vários igarapés da região (Juruti, 2007).

2.2 AMOSTRAGEM

2.2.1 Amostras Clínicas

No período de fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009 foram avaliados espécimes fecais de 261 indivíduos, de diferentes faixas etárias e sexo, sendo 170 com diarreia aguda (casos: três ou mais evacuações/dia) e 91 sem sintomas gastrointestinais (grupo controle: ausência de diarreia nos últimos 15 dias) Vanderlei *et al.* (2003). Dos 261 indivíduos residentes no município de Juruti incluídos no estudo, 189 foram oriundos de atendimentos em Hospital e Postos de Saúde da Família, e 72 constituíram-se da busca ativa. Todas as amostras do estudo foram examinadas por métodos laboratoriais, que permitiram a identificação de bactérias enteropatogênicas (*Shigella*

spp, *Salmonella* spp, *Escherichia coli* diarreio gênicas, *Vibrio* spp, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Aeromonas* spp), parasitos (*E. histolytica*/*E. dispar* e *Giardia lamblia*) e *Rotavírus*.

Para a pesquisa dos fatores de virulência das categorias diarreio gênicas de *Escherichia coli*, foram utilizadas um total de 850 amostras de *E. coli* isoladas de 239 indivíduos (152 diarreicos e 87 controles).

2.2.2 Etapas do Trabalho no Campo

Foram estabelecidos três pontos de atendimento e coleta do material: Hospital Municipal de Juruti (pacientes do ambulatório, internados e do serviço de emergência) e Postos de Saúde da Família, Maracanã e Palmeiras. Por meio de técnicos capacitados do IEC/MS nos pontos de atendimento, os pacientes receberam instruções para fazerem uma coleta adequada do material fecal e a entrega, no máximo, após duas horas de coletado a amostra. O recebimento das amostras de fezes dos pacientes do ambulatório e dos postos de saúde ocorreu de segunda a sexta-feira de 8:00 às 12:00 horas e 14:00 às 17:30 horas. Dos pacientes internados e dos atendimentos de emergência, a coleta e o recebimento foram realizados de segunda à sexta feira de 8 às 19 horas e aos sábados de 8 às 12 horas e 14 às 16 horas e aos domingos de 8 às 12 horas, por ocasião de três expedições de uma equipe do Instituto Evandro Chagas ao município de Juruti, durante os meses de fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009.

Os pacientes ou seus responsáveis assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (ANEXO 1), confirmando sua participação no estudo. Para cada indivíduo, foi preenchida uma ficha clínico-epidemiológica

(ANEXO 2) contendo dados pessoais, sociais, hábitos alimentares, higiênico sanitários, de doença atual e pregressa.

2.2.3 Coleta e Transporte das Amostras

Os espécimes fecais foram colhidos em frascos coletores de polipropileno com tampa de rosca com capacidade de aproximadamente 80 mL, limpos, secos e isentos de substâncias conservantes. Após o recebimento do material, os mesmos foram acondicionados em caixa isotérmica e encaminhados ao laboratório de pesquisa instalado na Secretaria de Saúde de Juruti, onde procederam-se com as análises bacteriológicas e exame parasitológico, no prazo máximo de duas horas após a coleta. Todos os resultados da análise parasitológica foram entregues aos pacientes antes do término de cada expedição ao campo. Devido a necessidade da análise bacteriológica ser concluída em Belém, as amostras bacterianas isoladas foram repicadas para ágar nutriente e encaminhadas ao Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas da Seção de Bacteriologia e Micologia – SABMI do Instituto Evandro Chagas (IEC) em Ananindeua – PARÁ.

Uma parte dos espécimes fecais foi congelada e enviada para o IEC em Ananindeua-PA, atendendo às normas de biossegurança, onde foram submetidos à pesquisa qualitativa de *Campylobacter jejuni/coli* e *Rotavírus*.

2.3 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

2.3.1 Pesquisa Parasitológica

Os espécimes fecais foram analisados sob microscopia de luz, para pesquisa de formas evolutivas de protozoários e helmintos. Foram utilizados os métodos diretos: salina/lugol e de sedimentação espontânea (Carli, 2001).

2.3.2 Pesquisa Bacteriológica

2.3.2.1 Métodos Convencionais

De uma a duas gramas de amostras de fezes foram suspensas em 3 mL de solução salina a 0,85%, esterilizada e homogeneizadas em *vortex*. Para o isolamento de membros da família Enterobacteriaceae, o material fecal em suspensão foi semeado em placas de Petri contendo meios seletivos indicadores: ágar Mac Conkey – MC (Difco ou Merck) e ágar *Salmonella-Shigella* – SS (Difco ou Merck). Uma alíquota de 1 mL dessa suspensão, foi inoculada em tubos contendo 10 mL de meio de enriquecimento Selenito Cistina – SC (Difco ou Merck). Posteriormente, todos os meios inoculados foram incubados à temperatura de 35-37 °C por 18-24 horas. Após este período, o meio de enriquecimento SC foi semeado em ágar SS e incubado à temperatura de 35-37 °C por 18-24 horas.

As colônias suspeitas foram repicadas para os meios de triagem, ágar Três Açúcares e Ferro – TSI (Difco ou Merck) e ágar Lisina Ferro – LIA, e a caracterização bioquímica seguiu as recomendações de Ewing (1986), com a utilização das seguintes provas: produção de gás, indol, sulfeto de hidrogênio, vermelho de metila, motilidade, uréia e prova de Voges-Proskauer; utilização do citrato de Simmons, fenilalanina-desaminase e descarboxilação de aminoácidos (lisina e ornitina). Na caracterização sorológica (soroaglutinação em lâminas), (Ewing, 1986 e Kauffmann, 1954) foram utilizados antisoros polivalentes e monovalentes específicos (Bio-Rad),

para identificar *Shigella* spp, *Salmonella* spp e alguns grupos enteropatogênicos de *E. coli*.

Para o isolamento de bactérias da família Vibrionaceae e Aeromonadaceae, uma alíquota de 0,5 mL da suspensão fecal foi inoculada em dois tubos contendo 10 mL do meio de enriquecimento Água Peptonada Alcalina – APA, pH 8,5. Posteriormente os tubos foram incubados à temperatura de 35 – 37 °C, por 6-8 horas e 18-24 horas.

O meio de enriquecimento APA incubado por 6-8 horas foi semeado em placas contendo meio seletivo indicador - ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS), para o isolamento de *Vibrio* spp e o outro tubo incubado por 18-24 horas, foi semeado em placas de ágar *Pseudomonas/Aeromonas* – GSP (Glutamate-starch-phenol-red), para o isolamento de *Aeromonas* spp. A caracterização bioquímica foi realizada utilizando o Sistema API-20E (bioMérieux) de acordo com as recomendações de McDonnell *et al.* (1982). A Figura 7 ilustra o fluxograma de isolamento e identificação de enteropatógenos bacterianos.

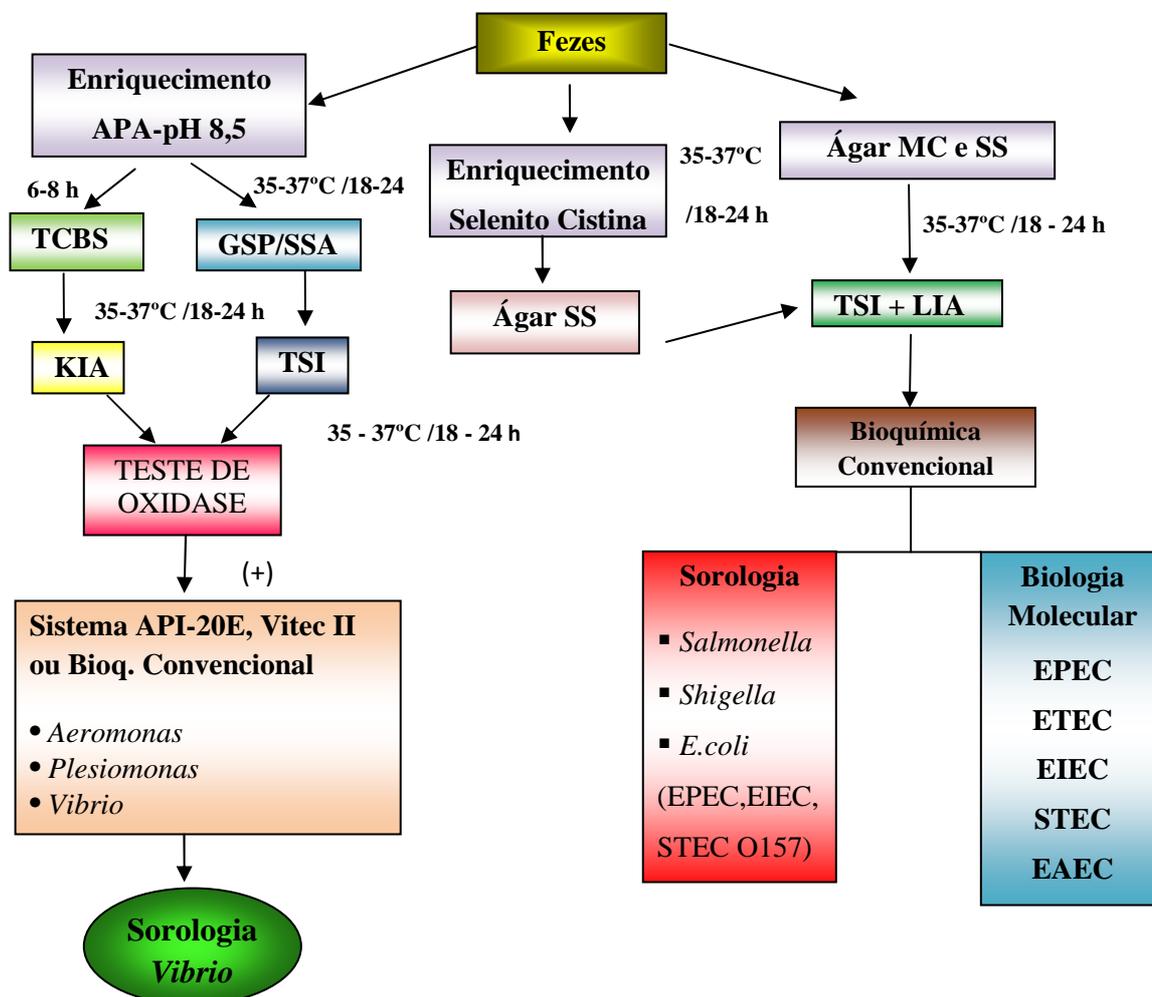


Figura 7 – Fluxograma de isolamento e identificação de enteropatógenos bacterianos a partir de amostras de fezes.

Para a pesquisa das categorias diarreio gênicas de *Escherichia coli* foram selecionadas aproximadamente, 3 colônias fermentadoras de lactose e 2 colônias não fermentadoras de lactose do ágar Mac Conkey. Um total de 850 amostras de *E. coli*, isoladas de 239 clientes envolvidos no estudo, foram estocadas em ágar Luria (Difco) e armazenadas na bacterioteca da Seção de Bacteriologia do IEC/MS, para a realização dos ensaios de PCR multiplex.

2.3.3 Método Imunoenzimático para a Pesquisa de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*

Foram utilizados Kits de ELISA, da RIDASCREEN *Campylobacter* para realização destes ensaios. As amostras de fezes foram previamente descongeladas e utilizadas nos testes de ELISA para a detecção qualitativa de antígenos de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, cuja metodologia seguiu os padrões citados no manual do fabricante.

2.3.4 Método Imunoenzimático para a Pesquisa de *Rotavírus*

Foram utilizados Kits de ELISA, da RIDASCREEN *Rotavírus* para realização destes ensaios. As amostras de fezes foram previamente descongeladas e utilizadas nos testes de ELISA para a detecção qualitativa de *Rotavírus*, cuja metodologia seguiu os padrões citados no manual do fabricante.

2.3.5 Pesquisa Molecular das *E. coli* Diarreio gênicas

As amostras de *Escherichia coli* estocadas em ágar Luria (Difco) foram reidentificadas bioquimicamente. Em seguida, cada amostra de *E. coli* foi cultivada em ágar nutriente (Difco) e incubada à temperatura de 35 – 37 °C por 18 – 24 horas. Posteriormente, o crescimento bacteriano foi utilizado nos procedimentos de extração de DNA. As cepas padrões de *Escherichia coli*: E2348/69, O42, H10407, EDL1284 e EDL931 foram utilizadas como controles positivos e K12 DH5 α , como controle negativo, as mesmas foram cedidas pela Dra. Tânia Vaz, do Instituto Adolfo Lutz (Quadro 1). As *E. coli* diarreio gênicas foram classificadas de acordo com a presença dos genes, descritos no Quadro 2, segundo os trabalhos de Campos *et al.* (2004) e Franzolin

et al. (2005). Essa classificação serviu como orientação prévia para a seleção dos alvos moleculares utilizados na PCR.

Quadro 1 – Cepas de referência de *Escherichia coli* para PCR.

Cepas de Referência	Categorias de <i>Escherichia coli</i>
E2348/69	EPEC
O42	EAEC
H10407	ETEC – LT/ST
EDL1284	EIEC
EDL931	STEC
K12 DH5 α	<i>E. coli</i> não patogênica

Quadro 2 – Classificação molecular das categorias patogênicas de *Escherichia coli*.

Categorias patogênicas	Sequências alvos
EPEC típica	Genes <i>eae</i> (intimina) e <i>bfpA</i> (fímbria BFP), Região EAF com ausência dos genes <i>stx-1</i> e <i>stx-2</i> (toxina de Shiga)
EPEC atípica	Gene <i>eae</i> (intimina) com ausência dos genes <i>stx-1</i> e <i>stx-2</i>
EAEC	Gene <i>aggR</i> (fímbrias de aderência agregativa – AAFs)
ETEC	Genes <i>elt</i> e <i>est</i> codificadores das enterotoxinas LT e ST
EIEC	Gene <i>ipaH</i> (plasmídeo de invasão)
STEC	Genes <i>eae</i> (intimina) e <i>stx</i> (Stx-1 e Stx-2)

2.3.5.1 Extração de DNA bacteriano

O DNA dos isolados caracterizados fenotipicamente como *E. coli* e das cepas de referência dos controles positivos e negativo foi extraído pelo método de fervura e congelamento, seguindo às recomendações de Starnbach *et al.* (1989) e Baloda *et al.* (1995).

O crescimento bacteriano em ágar nutriente foi transferido para um tubo *Eppendorf* de 1,5 mL, com 400 µL de água Milli-Q estéril. Posteriormente, a suspensão bacteriana foi submetida à fervura (100 °C) por 10 minutos e em seguida congelada a -20 °C. Depois este material foi descongelado a temperatura ambiente e centrifugado a 12.000 r.p.m. por 5 minutos. Por fim, o material extraído foi armazenado a -20 °C, por tempo máximo de 20 dias e utilizado posteriormente nas reações da PCR.

2.3.6 Sequências Iniciadoras Utilizadas nos Ensaio da PCR Multiplex

Diferentes sequências de oligonucleotídeos foram selecionadas, com base no trabalho desenvolvido por Aranda *et al.* (2007), os quais podiam ser distinguíveis facilmente após eletroforese em gel de agarose (Quadro 3) e serem capazes de amplificar simultaneamente as categorias de *E. coli* diarreio gênicas em uma única reação .

Quadro 3 – Oligonucleotídeos utilizados na PCR multiplex e seus respectivos produtos de amplificação.

Designação	Sequência dos oligonucleotídeos (5' - 3')	Gene alvo	Produtos de Amplificação	Referência
eae-1 eae-2	CTGAACGGCGATTACGCGAA CGAGACGATACGATCCAG	<i>eae</i>	917 pb	Aranda et al. (2004)
BFP-1 BFP-2	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	<i>bfpA</i>	326 pb	Aranda et al. (2004)
aggRks-1 aggRksa-2	GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAATCGTCAGCATCAGC	<i>aggR</i>	254 pb	Toma et al. (2003)
LT-f LT-r	GGCGACAGATTATACCGTGC CGGTCTCTATATCCCTGTT	<i>Elt</i>	450 pb	Aranda et al. (2004)
ST-f ST-r	ATTTTMTTTCTGATTTTCTT CACCCGGTACARGCAGGATT	<i>Est</i>	190 pb	Aranda et al. (2004)
IpaH-1 IpaH-2	G TTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	<i>ipaH</i>	600 pb	Aranda et al. (2004)
VTcom-u VTcom-d	GAGCGAAATAATTTATATGTG TGATGATGGCAATTCAGTAT	<i>stx1/ stx2</i>	518 pb	Toma et al. (2003)

2.3.7 Padronização da PCR Multiplex

A técnica da PCR multiplex utilizada neste trabalho, seguiu o protocolo otimizado no estudo de Aranda *et al.* (2007), ao combinar 7 pares de oligonucleotídeos. Porém, com modificações na concentração final e volume dos componentes da reação e substituição de *Taq* DNA polimerase.

Os componentes dos ensaios da PCR multiplex foram combinados em microtubos estéreis do tipo *Eppendorf* de 0,2 mL, onde foram colocados o DNA e todos os reagentes descritos no Quadro 4. As reações foram completadas com água Milli-Q autoclavada, para um volume final de 25µL e preparadas em cabine de PCR/UV Work Station, COY Lab. Prod., Inc., EUA.

Quadro 4 – Componentes do ensaio da PCR multiplex.

Componentes	Volume (μL)	Concentração final
Água Milli-Q estéril	5,0	-
Tampão de reação 10X (Invitrogen, Brasil)	2,5	0,5 X
dNTPs 10 mM (Invitrogen, Brasil)	1,25	0,25 mM cada
Oligonucleotídeos, (Invitrogen, Brasil)		
eae-1/eae-2	1,5 / 1,5	5 pmol/ μL
BFP-1/BFP-2	1,0 / 1,0	2,5 pmol/ μL
aggRks-1/aggRksa-2	1,0 / 1,0	2,5 pmol/ μL
LT-f/LT-r	0,5 / 0,5	2,5 pmol/ μL
ST-f/ST-r	1,0 / 1,0	6,47 pmol/ μL
IpaH-1/IpaH-2	0,5 / 0,5	2,5 pmol/ μL
VTcom-u/VTcom-d	1,0 / 1,0	2,5 pmol/ μL
Total	6,5 / 6,5	
MgCl ₂ 50 mM (Invitrogen, Brasil)	0,75 μL	0,75 mM
Platinum <i>Taq</i> DNA polimerase 5 U/ μL (Invitrogen, Brasil)	0,5 μL	2,5 U
DNA	2,0 μL	-
Volume final	25 μL	-

As preparações da PCR multiplex foram colocadas no termociclador automático de gradiente modelo Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems – EUA) e submetidas a ciclos específicos de desnaturação, hibridização e extensão (Quadro 5).

Quadro 5 – Condições cíclicas utilizadas nos ensaios da PCR multiplex.

Etapas	Temperatura	Tempo (minuto)	N° de ciclos
<i>Hot Start</i>	50°C	2	1
Desnaturação inicial	95°C	5	1
Desnaturação	95°C	1	40
Hibridização	50°C	1	
Extensão	72°C	1	
Extensão final	72°C	7	1

2.3.8 Detecção das Sequências Alvos Amplificadas

Os produtos da PCR (8 µL) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo brometo de etídeo 1µg/mL (Sigma, Brasil), realizada sob campo elétrico de 90 V por 2 horas em cuba horizontal de 120 mL com tampão de corrida, Tris-Borato-EDTA (TBE 1X). Para a mensuração dos tamanhos dos fragmentos amplificados, foram aplicados 2,0µL do marcador de peso molecular (Ladder 1 Kb *plus*- Invitrogen, Brasil). A visualização dos fragmentos foi feita com auxílio de um transluminador (Vilber Lourmat, França) e o gel fotografado por um sistema de fotodocumentação, Biomaging Systems (UPV, E.U.A).

2.3.9 Aspectos Éticos

O presente projeto fez parte de um projeto maior intitulado: “**Saúde no Município de Juruti, Pará: cenário atual, desafios e possibilidades**”, o qual foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos do Instituto Evandro Chagas, SVS/MS, sob o Protocolo CEP/IEC - N° 0030/05, CAAE: 0013.0.072.000-06, em 23 de outubro de 2006 (ANEXO 3).

2.3.10 Análise Estatística

O presente estudo foi do tipo observacional transversal descritivo, os resultados foram organizados em banco de dados, utilizando o programa Access da plataforma Windows e as variáveis foram testadas utilizando testes não paramétricos, através do *software* BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007), e os resultados com $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

O Coeficiente de Contingência C foi utilizado para verificar a associação entre o número de co-habitantes e o nível salarial e a frequência dos casos positivos nos grupos diarréicos e controles foi testada pelo Teste Binomial. A distribuição dos enteropatógenos entre as faixas etárias e a diferença na frequência das categorias de *E. coli* diarreio gênicas foram testadas pelo teste do Qui-Quadrado.

A diferença entre as proporções de infecções mistas observadas entre os grupos diarréicos e controles foi testada pelo *Odds Ratio* e a ocorrência de *Shigella* spp e *E. coli* diarreio gênicas nos dois grupos foi comparada pelo teste G.

3 RESULTADOS

3.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA DOENÇA DIARRÉICA NO MUNICÍPIO DE JURUTI, ESTADO DO PARÁ.

Foram avaliados no período de fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009, 261 indivíduos, sendo 170 pacientes com diarreia aguda e 91 controles (indivíduos sem relato de diarreia nas duas semanas anteriores ao atendimento). Do total de indivíduos envolvidos no estudo, 86,2% (225/261) eram procedentes da zona urbana e 13,8% (36/261) da zona rural, sendo que, 54,4% situavam-se abaixo de 10 anos de idade e o sexo feminino foi ligeiramente superior ao masculino (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição dos participantes do estudo, de acordo com a faixa etária e o sexo, Juruti, Pará. Fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009.

Faixa etária (anos)	Sexo					
	Masculino		Feminino		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
< 1	08	3,1	10	3,8	18	6,9
1-9	61	23,4	63	24,1	124	47,5
10-19	07	2,7	09	3,4	16	6,1
20-29	15	5,8	17	6,5	32	12,3
30-39	06	2,3	13	5,0	19	7,3
40-49	11	4,2	05	1,9	16	6,1
50-59	07	2,7	06	2,3	13	5,0
> 60	06	2,3	17	6,5	23	8,8
Total	121	46,5	140	53,5	261	100

A maioria dos indivíduos atendidos no estudo relatou renda familiar mensal de um a dois salários mínimos, seguida de menos de um salário mínimo. Em relação ao número de pessoas residentes por domicílio, a maior frequência coube a faixa

de 4 a 6 co-habitantes (93), seguida de 0 a 3 (79) (Tabela 3). Quando testada a associação entre o número de co-habitantes por domicílio, observou-se associação estatisticamente significativa no sentido de que, quanto maior o número de co-habitantes, menor era a renda mensal dos indivíduos daquele domicílio ($p = 0,0230$).

Tabela 3 - Distribuição dos clientes do estudo, de acordo com a renda familiar mensal e o número de co-habitantes, no município de Juruti, Pará. Fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009.

Renda Familiar/ Salário Mínimo	Número de				Total	
	Co – habitantes				N	(%)
	0-3	4-6	7-10	> 10		
< 1	22	24	29	13	88	33,7
1 - 2	40	46	25	06	117	44,8
2 - 3	07	06	06	02	21	8,1
3 – 5	07	16	04	0	27	10,3
> 5	03	0	02	0	05	1,9
NI*	0	01	02	0	03	1,2
Total de co-habitantes	79	93	68	21	261	100

*NI- não informado.

Das 261 amostras analisadas, 154 foram positivas para bactérias enteropatogênicas, parasitos e *Rotavírus*. Destas amostras, 76,6% (118/154) eram de pacientes com diarreia aguda, e 23,4% (36/154) eram de controles. De acordo com a análise estatística, os casos positivos foram significativamente associados aos pacientes com diarreia aguda ($p < 0,0001$).

Do total de indivíduos positivos para enteropatógenos, 53,2% foram representados pelo sexo feminino (82/154) e 46,8% pelo masculino (72/154). Na Figura

8 é possível visualizar o número de amostras positivas por período de coleta: fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009. A proporção de positividade foi levemente superior no mês de fevereiro (34,4%/53), em relação aos meses de junho (33,1 %/51) e julho (32,5%/50).

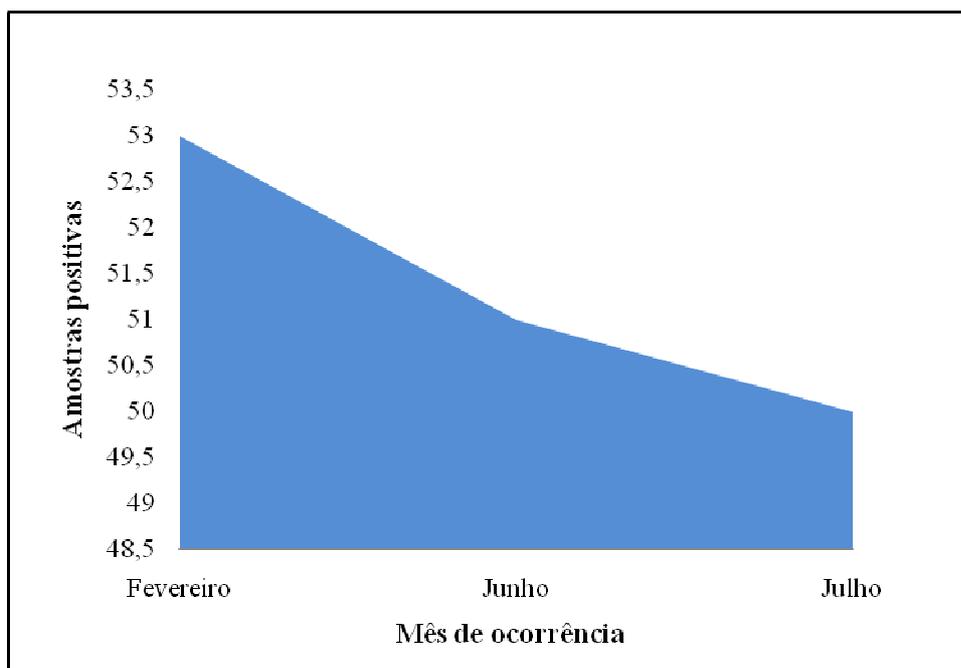


Figura 8 – Distribuição das amostras positivas, segundo o mês de ocorrência, Juruti, Pará. Fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009.

Na Figura 9 visualiza-se a distribuição das amostras positivas do grupo diarreico e controle, de acordo com a faixa etária, o período chuvoso (fevereiro de 2008) e o período de estiagem (junho de 2008 e julho de 2009). O maior número de amostras positivas, nos três meses de coleta foi observado na faixa etária de 1-9 anos de idade (76/154), seguido de 20-29 anos (19/154).

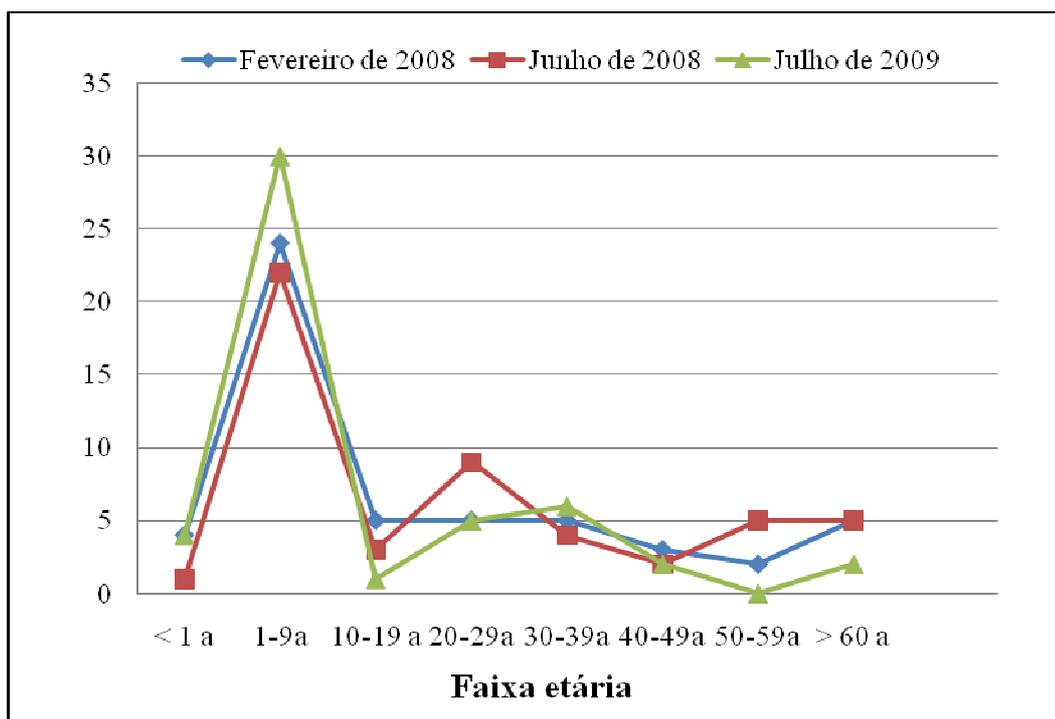


Figura 9 – Distribuição sazonal das amostras positivas por faixa etária, Juruti, Pará. Fevereiro, junho de 2008 e julho de 2009.

Em relação aos casos de diarreia aguda, 53,4% eram do sexo feminino e 46,6% do masculino. Quanto à faixa etária, a maior proporção coube à faixa de 1-9 anos de idade com 46,6% dos casos positivos (Figura 10).

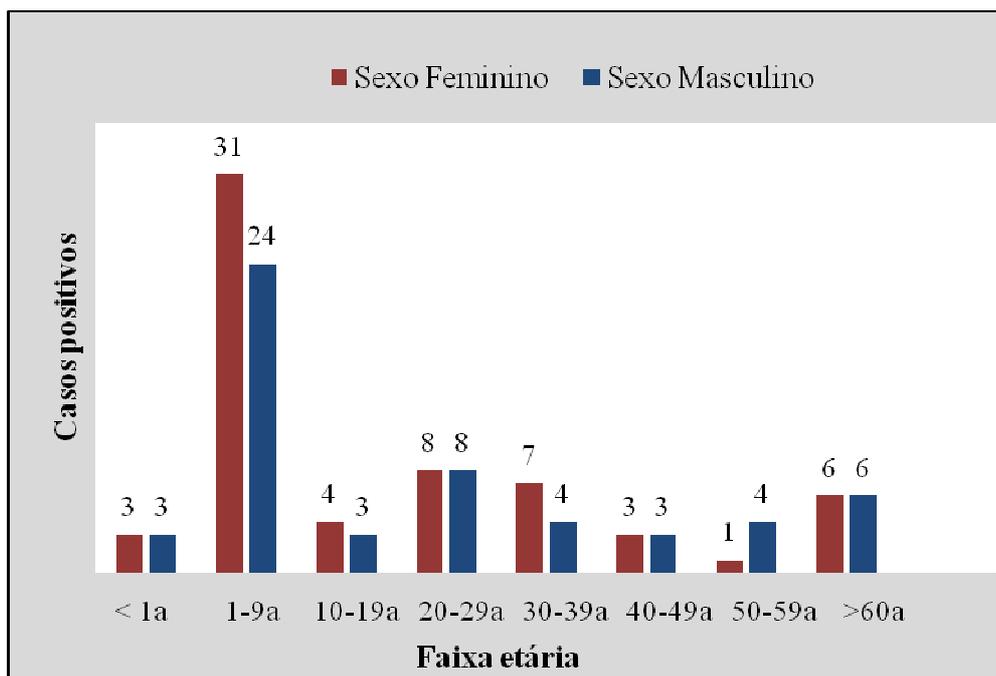


Figura 10 – Frequência dos casos de diarreia aguda de acordo com o sexo e a faixa etária, Juruti, Pará. Fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009.

3.1.1 Identificação de Enteropatógenos Bacterianos, Parasitários e de *Rotavírus* dos Casos Positivos de Diarreia Aguda e do Grupo Controle

Das 154 amostras que apresentaram enteropatógenos bacterianos, parasitários e *Rotavírus*, 75,4% foram representadas por infecções únicas e 24,6% por infecções mistas, sendo 66 amostras positivas para parasitos, 46 para bactérias enteropatogênicas, 4 para *Rotavírus*, 30 associações de parasitos e bactérias enteropatogênicas, 5 associações de duas bactérias enteropatogênicas, 2 casos de *Rotavírus* com bactérias enteropatogênicas e 1 caso de *Rotavírus* com parasito. Em relação às infecções mistas, 14,9% estavam presentes em crianças e 9,7% em adultos. Observa-se na Figura 11 a proporção das infecções únicas e mistas das amostras positivas para enteropatógenos.

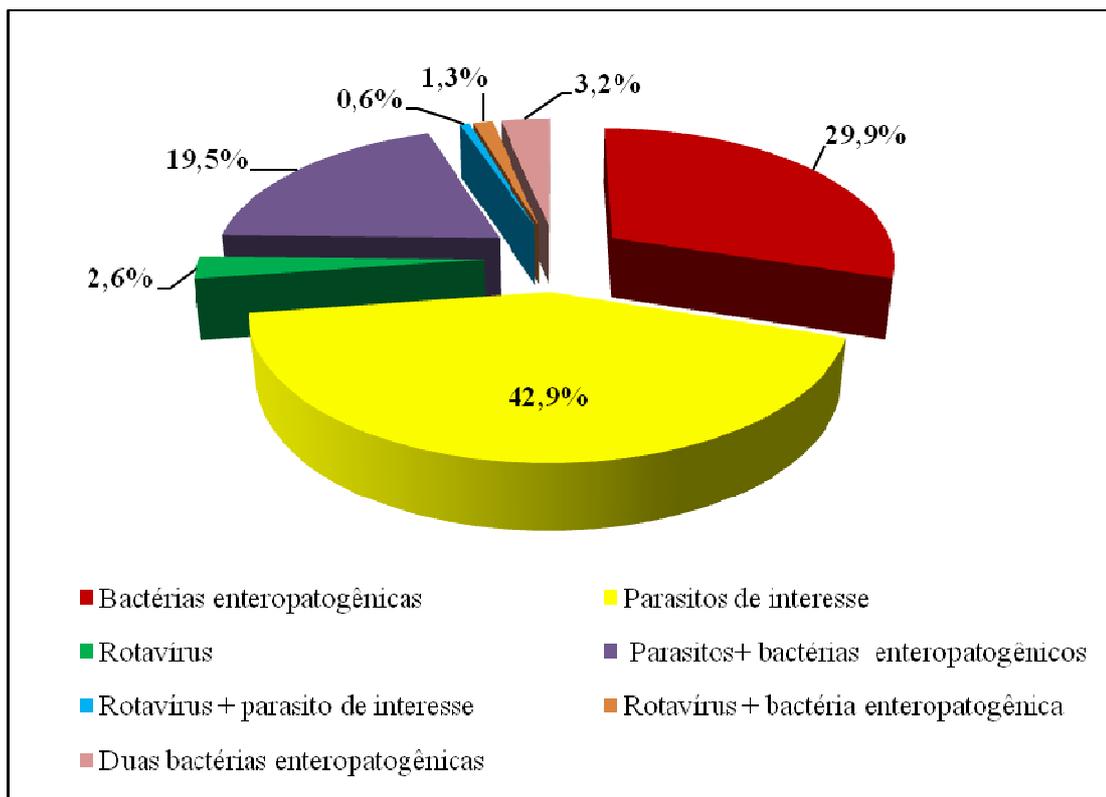


Figura 11 – Proporção das amostras positivas, município de Juruti, Pará. Fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009.

Um total de 211 enteropatógenos estava presente nos pacientes com diarreia aguda (118) e controles (36). Na Tabela 4 abaixo, observa-se que a maior frequência de agentes bacterianos, parasitários e *Rotavírus* foi observada no grupo diarréico (162/118), com destaque para *E. histolytica/E. dispar* (26%), *Shigella* spp (15,7%), *Giardia lamblia* (13,3%) e *E. coli* diarreio gênicas (12,8%).

Tabela 4 – Frequência de enteropatógenos bacterianos, parasitários e de *Rotavírus* segundo o grupo diarréico e controle, Juruti, Pará. Fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009.

Enteropatógenos	Grupo diarréico		Grupo Controle		Total	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
<i>Shigella flexneri</i>	24	11,4	0	-	24	11,4
<i>Shigella sonnei</i>	9	4,3	0	-	9	4,3
<i>E. coli</i> diarreio gênicas	27	12,8	12	5,7	39	18,5
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	10	4,7	3	1,4	13	6,1
<i>Salmonella</i> Panama	1	0,5	0	-	1	0,5
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	0,5	1	0,5	2	1,0
<i>Aeromonas sobria</i>	01	0,5	0	-	1	0,5
<i>E. histolytica/E. dispar</i>	55	26	15	7,1	70	33,1
<i>Giardia lamblia</i>	28	13,3	17	8,0	45	21,3
<i>Rotavírus</i>	6	2,8	01	0,5	07	3,3
Total	162	76,8	49	23,2	211	100

Sinal convencional utilizado (-): dado numérico igual a zero.

A distribuição de enteropatógenos (211/154) por faixa etária foi estatisticamente diferente, ($p < 0,0001$). As crianças menores de 10 anos de idade apresentaram a maior proporção de positividade, com mais da metade dos enteropatógenos detectados (55,4%), (Tabela 5).

Tabela 5 – Distribuição de enteropatógenos bacterianos, parasitários e de *Rotavírus* por faixa etária, Juruti, Pará. Fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009.

Enteropatógenos	Faixa etária (em anos)								Total
	< 1	1-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	>60	
<i>Shigella flexneri</i>	1	9	2	5	1	1	2	3	24
<i>Shigella sonnei</i>	0	5	1	1	1	0	0	1	9
<i>E. coli</i> diarreiogênicas	5	20	1	2	3	1	2	5	39
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	0	6	1	2	3	0	1	0	13
<i>Salmonella</i> Panama	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	1	0	0	0	0	1	0	2
<i>Aeromonas sobria</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>E.histolytica/ E.dispar</i>	1	30	5	13	8	5	2	6	70
<i>Giardia lamblia</i>	1	31	3	4	4	1	1	0	45
<i>Rotavírus</i>	2	3	0	1	0	1	0	0	7
Total (N)	10	107	13	28	20	9	9	15	211
(%)	4,7	50,7	6,1	13,3	9,5	4,3	4,3	7,1	100
Nº de amostras positivas	9	77	08	19	15	7	7	12	154

Dos 261 indivíduos incluídos no estudo, 84 apresentaram bactérias enteropatógenas nas fezes, isoladas ou em infecções mistas (Tabela 6). Destes, 52,4% (44/84) eram do sexo masculino, 47,6% (40/84) eram do feminino e 53,6% (45/84) incluíram crianças menores de 10 anos de idade.

Os enteropatógenos bacterianos foram identificados como únicos agentes de infecção em 47 situações, os outros 37 episódios foram representados por infecções de etiologia mista, sendo, 31 do grupo diarreico e 6 dos controles (Tabela 6). A

probabilidade de ocorrer infecções de etiologia mista, de bactérias enteropatogênicas com outros enteropatógenos nos pacientes com diarreia aguda, foi estatisticamente significativa, ($p = 0,0172$).

Nos casos de diarreia aguda, predominaram duas espécies: *Escherichia coli* diarréio-gênicas (10%) e *Shigella* spp (8,2%), porém, somente *Shigella* spp esteve estatisticamente associada à diarreia aguda ($p = 0,0028$).

Tabela 6 – Frequência geral de bactérias enteropatogênicas, como agentes únicos de infecção ou em infecções de etiologia mista dos 261 indivíduos incluídos no estudo, segundo o grupo diarréico e controle, Juruti, Pará. Fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009.

(continua)

Enteropatógenos	Grupo						(p)
	Diarréico		Controle		Total		
	%	(NP/NA)*	%	(NP/NA)	%	(NP/NA)	
<i>Shigella flexneri</i>	5,9	(10/170)	-	(0/91)	3,8	(10/261)	0,0203
<i>Shigella sonnei</i>	2,3	(4/170)	-	(0/91)	1,5	(4/261)	0,3045
<i>E. coli</i> diarreioogênicas	10	(17/170)	8,8	(8/91)	9,6	(25/261)	0,9238
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	1,8	(3/170)	2,2	(2/91)	1,9	(5/261)	0,8156
<i>Salmonella</i> Panama	0,6	(1/170)	-	(0/91)	0,4	(1/261)	0,7561
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,6	(1/170)	-	(0/91)	0,4	(1/261)	0,7561
<i>Aeromonas sóbria</i>	0,6	(1/170)	-	(0/91)	0,4	(1/261)	0,7561
<i>Shigella sonnei</i> + <i>E. coli</i> diarreioogênica	1,2	(2/170)	-	(0/91)	0,8	(2/261)	0,7627
<i>Shigella sonnei</i> + <i>E.histolytica/E.dispar</i>	1,8	(3/170)	-	(0/91)	1,1	(3/261)	0,4799
<i>Shigella flexneri</i> + <i>Campylobacter jejuni/coli</i>	0,6	(1/170)	-	(0/91)	0,4	(1/261)	0,7561

*NP/NA: Número de amostras positivas/número de amostras avaliadas.

Tabela 6 – Frequência geral de bactérias enteropatogênicas, como agentes únicos de infecção ou em infecções de etiologia mista dos 261 indivíduos incluídos no estudo, segundo o grupo diarréico e controle, Juruti, Pará. Fevereiro, junho de 2008 e julho de 2009.

(continuação)

Enteropatógenos	Grupo						(p)
	Diarréico		Controle		Total		
	%	(NP/NA)*	%	(NP/NA)	%	(NP/NA)	
<i>Shigella flexneri</i> + <i>E. coli</i> diarreio gênica	0,6	(1/170)	-	(0/91)	0,4	(1/261)	0,7561
<i>Shigella flexneri</i> + <i>E. coli</i> diarreio gênica + <i>Giardia lamblia</i>	0,6	(1/170)	-	(0/91)	0,4	(1/261)	0,7561
<i>Shigella flexneri</i> + Rotavírus	0,6	(1/170)	-	(0/91)	0,4	(1/261)	0,7561
<i>Shigella flexneri</i> + <i>E.histolytica/E.dispar</i>	5,3	(9/170)	-	(0/91)	3,4	(9/261)	0,0320
<i>Shigella flexneri</i> + <i>E.histolytica/E.dispar</i> + <i>Giardia lamblia</i>	0,6	(1/170)	-	(0/91)	0,4	(1/261)	0,7561
<i>Campylobacter jejuni/coli</i> + <i>E. coli</i> diarreio gênica	-	(0/170)	1,1	(1/91)	0,4	(1/261)	0,7561
<i>Campylobacter jejuni/coli</i> + <i>E.histolytica/E.dispar</i>	1,2	(2/170)	-	(0/91)	0,8	(2/261)	0,7627
<i>Campylobacter jejuni/coli</i> + <i>Giardia lamblia</i>	1,2	(2/170)	-	(0/91)	0,8	(2/261)	0,7627
<i>C. jejuni/coli</i> + <i>E.histolytica/E.dispar</i> + <i>Giardia lamblia</i>	1,2	(2/170)	-	(0/91)	0,8	(2/261)	0,7627
<i>E. coli</i> diarreio gênica + <i>E.histolytica/E.dispar</i>	2,3	(4/170)	1,1	(1/91)	1,9	(5/261)	0,8156
<i>E. coli</i> diarreio gênica + <i>Giardia lamblia</i>	1,2	(2/170)	2,2	(2/91)	1,5	(4/261)	0,9118
<i>E. coli</i> diarreio gênica + Rotavírus	-	(0/170)	1,1	(1/91)	0,4	(1/261)	0,7561
<i>Aeromonas hydrophila</i> + <i>Giardia lamblia</i>	-	(0/170)	1,1	(1/91)	0,4	(1/261)	0,7561

3.1.2 PCR Multiplex para a Identificação das Categorias de *Escherichia coli* Diarreio gênicas

Para a realização dos ensaios de PCR multiplex foram utilizadas 850 amostras de *E. coli* isoladas de 239 clientes submetidos ao estudo. Dos 239 indivíduos, 39 apresentaram *E. coli* diarreio gênicas (17 EAEC, 12 ETEC, 8 EPEC, 1 EIEC e 1 STEC).

3.1.2.1 Ensaio da PCR Multiplex

Resultados positivos foram observados nos ensaios da PCR multiplex, com amplificação de todos os alvos moleculares, sem o aparecimento de bandas inespecíficas ou sobreposições. Porém o alvo *eae* (maior produto de PCR, com 917 pb), apresentou uma banda mais fraca quando visualizado no gel de agarose (Figura 12).

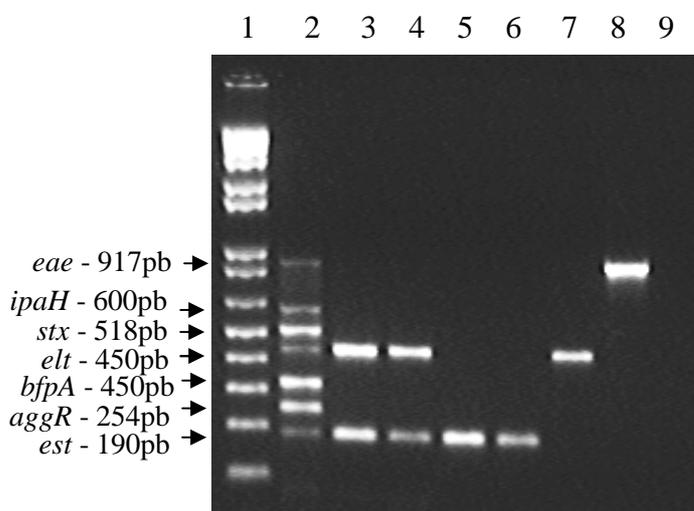


Figura 12 – Ensaio da PCR multiplex, 1 – Ladder 1Kb, 2- controle positivo (mix das 5 categorias padrões de *E. coli* diarreio gênicas). Amostras clínicas: 3 e 4 – ETEC (*elt*, *est*), 5 e 6 – ETEC (*est*), 7 – ETEC (*elt*), 8 – EPEC (*eae*) e 9 – controle negativo (*E. coli* K12 DH5 α).

Dos 39 indivíduos com *Escherichia coli* diarreiogênicas, 20 eram do sexo feminino, 19 do masculino e 25 (64,1%) incluíram crianças menores de 10 anos de idade. A frequência das *E. coli* diarreiogênicas nos pacientes com diarreia aguda foi de 17,8% (27/152), enquanto no grupo controle foi de 13,9% (12/87), (Tabela 7). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a distribuição das *E. coli* diarreiogênicas nos grupos diarreico e controle ($p = 0,5340$), por outro lado, a frequência das categorias das *E. coli* patogênicas foi estatisticamente diferente entre elas ($p < 0,0001$).

A *E. coli* enterotoxigênica foi a mais frequente (7,2%) nos pacientes com diarreia aguda, enquanto nos controles, a maior proporção (9,2%) foi representada pela *E. coli* enteroagregativa (Tabela 7). Entretanto, nenhuma das categorias de *E. coli* diarreiogênicas estiveram associadas ao grupo diarreico (Tabela 7).

Tabela 7 – Distribuição das categorias de *Escherichia coli* diarreio gênicas isoladas dos indivíduos do grupo diarreico e controle, Juruti, Pará. Fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009.

<i>E. coli</i> diarreio gênicas	Grupo				Total	(p)	
	Diarreico		Controle				
	%	(NP/NA)	%	(NP/NA)			
EAEC	5,9	(9/152)	9,2	(8/87)	7,1	(17/239)	0,4977
ETEC	7,2	(11/152)	1,2	(1/87)	5,0	(12/239)	0,0561
EPEC	4,0	(6/152)	2,3	(2/87)	3,3	(8/239)	0,7555
EIEC	0,7	(1/152)	-	(0/87)	0,4	(1/239)	0,7812
STEC	-	(0/152)	1,2	(1/87)	0,4	(1/239)	0,7812
Total	17,8	(27/152)	13,9	(12/87)	16,2	(39/239)	

*NP/NA: Número de amostras positivas/número de amostras avaliadas.

Na Tabela 8, observa-se 24 quadros de infecções por um único patotipo de *E. coli* diarreio gênicas: 10 ETEC, 8 EAEC, 5 EPEC e 1 STEC e 15 casos de infecções de etiologia mista, sendo 10 de pacientes do grupo diarreico e 5 de controles. As associações mais frequentes foram com EAEC + *Giardia lamblia* (3/15) e com EAEC + *E. histolytica*/*E. díspar* (2/15). Das 8 amostras positivas para *E. coli* enteropatogênica, 7 eram de EPEC atípicas e das 12 *E. coli* enterotoxigênicas isoladas, 5 apresentaram os genes codificadores de ST, 4 de LT e ST e 3 de LT.

Tabela 8 - Distribuição das categorias patogênicas de *Escherichia coli*, Juruti, Pará. Fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009.

(continua)

Pacientes	EPEC		ETEC		EAEC	EIEC	STEC		Outros agentes Associados
	<i>eae</i>	<i>bfPA</i>	<i>Elt</i>	<i>est</i>	<i>aggR</i>	<i>ipaH</i>	<i>stx-1</i>	<i>stx-2</i>	
1	-	-	-	+	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>Giardia lamblia</i>
3	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>Giardia lamblia</i>
4	-	-	-	-	+	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>E. h/E. díspar*</i>
6	+	+	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	+	-	-	<i>E. h/E. díspar</i>
8	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>Shigella sonnei</i>
9	-	-	-	-	+	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	+	-	-	-	-	-
12	-	-	+	-	-	-	-	-	-
13	-	-	+	+	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	+	-	-	-	-
15	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>Shigella sonnei</i>
16	-	-	+	+	-	-	-	-	-
17	+	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	+	+	-	-	-	-	-
19	+	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	+	-	-	-	-
21	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>Rotavírus</i>
22	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>E. h/E. díspar,</i> <i>Giardia lamblia</i>
23	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>Giardia lamblia</i>

* *Entamoeba histolytica/Entamoeba díspar*

Tabela 8 - Distribuição das categorias patogênicas de *Escherichia coli*, Juruti, Pará. Fevereiro e junho de 2008 e julho de 2009.

(continuação)

Pacientes	EPEC		ETEC		EAEC	EIEC	STEC		Outros agentes Associados
	<i>eae</i>	<i>bfPA</i>	<i>Elt</i>	<i>est</i>	<i>aggR</i>	<i>ipaH</i>	<i>stx-1</i>	<i>stx-2</i>	
24	-	-	-	-	+	-	-	-	-
25	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>Giardia lamblia</i>
26	-	-	-	-	+	-	-	-	-
27	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>E. h/E. díspar</i>
28	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>E. h/E. díspar</i>
29	-	-	-	+	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>C. jejuni/coli</i> **
31	+	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>Shigella flexneri</i> , <i>Giardia lamblia</i>
33	-	-	-	+	-	-	-	-	<i>Shigella flexneri</i>
34	-	-	-	-	+	-	-	-	-
35	-	-	+	-	-	-	-	-	-
36	-	-	+	+	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	+	-	-	-	-
38	-	-	-	+	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-	+	+	-

** *Campylobacter jejuni* / *Campylobacter coli*

4 DISCUSSÃO

Segundo os dados demográficos da população estudada, a maioria dos participantes atendidos eram crianças menores de 10 anos de idade, com uma proporção de 54,4%. Vários estudos em todo mundo, relatam que crianças residentes nos países em desenvolvimento apresentam episódios frequentes de diarreia, predominantemente, nas populações de áreas com precárias condições de desenvolvimento humano e crianças menores de 5 anos de idade (Black, 1993; Motta & Silva, 2002; Façanha & Pinheiro, 2005; Cesario & Neto, 2006; Loulizi *et al.*, 2008). Quanto ao sexo, o percentual de homens e mulheres não teve diferença significativa.

O acesso a bens e serviços básicos depende quase que, exclusivamente, do nível de rendimento salarial atingido pelas famílias. Portanto, para medir seu nível de bem estar é preciso conhecer seu rendimento econômico. No Brasil, quase metade das famílias (49,4%) vivia com rendimento *per capita* inferior a um salário mínimo (R\$ 465,00) em 2008 (BRASIL, 2009). Segundo, Silva *et al.* (2002), a renda tem influência direta nas condições de vida e de sobrevivência das pessoas, principalmente da população infantil, uma vez que dela depende o acesso à educação, ao serviço de saúde de qualidade, e a condições adequadas de vida e de moradia. Neste estudo, a maioria dos indivíduos atendidos relatou renda familiar de 1-2 salários mínimos (44,8%), seguida da menor que um salário mínimo (33,7%), observando-se que quanto maior o número de co-habitantes, menor foi a renda mensal dos indivíduos daquele domicílio.

É importante ressaltar que um elevado número de pessoas vivendo numa mesma residência, com situação sócio-econômica desfavorável, e limitado acesso à rede de serviços públicos de saúde e educacional adequados, propicia a aquisição de doenças, especialmente a diarreia aguda.

De janeiro a maio costuma ser o período do ano mais chuvoso no município de Juruti. Em relação ao número de enteropatógenos detectados, não teve diferença significativa entre os meses de coleta das amostras, sendo que o mês de fevereiro apresentou um pouco mais de enteropatógenos, quando comparado com os meses de junho e julho. De acordo com o estudo de Amaral *et al.* (2003), o aumento do índice de contaminação bacteriológica de águas de poços do lençol freático superficial está associada com as chuvas e a piora da qualidade da água estaria associada ao escoamento das águas da chuva carreando excretas humanos e de animais e o uso dessa água não tratada aumenta a frequência de diarreias no período chuvoso. No tocante a maior frequência de enteropatógenos nos casos de diarreia aguda, vários estudos relataram que o pico das infecções bacterianas e parasitárias é mais predominante no verão ou durante os meses quentes e o pico das infecções por *Rotavírus* ocorre principalmente durante os meses de outono e inverno (Rodrigues *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2005; Al-Gallas *et al.*, 2007; Jafari *et al.*, 2008; Loulizi *et al.*, 2008).

De acordo com dados do Monitoramento das doenças diarreicas agudas – MDDA, no Brasil durante o período 2000 a 2010 foram notificados 24.921,06 casos de doenças diarreicas agudas. Sendo que em 2008 a estimativa de incidência aumentou na Região Norte e, o Estado do Pará notificou de forma ascendente, nos anos de 2000 a 2008, 977.355 casos de diarreia. Com relação à incidência da DDA por faixa etária, o ano de 2006 apresentou as maiores estimativas: menor de 1 ano (140 por 1000), entre 1 e 4 anos (75 por 1000), entre 5 e 9 anos (24 por 1000) e maior de 10 anos (10 por 1000), (BRASIL, 2010). No presente estudo, os casos de diarreia aguda foram representados na sua grande maioria (49,4%) por crianças menores de 10 anos de idade, estando de

acordo com os dados do MDDA, onde a maior frequência das DDA, ainda continua sendo representada pelas crianças de pouca idade. Em Fortaleza no Estado do Ceará, Façanha & Pinheiro (2005) identificaram em números absolutos, 489.069 casos de diarreia no período de 1996 a 2001, sendo a faixa etária de 1-4 anos a mais acometida, seguida pela menor de um ano de idade.

É importante salientar que as crianças, principalmente as menores de 6 meses de idade, por sua fragilidade biológica, são o grupo mais vulnerável, tanto ao adoecimento por diarreia quanto ao agravamento da doença que determina à hospitalização (Vanderlei *et al.*, 2003).

A frequência dos casos positivos do grupo diarreico (76,6%) (118/154) foi bem maior do que no grupo controle (23,4%) (36/154). Esses resultados confirmam a importância dos patógenos entéricos como importantes agentes da doença diarreica aguda. As infecções causadas por um único enteropatógeno (75,4%) foram superiores quando comparadas com as infecções mistas (24,6%). Achados semelhantes foram encontrados por Prats *et al.* (1997) e Al-Gallas *et al.* (2007), onde a frequência de mono - infecções foi superior às infecções de etiologia mista.

O grande percentual de enteropatógenos identificados nos pacientes com diarreia aguda (76,8%), principalmente em crianças na faixa etária de 1-9 anos de idade, foi similar aos resultados de Souza *et al.* (2002), que encontraram 60 e 80% de enteropatógenos em crianças com diarreia. É importante ressaltar que a maior ocorrência de enteropatógenos, responsável pelos casos da doença diarreica aguda nas crianças atendidas no presente estudo, estava associada com as precárias condições de moradia e de saneamento básico. Segundo Toporovski *et al.* (1999), em áreas

insalubres, os enteropatógenos são identificados nos grupos controles em proporções que variam de 25 a 45%, portanto, superiores à registrada no presente estudo (23,2%).

A amebíase é globalmente disseminada e atinge 20% da população mundial, sendo que a *E. histolytica* é responsável pela terceira causa de morte por doenças parasitárias (Alla & Ravdin, 2002; Paniagua *et al.*, 2007). Neste estudo, *E. histolytica*/*E. dispar* foi o agente mais frequente nos pacientes com diarreia aguda (26%). Os dados de outros estudos mostraram resultados bem superiores ao encontrado no presente trabalho, com uma frequência de 35,4%, 65,7% e 70,3% dos casos de *E. histolytica*/*E. dispar* identificados (Osek *et al.*, 2003; Tinuade *et al.*, 2006 e Paniagua *et al.*, 2007).

Um estudo realizado no Cairo com pacientes de ambulatório de 9 a 60 anos de idade, foi identificada uma forte associação de *E. histolytica* com os episódios de diarreia aguda (57,1%) quando comparados aos controles (21,4%) (Alla & Ravdin, 2002), resultados semelhantes foram observados por Haque *et al.* (2009), em Bangladesh. Segundo Elamreen *et al.* (2008), *E. histolytica*/*E. dispar* foi o segundo enteropatógeno mais comum nos pacientes com diarreia aguda (15%), e estava presente em 18% das crianças com idade escolar em Gaza (Shubair *et al.*, 2000). As infecções por parasitos intestinais é um problema de saúde pública em crianças com idade escolar na Arábia Saudita (Patel & Khandekar, 2006), onde mostram a *E. histolytica*/*E. dispar* como o agente mais prevalente. Estes achados demonstram a importância deste parasita nos casos diarreicos, portanto é fundamental diferenciar *E. histolytica* de *E. dispar* para elucidar a real participação da *E. histolytica* na doença diarreica.

A *Shigella* spp foi o enteropatógeno bacteriano mais frequente no grupo diarreico (15,7%), e nenhum caso foi isolado no grupo controle, mostrando a relevância

deste enteropatógeno nos casos de diarreia aguda na região. Toporovski *et al.* (1999) e Nguyen *et al.* (2006), também não isolaram esta bactéria nos indivíduos do grupo controle e segundo Hien *et al.* (2007), *Shigella* foi a agente bacteriano mais importante associado com a diarreia em Hanoi no Vietnã, além de ser um importante patógeno de diarreia aguda no Irã. Em um estudo realizado em Teherã, *Shigella* spp foi a bactéria patogênica mais frequente (42%) nos pacientes com diarreia aguda, principalmente em crianças com até 14 anos de idade, sendo a *S. flexneri* o agente mais predominante, seguido de *S. sonnei* (Jafari *et al.*, 2008). Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo, bem como por outros autores nacionais e internacionais (Kotloff *et al.*, 1999; Toporovski *et al.*, 1999; Tjaniad *et al.*, 2003; Elamreen *et al.*, 2008). Os pacientes acometidos de shigelose neste estudo, apresentaram diarreia acompanhada de náuseas e vômitos, confirmando a importância desta bactéria nos casos mais severos de diarreia.

A *Giardia lamblia* foi o terceiro agente mais comum nos pacientes com diarreia aguda (13,3%) e o mais frequente nos indivíduos do grupo controle (8%). Segundo Paniagua *et al.* (2007), a *Giardia lamblia* é um protozoário que causa infecções sintomáticas principalmente em crianças menores de 12 anos de idade. Neste trabalho, este agente apresentou uma frequência de 33% no grupo diarreico e 20% nos controles, sendo que nenhum dos indivíduos do grupo controle teve algum sintoma de doença. No trabalho realizado por Vega *et al.* (2000) na cidade do México, a *G. lamblia* foi o protozoário mais frequente (29,9%) nos pacientes.

A *Giardia lamblia* tem sido associada com episódios diarreicos em inquéritos epidemiológicos, apesar de não ser uma importante causa de diarreia em crianças (Schanack *et al.*, 2003). No trabalho desenvolvido por Newman *et al.* (2001), com crianças do nordeste brasileiro, foi constatado não haver diferença significativa na

frequência de *G. lamblia* entre os pacientes com diarreia aguda e controles e que a infecção por este agente foi comum nas crianças enquadradas no grupo controle, tal achado pode explicar a grande ocorrência deste agente, no grupo controle do presente trabalho. No estudo realizado por Shubair *et al.* (2000), a *Giardia lamblia* foi o parasito mais frequentemente detectado em crianças, particularmente na faixa de 6-7 anos de idade, resultado semelhante foi achado neste estudo, onde a maior frequência deste agente estava em crianças de 1-9 anos de idade.

Vários estudos feitos em países desenvolvidos e em desenvolvimento têm mostrado a importância de *Campylobacter* spp como causa bacteriana comum de doença gastrointestinal (Wang *et al.*, 2008). Neste estudo a prevalência de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* nos pacientes com diarreia aguda foi de 4,7% e 1,4% nos controles, sendo mais frequente em crianças menores de 10 anos de idade. Esta proporção ficou bem abaixo quando comparada com outros países em desenvolvimento onde a prevalência de infecção por *Campylobacter* spp ficou bem acima entre crianças com diarreia aguda: Uganda e Zimbábue (9,3%), Egito (9,0%), Kenia (11%) e Tanzânia (18%) (Mshana *et al.*, 2009). Foi reportado por Adekunle *et al.*, (2009), o aparecimento de *Campylobacter* spp em crianças sem diarreia nos países poucos desenvolvidos.

Em geral, a infecção por *Campylobacter* spp nos países em desenvolvimento é alta em crianças menores de 5 anos de idade, quando comparado com as maiores que esta idade, (Puthuchery *et al.*, 1994; Boga *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Adekunle *et al.*, 2009; Mshana *et al.*, 2009). Por outro lado, na maioria dos países desenvolvidos, as infecções por *Campylobacter* spp está

associada com duas faixas de idade, o primeiro em crianças menores de 5 anos de idade e o segundo, em adultos jovens de 15-19 anos (Boga *et al.*, 2004).

Segundo Wang *et al.* (2008), *Campylobacter* spp é frequentemente isolado junto com outros enteropatógenos, nos pacientes com diarreia aguda em países pouco desenvolvidos. No presente estudo, foram detectados 8 casos de coinfeções de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* com outros enteropatógenos, estes achados foram superiores aos encontrados por Wang *et al.* (2008), que identificaram 3 coinfeções de *Campylobacter* spp com outros enteropatógenos.

No presente trabalho, *Campylobacter jejuni* e *C. coli* foram as únicas espécies pesquisadas. Em um estudo realizado no nordeste de Taiwan, *Campylobacter jejuni* e *C. coli* foram as únicas espécies isoladas de espécimes fecais, (95,1% e 4,9% respectivamente). Estes achados assemelharam-se com outros estudos, em que *Campylobacter jejuni* e *C. coli* foram as únicas espécies encontradas com proporções de 85,8% e 76,2% no Iran e 14,2% e 17,2% na França, respectivamente (Yang *et al.*, 2008). Com estes achados pode-se inferir que *C. jejuni* e *C. coli* são as principais espécies envolvidas com os casos de diarreia.

A *Salmonella* foi isolada em apenas um paciente menor de 10 anos de idade com diarreia aguda, não sendo detectada no grupo controle. Segundo Toporovski *et al.* (1999), o isolamento de *Salmonella* spp durante os eventos diarreicos nos estudos latinos americanos tem sido estimado entre 0,5% a 4%, a exemplo do verificado na atual pesquisa e nos trabalhos de Sheikh & Assouli (2001), Souza *et al.*, (2002) e Johargy *et al.* (2010). Por outro lado, estes dados não estão de acordo com Santos *et al.* (2005), onde a *Salmonella* foi o agente mais importante de diarreia aguda em crianças menores de 5 anos de idade em Salvador (Bahia) e nem com Boga *et al.* (2004),

Paniagua *et al.* (2007) e Jafari *et al.* (2008), onde a prevalência de *Salmonella* spp foi alta com 21,1%, 52,6% e 13,8% respectivamente. Também foi constatado uma alta prevalência de *Salmonella* spp nos países desenvolvidos, Estados Unidos (22%) e Itália (18,5%), (Jafari *et al.*, 2008).

No presente trabalho, *Aeromonas hydrophila* foi detectada em um caso diarreico e outro no controle e *A. sobria* num caso diarreico. O papel de *Aeromonas* spp como agente significante da doença diarreica ainda permanece controverso (Albert *et al.*, 1999; Ghenghest *et al.*, 2001; Haque *et al.*, 2003). Estes organismos têm sido epidemiologicamente associado com a diarreia aguda, em crianças e adultos por alguns estudos (Albert *et al.*, 1999; Ghenghest *et al.*, 2001) e a *Aeromonas hydrophila*, vem sendo a espécie mais comumente isolada a partir de águas frescas e águas de rede pública (Ghenghest *et al.*, 2001).

A presença de *Rotavírus* foi verificada em 2,8% (6 casos) dos pacientes diarreicos, sendo 5 casos em crianças menores de 9 anos de idade, um na faixa de 20 a 29 anos, e um no grupo controle (1 a 9 anos). Convém ressaltar que 4 casos de *Rotavírus* ocorreram em crianças abaixo de 5 anos de idade, sendo que duas eram menores de 1 ano. Esta baixa proporção de positividade pode ser explicada pelo pequeno número de amostras de crianças menores de 1 ano de idade (um total de 18 amostras e 9 casos com diarreia), em virtude da introdução da vacina contra o *Rotavírus* em março de 2006, no calendário oficial de vacinação infantil brasileiro.

Em 2006 a Organização Mundial de Saúde (OMS), recomendou a inclusão da vacina contra *Rotavírus* no calendário dos programas de imunização nacional dos países da América e Europa, e em abril de 2009 a OMS estendeu esta recomendação para todas as regiões do mundo (Palma *et al.*, 2010). Vários estudos, em

todo o mundo têm sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar a eficácia desta vacina. Por exemplo, a eficácia da vacina monovalente de *Rotavírus* contra a diarreia aguda severa foi de 83% na Europa, 72% na América Latina, 49% na África do Sul; similarmente, nos Estados Unidos e na Finlândia, a vacina pentavalente preveniu 98% das infecções severas por *Rotavírus* (Palma *et al.*, 2010).

No Brasil e em El Salvador, a eficácia da vacina monovalente contra a diarreia severa foi de 85 e 83% em crianças de 6 a 11 meses, declinando para 69 e 59% em crianças maiores de 12 anos de idade (Correia *et al.*, 2010; Palma *et al.*, 2010). Outro impacto que a vacina trouxe foi a redução das visitas aos departamentos de emergência e das internações por gastroenterite infecciosa que têm associação com o vírus, na faixa etária de menores de 5 anos (Vesikari *et al.*, 2006; Linhares *et al.*, 2008; Palma *et al.*, 2010; Tate *et al.*, 2009).

Em relação às infecções de etiologia mista de bactérias enteropatogênicas, o padrão predominante envolveu 2 agentes potencialmente patogênicos por caso, sendo 31 associações no grupo diarreico e 6 no grupo controle. Situações similares foram observadas por diferentes autores que encontraram maior número de associações no grupo diarreico e o padrão predominante de co-infecção envolveu 2 patógenos (Souza *et al.*, 2002; Boga *et al.*, 2004; Orlandi *et al.*, 2006; Paniagua *et al.*, 2007; Jafari *et al.*, 2008).

As *Escherichia coli* diarreio gênicas são reconhecidas como patógenos de etiologia emergente, como causa de diarreia na infância, especialmente nos países em desenvolvimento, sendo que o significado epidemiológico, de cada um dos tipos de *E. coli* patogênicas na diarreia infantil varia muito com a área geográfica (Nguyen *et al.*, 2006; Paniagua *et al.*, 2007). A proporção de *Escherichia coli* diarreio gênicas isoladas

no grupo diarreico foi 12,8% (maior que a dos outros agentes bacterianos neste grupo), contra 5,7% no grupo controle. Dos 39 patotipos de *E. coli* patogênicas isoladas, 25 estavam presentes em crianças menores de 10 anos de idade. Estes dados são semelhantes aos observados por Sheikh & Assouli (2001), Nguyen *et al.* (2006) e Samal *et al.* (2008).

No estudo conduzido por Al-Gallas *et al.* (2007), as *E. coli* diarreio gênicas foram observadas nas crianças de todas as faixas etárias no grupo diarreico, com tendência ao aumento nas crianças de 6-12 anos de idade e naquelas com 1-2 anos de idade.

Nos pacientes com diarreia aguda, ETEC teve a mais alta frequência, seguido de EAEC e EPEC, no entanto, estes patotipos de *E. coli* não estiveram estatisticamente associadas ao grupo diarreico, corroborando com os achados de Bueris *et al.* (2007), onde a prevalência dos tipos de *E. coli* identificados na Bahia, não foram significativamente diferentes entre os indivíduos do grupo diarreico e controle. Porém estes achados diferiram com a maioria dos estudos, em que a frequência das *E. coli* diarreio gênicas nos pacientes com diarreia aguda é bem superior, comparando-se com os indivíduos sem diarreia (Nguyen *et al.*, 2005; Rappelli *et al.*, 2005; Orlandi *et al.*, 2006; Paniagua *et al.*, 2007; Hien *et al.*, 2007).

No México e em outros países em desenvolvimento, ETEC é a categoria mais prevalente das *E. coli* diarreio gênicas. Esta bactéria é considerada um importante patógeno de diarreia na infância, especialmente durante os primeiros 6 meses de vida, aonde as taxas de isolamento variam de 10 a 30% e também é responsável pela maioria dos episódios de gastroenterites entre os viajantes (Nguyen *et al.*, 2006; Paniagua *et al.*, 2007). Neste estudo, a presença de ETEC no grupo diarreico foi de 7,2% e de 1,2% no

grupo controle. Este achado foi semelhante, ao encontrado por Nguyen *et al.* (2006). Entretanto na maioria dos estudos, a ETEC é fortemente associada com os pacientes do grupo diarréico (Haque *et al.*, 2003; Rappelli *et al.*, 2005; Hien *et al.*, 2007; Paniagua *et al.*, 2007; Al-Gallas *et al.*, 2007).

Dois estudos realizados em crianças com diarréia nas diversas áreas de Salvador (Bahia), a ETEC foi a *E. coli* patogênica mais importante relacionada com diarréia infantil, apresentando uma proporção de 16% e 7,5% dos isolados nestes respectivos estudos. (Tornieporth *et al.*, 1995; Franzolin *et al.*, 2005).

No presente trabalho, foi encontrada uma baixa frequência de *E. coli* enteropatogênica nos pacientes com diarréia aguda (4,0%) e nos controles foi identificada uma proporção de 2,3%. Este resultado foi semelhante ao encontrado por Hien *et al.* (2007), que apesar de EPEC ter sido mais frequente nos casos (2,8%) que nos controles (0,8%), não apresentou associação estatisticamente significativa com a diarréia. Entretanto, estes achados diferiram de vários estudos, que apontam a EPEC como um dos principais enteropatógenos responsável pelos episódios pediátricos de diarréia, especialmente nos países pouco desenvolvidos, onde as condições sanitárias ainda são muito precárias, como as encontradas na região do município de Juruti (Gunzburg *et al.*, 1995; Dulguer *et al.*, 2003; Alikhani *et al.*, 2006; Orlandi *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2006; Paniagua *et al.*, 2007; Ochoa *et al.*, 2008).

A *E. coli* enteropatogênica não é comum nos países desenvolvidos, por apresentarem por exemplo, as melhores condições de saneamento básico. No Estado de São Paulo, a EPEC foi um dos principais agentes patogênicos observados em crianças entretanto, algumas evidências sugerem que esta bactéria não é muito frequente em

áreas rurais e/ou cidades menores (Schnack *et al.*, 2003), o que talvez possa explicar a baixa frequência encontrada no local deste estudo.

Nos indivíduos do grupo controle, a EAEC foi a categoria mais frequente (9,2%), seguido de EPEC, com 2,3%. Estes resultados foram semelhantes ao de Nguyen *et al.* (2006), onde a EAEC foi a bactéria mais frequente nos controles (7,2%), seguido da EPEC (4,4%). A EAEC tem sido cada vez mais reconhecida, como um importante patógeno entérico emergente, amplamente distribuída em todo o mundo (Okeke *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2007); mas alguns trabalhos ainda divergem em associar a EAEC com a diarreia aguda, por outro lado, muitos estudos sugerem uma forte associação desta bactéria com a diarreia persistente (≥ 14 dias), (Albert *et al.*, 1999; Nguyen *et al.*, 2005; Bueris *et al.*, 2007).

A EAEC tem sido reportada como um dos principais agentes etiológicos da diarreia dos viajantes e um dos mais importantes agentes de diarreia nos pacientes imunocomprometidos (Nguyen *et al.*, 2005; Nataro *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007). Na África Subsariana, a EAEC é endêmica entre crianças dentro das comunidades e está significativamente associada com os sintomas da diarreia (Rappelli *et al.*, 2005). Em Baltimore e em New Haven, a EAEC foi implicada como a principal causa bacteriana de diarreia nos pacientes de todas as idades (Nataro *et al.*, 2006). Dentre as *E. coli* patogênicas, a EAEC foi a mais prevalente na Tanzânia, responsável por 14,6% de todos os casos de diarreia em crianças de até 5 anos de idade (Moyo *et al.*, 2007).

Em um estudo realizado no Rio de Janeiro, sobre a frequência das *E. coli* diarreio gênicas isoladas de crianças com e sem diarreia, EAEC foi a categoria mais frequente, contando com 14,6% dos isolados nos pacientes com diarreia aguda e com

11,1% nos controles, sugerindo que a EAEC tem um papel potencial, como um patógeno entérico na comunidade investigada (Mangia *et al.*, 2004).

No presente estudo a *E. coli* enteroinvasora foi isolada em apenas 1 paciente portador de diarreia aguda. Esse dado foi concordante com outros trabalhos da literatura, que estimam, para os países em desenvolvimento, inclusive no Brasil, isolamento desse agente em proporções que variam de 1% a no máximo 7% dos casos (Tornieporth *et al.*, 1995; Toporovski *et al.*, 1999; Franzolin *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2006; Paniagua *et al.*, 2007; Al-Gallas *et al.*, 2007).

Escherichia coli produtora da toxina de Shiga (STEC) é largamente distribuída no mundo, e é uma das bactérias mais estudadas nos Estados Unidos, causando neste país, mais de 73.000 episódios diarreicos todo ano (Paniagua *et al.*, 2007). Não foi detectada em nenhum paciente do grupo diarreico no presente trabalho, porém foi identificada em um paciente do grupo controle, resultados semelhantes foram observados por Toporovski *et al.* (1999) e Paniagua *et al.* (2007). Este patotipo tem sido recentemente descrito como um patógeno emergente em todo o mundo (Paniagua *et al.*, 2007), entretanto no Iran a STEC é uma das mais importantes causas de diarreia, responsável por 44,7% dos isolados diarreicos (Jafari *et al.*, 2008).

No Brasil, infecções por STEC têm sido associadas principalmente aos casos esporádicos de diarreia não sanguinolenta, particularmente em crianças (Guth *et al.*, 2005). Ela é frequentemente detectada nos alimentos e em reservatórios animais no Brasil e em outros países da América Latina, sendo já identificados vários sorotipos em animais, associados com a doença diarreica humana (Irina *et al.*, 2004; Bastos *et al.*, 2006; Bueris *et al.*, 2007).

Neste estudo, as *E. coli* diarreio gênicas estiveram associadas com mais outro potencial patógeno entérico, em 15 situações (10 do grupo diarreico e 5 de controles). Destas, 9 estiveram associadas com parasitos, 5 com *Shigella* spp, 1 com *Campylobacter jejuni/coli* e 1 com *Rotavírus*. Nos trabalhos desenvolvidos por Albert *et al.* (1995) e Bueris *et al.* (2007), encontraram, respectivamente, 19,7% e 32,3% dos pacientes com diarreia colonizados com *E. coli* diarreio gênicas associado a outro enteropatógeno, sendo que estas infecções mistas estiveram estatisticamente associadas ao grupo diarreico, quando comparado com o grupo controle, nesses dois trabalhos citados.

Em relação às toxinas produzidas por ETEC, 5 foram positivas para ST, 4 para LT e ST e 3 para LT. Estes dados diferiram da maioria dos estudos, onde a frequência da ETEC produtora da toxina LT sozinha é superior às variedades das toxinas ST e LT juntas e ST sozinha (Abuxapqui *et al.*, 1994; Jiang *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2005; Franzolin *et al.*, 2005; Rappelli *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2006; Bueris *et al.*, 2007). Segundo Abuxapqui *et al.* (1994) e Albert *et al.* (1999), somente ETEC produtora de ST sozinha e LT e ST juntas, estiveram associadas com diarreia, visto que as ETEC LT positivas foram encontradas com grande frequência nos indivíduos sem diarreia, em várias partes do mundo.

Por muitos anos a EPEC típica (*eae* e *bfpA*) foi considerada a principal causa de diarreia infantil nos países em desenvolvimento, inclusive no Brasil e considerada rara nos países desenvolvidos. Entretanto, dados recentes têm mostrado que a EPEC atípica está sendo mais frequente que a típica, tanto nos países em desenvolvimento, quanto nos desenvolvidos, além de está sendo significativamente associada com a doença diarreica (Aranda *et al.*, 2007; Ochoa *et al.*, 2008).

No presente estudo foi identificado apenas um caso de EPEC típica. A baixa frequência deste patotipo tem sido verificada por outros autores no Brasil (Gomes *et al.*, 2004; Franzolin *et al.*, 2005; Aranda *et al.*, 2007; Bueris *et al.*, 2007) e em outros países (Browne *et al.*, 2004; Rappelli *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2006; Ochoa *et al.*, 2008). Vários fatores podem estar contribuindo para a baixa frequência de EPEC típica, como a melhoria das condições de saneamento básico, melhoria da qualidade da água pública, controle mais eficiente das infecções hospitalares e o incentivo mais frequente do governo, para a adoção do aleitamento materno, pois este ato é altamente protetor contra as infecções intestinais, desde que o leite materno é extremamente rico em anticorpos contra patógenos entéricos.

Em um estudo etiológico de diarreia aguda com crianças menores de 2 anos de idade de diferentes regiões do Brasil, Scaletsky *et al.* (2002) mostraram que as *E. coli* diarreio gênicas têm um papel importante, como causa de doenças entéricas. Entretanto, estes patógenos são provavelmente subestimados, devido aos métodos inapropriados de diagnóstico usados na prática clínica.

A identificação das *E. coli* diarreio gênicas, requer a detecção dos fatores de virulência, que determinam a infectividade e a toxicidade para as células hospedeiras, visto que, as características desses fatores de virulência são suficientes para identificar as 5 categorias patogênicas de *E. coli* - ETEC, EPEC, EIEC, STEC e EAEC (Kimata *et al.*, 2005). Vários trabalhos foram realizados com o uso da PCR multiplex, para a detecção dos vários genes responsáveis pela virulência de amostras de *E. coli* patogênicas (Pass *et al.*, 2000; Saucedo *et al.*, 2003; Toma *et al.*, 2003; Aranda *et al.*, 2004; Vidal *et al.*, 2004; Kimata *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2005; Vidal *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2006). Entretanto, a maioria desses trabalhos requeria mais de um ensaio

de multiplex, para identificar todas as categorias de *E. coli* diarreio gênicas ou apresentaram algumas limita ções na especificidade, resolu ção dos fragmentos amplificados em gel de agarose, amplia ções inespecíficas e dificuldade em diferenciar todos os tipos de *E. coli* patogênicas, devido a similaridade do tamanho dos fragmentos de DNA.

Contudo, Aranda *et al.* (2007), desenvolveram um sistema de multiplex que permitia detectar simultaneamente numa única reação, todas as categorias de *E. coli* diarreio gênicas, excluindo todos os problemas citados anteriormente pelos outros autores. Com base neste estudo, foi realizado o presente trabalho, através da execução do ensaio PCR multiplex que permitiu identificar os genes de virulência das *E. coli* patogênicas, com intuito de fornecer resultados rápidos, confiáveis e com redução de tempo.

No ensaio da PCR multiplex, conseguiu-se amplificar todos os alvos moleculares, porém a amplificação do gene *eae* (maior produto de PCR, com 917 pb), foi dificultada apresentando uma resolu ção fraca do produto amplificado, quando visualizado em gel de agarose. Esta dificuldade de amplificar o alvo *eae* possivelmente esteve relacionada ao fato deste fragmento apresentar o maior produto de PCR, mas talvez também, pelo fato de não ter sido utilizada neste ensaio, uma *Taq* DNA polimerase específica para o desenvolvimento da multiplex. Não foram utilizados adjuvantes de PCR nos ensaios da PCR multiplex, segundo Henegariu *et al.* (1997) a introdução dos mesmos, traz resultados conflitantes nesta variante de PCR.

O presente estudo obteve um grande sucesso durante o desenvolvimento dos ensaios da PCR multiplex, tornando possível a amplificação dos alvos moleculares, sem o aparecimento de amplia ções inespecíficas e sobreposi ções, como observado

nos trabalhos de Aranda *et al.* (2004; 2007). O fato do sistema da PCR multiplex realizado neste trabalho, ter conseguido amplificar todas as categorias patogênicas de *Escherichia coli* foi um grande avanço, no sentido de economia de tempo e menor custo, especialmente por utilizar uma *Taq* DNA polimerase mais barata.

5 CONCLUSÕES

- i. As amostras positivas para enteropatógenos foram estatisticamente associada aos casos de diarreia aguda ($p < 0,0001$), quando comparada com o grupo controle.
- ii. A maior frequência das amostras positivas para enteropatógenos ocorreu na faixa etária de 1-9 anos de idade, e quanto ao sexo, esta frequência foi ligeiramente superior no feminino quando comparada ao sexo masculino.
- iii. Com relação à distribuição temporal das amostras positivas, não houve diferença significativa entre o período chuvoso de coleta (fevereiro) e o período de estiagem (junho e julho).
- iv. Em relação aos casos de diarreia aguda, a grande maioria foi representada por crianças menores de 10 anos de idade e quanto ao sexo, não houve diferença significativa.
- v. A maioria dos casos positivos para enteropatógenos foi representada por infecções por um único enteropatógeno (75,4%).
- vi. Neste trabalho, a *E. histolytica*/*E. díspar* e *Shigella* spp foram encontrados na maioria dos casos diarreicos (26% e 15,7%) e no grupo controle, a *Giardia lamblia* foi o agente mais frequente (8,0%).
- vii. Os enteropatógenos bacterianos foram isolados de 68 pacientes com diarreia aguda (40,2%), sendo representados por 37 casos de infecções por um único enteropatógeno e 31 casos de infecções de etiologia mista.
- viii. A *Shigella* spp foi o único enteropatógeno bacteriano associado aos casos de diarreia aguda ($p = 0,0028$)

- ix. Foi identificada apenas uma amostra positiva para *Salmonella* (*S. Panama*), mostrando a baixa ocorrência desta bactéria nos casos de diarreia aguda em Juruti-PA, inclusive a ausência do sorovar *S. Typhi* (agente da febre tifóide).
- x. Foi observada uma baixa ocorrência de *Rotavírus* (2,8%), nos pacientes com diarreia aguda, a maioria em crianças menores de 9 anos de idade (1,9%).
- xi. Com relação às categorias de *E. coli* diarreio gênicas identificadas, a ETEC (7,2%) foi a categoria mais frequente nos pacientes com diarreia aguda, seguido de EAEC (5,9%). No grupo controle a EAEC (9,2%) foi a mais prevalente.
- xii. Foram detectados neste estudo, 24 casos de monoinfecções por *E. coli* patogênicas e 15 casos de infecções de etiologia mista, sendo a associação de EAEC + parasito (5/15), a mais comum.
- xiii. Das 8 *E. coli* enteropatogênicas (EPEC) identificadas, apenas uma foi caracterizada como EPEC típica.
- xiv. O sistema da PCR multiplex mostrou-se uma ferramenta importante na identificação rápida das categorias de *E. coli* patogênicas, podendo ser utilizado rotineiramente no diagnóstico molecular dessas categorias em substituição da PCR convencional.
- xv. A alta frequência de *E. histolytica/E. díspar* (26%) e de *Giardia lamblia* (13,3%), principalmente entre as crianças com diarreia aguda demonstra um importante problema de saúde pública no município de Juruti.
- xvi. O presente estudo mostra a importância dos enteropatógenos bacterianos, parasitários e de *Rotavírus* nos casos de diarreia aguda no município de Juruti, fornecendo subsídios importantes às medidas de prevenção e controle da doença diarreica na região.

REFERÊNCIAS

- ABUXAPQUI, J.J.F., ITOIL, G.D.J.S, NAVARRETE, M.R.H., PUC-FRANCO, M.A. Frequency of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in infants during the first three months of life. **Archives of Medical Research**, **25**: 303-306, 1994.
- ADEKUNLE, O.C., COKER, A.O., KOLAWOLE, D.O. Incidence, isolation and characterization of *Campylobacter* species in Osogbo. **Biology and Medicine**, **1**: 24-27, 2009.
- AFSET, J.E., BEVANGER, L., ROMUNDSTAD, P., BERGH, K.. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**, **53**: 1137-1144, 2004.
- ALBERT, M.J. Epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection in Bangladesh. **Revista de Microbiologia**, **27**: 17-20, 1996.
- ALBERT, M.J., FARUQUE, S.M., FARUQUE, A.S.G., NEOGI, P.K.B., ANSARUZZAMAN, M., BHUIYAN, N.A., ALAM, K., AKBAR, M.S. Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladesh children. **Journal of Clinical Microbiology**, **33**: 973-977, 1995.
- ALBERT, M.J., FARUQUE, A.S.G., FARUQUE, S.M., SACK, R.B., MAHALANABIS, D. Case-Control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh. **Journal of Clinical Microbiology**, **37**: 3458-3464, 1999.
- AL-GALLAS, N., BAHRI, O., BOURATBEEN, A., HAASEN, A.B., AISSA, R.B. Etiology of acute diarrhea in children and adults in Tunis, Tunisia, with emphasis on Diarrheagenic *Escherichia coli*: prevalence, phenotyping, and molecular

- epidemiology. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **77**: 571-582, 2007.
- ALIKHANI, M.Y., MIRSALEHIAN, A., ASLANI, M.M. Detection of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Iranian children with and without diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**, **55**: 1159-1163, 2006.
- ALLA, A.M.D., RAVDIN, J.I. Diagnosis of amoebic colitis by antigen capture ELISA in patients presenting with acute diarrhea in Cairo, Egypt. **Tropical Medicine and International Health**, **7**: 365-370, 2002.
- ALLAN G., BORGES, C., PINTO, D.G., MARANHÃO, D., HALLA, M., BORBA, M.R., COSTA, R. Fundação Gentúlio Vargas. **Indicadores de Juruti**. Juruti, 2009. 155p.
- AMARAL, L.A., FILHO, A.N., JUNIOR, O.D.R., FERREIRA, A.L.F, BARROS, L.S.S. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. **Revista de Saúde Pública** **37(4)**: 510-514, 2003.
- ANDRADE, J.A.B. DE., OLIVEIRA, J.O.T. DE., NETO, U.F. Letalidade em crianças hospitalizadas com diarreia aguda – fatores de risco associados ao óbito. **Revista da Associação Médica Brasileira** **45**: 121-127, 1999.
- ANGELES, G.R. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli* – Artigo de Revisión. **Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Salud Pública de México**. México, vol. 44, 2002.
- ARANDA, K.R.S., NETO, U.F., SCALETSKY, I.C.A. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, **42**: 5849-5853, 2004.

ARANDA, K.R.S., FABBRICOTTI, S.H., NETO, U.F., SCALETISKY, I.C.A. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. **Federation of European Microbiological Societies, 267:** 145-150, 2007.

ARAÚJO, E., PACHECO, M.A.S.R., BONI, R.F., FONSECA, Y.S.K., GELLI, D.S., FERNANDES, S.A., TAVECHIO, A.T. Surtos alimentares por *Salmonella* Enteritidis associados ao consumo de alimentos à base de ovos, em Sorocaba, SP. **Higiene Alimentar, 9:** 24-26, 1995.

AYRES, M., AYRES, MJ., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: sociedade civil Mamirauá, Brasília CNPq, 2006. 291p.

BADRINATH, P., SUNDKVIST, T., MAHGOUB, H., KENT, R. An outbreak of *Salmonella* Enteritidis phage type 34a infection associated with a Chinese restaurant in Suffolk, United Kingdom. **BioMed Central Public Health, 4:** 1-6, 2004.

BALODA, S.B., KROVACEK, K., ERICSSON, L., LINNE, T., MANSSON, I. Detection of aerolysin gene in *Aeromonas* strains isolated from drinking water, fish, and foods by polymerase chain reaction. **Comparative Immunology and Microbiology Infectious Diseases, 18:** 17-26, 1995.

BARBIERI, E., FALZANO, L., FIORENTINI, C., PIANETTI, A., BAFFONE, W., FABRI, A., MATARRESE, C.A., KATOULI, M., KUHN, I., MOLLBY, R., BRUSCOLINI, F., DONELLI, G. Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine Waters along the

- Italian Adriatic coast. **Applied and Environment Microbiology**, **65**: 2748-2753, 1999.
- BASTOS, F.C., VAZ, T.M.I, IRINO, K., GUTH, B.E.C. Phenotypic characteristics, virulence profile and genetic relatedness of O157 Shiga toxin-producing *Echerichia coli* isolated in Brazil and other Latin American countries. **Federation of European Microbiological Societies**, **265**: 89-97, 2006.
- BERNAL, R. MARTINEZ, L.G., ZEPEDA, B., HERNANDEZ, G., BAER, G.M. Determination of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba díspar* infection by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its clinical correlation in pediatric patients. **Medical Research**, **31**: 55-56, 2000.
- BIFFONE, W., PIANETTI, A., BRUSCOLINI, F., BARBIERI, E., CITTERIO, B. Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products. **International Journal of Food Microbiology**, **54**: 9-18, 2000.
- BISHOP, R.F., DAVIDSON, G.P., HOLMES, I.H., RUCK, B.J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. **The Lancet**, **2**: 1281-1283, 1973.
- BLACK, R.E. Epidemiology of traveler`s diarrhea and relative importance of various pathogens. **Reviews Infection Disease**, **12**: 73-79, 1990.
- BLACK, R.E. Epidemiology of diarrhoeal disease: implications for control by vaccines. **Vaccine**, **11**: 100-105, 1993.
- BOGA, J.N., MELÓN, S. NICIEZA, I., DIEGO, I., VILLAR, M., PARRA, F., OÑA, D.M. Etiology of sporadic cases of pediatric acute gastroenteritis in Asturias,

- Spain, and genotyping and characterization of *Norovirus* strains involved. **Journal of Clinical Microbiology**, **42**: 2668-2674, 2004.
- BRADEN, C.R. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in United States. **Clinical Infectious Diseases**, **43**: 512-517, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Investigação de surto de diarreia aguda com isolamento de *V. cholerae* O1 Ogawa toxigênico no município de São Bento do Una-PE. In: **Boletim Eletrônico Epidemiológico**. Brasília: ano 4, n° 8, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Febre Tifóide. In: **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, 2005a. p. 350-363.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Cólera. In: **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, 2005b. p.187-208.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Surto de Gastroenterite por Rotavírus no Município de Rio Branco - AC. In: **Boletim Eletrônico Epidemiológico**. Brasília: ano 6, n.8, 2006a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Informe técnico. **Doença diarreica por rotavírus: vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humano – VORH**. Brasília: MS, 2006b. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_rotavirus2.pdf. Acesso em 29/03/2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vacina contra o rotavírus entra no calendário oficial do MS. In: **Boletim Eletrônico**. Brasília: n 14 de fevereiro de 2006c. Disponível em: <<http://>

- portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Boletim_3_2006.pdf>. Acesso em 15/04/2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Brasília: MS, 2008a. 372p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Cólera. In: **Guia de bolso: Doenças infecciosas e parasitárias**. Brasília, 2008b. p.79-82.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde para você. Informações para viajantes. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtx=21625>. Acesso em 29/03/2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Diarréicas Agudas**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/vigilancia_doencas_diarreicas_agudas_22_09.pdf>. Acesso em: 09/10/2010.
- BROWNE, R.M.R, BORDUN, A.M., TAUSCHEK, M., WOOD, V.R.B., RUSSELL, J., OPPEDISANO, F., LISTER, N.A., BETTELHEIM, K.A., FAIRLEY, C.K., SINCLAIR, M.I., HELLARD, M.E. *Escherichia coli* and community acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. **Emerging Infectious Diseases**, **10**: 1797-1805, 2004.
- BUERIS, V., SIRCILI, M.P., TADDEI, C.R., SANTOS, M.F.D., 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**, **102**: 839-844, 2007.
- CAETANO, V.C., SALTINI, D.A., PASTERNAK, J. Surto de salmonelose por *Salmonella enterica* em profissionais de saúde, causado por alimentos consumidos em uma festa de ano novo realizada dentro da Unidade de Terapia intensiva. **Einstein**, **2**: 33-35, 2004.
- CALZADA, C.T., NEME, S.N., IRINO, K., KANO, E., DIAS, A.M.G., FERNANDES, S.A., VAZ, T.M.I., PESSOA, G.V.A. Sorotipos de *Salmonella* identificados no período de 1977-1982, no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, **44**: 1-18, 1984.
- CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In: **Microbiologia**. Trabulsi, L.R. & Alterthum, F. (eds). São Paulo, Atheneu, 2004. p. 319-328.
- CAMPOS, L.C. *Shigella*. In: **Microbiologia**. Trabulsi, L.R. & Alterthum, F. (eds). Atheneu, 2005a. p. 311-317.
- CAMPOS, L.C. *Vibrio cholerae*. In: **Microbiologia**. Trabulsi, L.R. & Alterthum, F. (eds). Atheneu, 2005b. p. 337-343.
- CAMPOS, L.C. FRANZOLIN, M.R., TRABULSI, L.R. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **99**: 545-552, 2004.
- CARLI, G.A. **Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas**. Rio de Janeiro, Atheneu, 2001. 906p.
- CARMO, L.S.L., VIEIRA, A.C., REIS, J.D.P., NASCIMENTO, R.S., PEREIRA, M.L., SANTOS, E.J., BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus* and *Salmonella*

- Enteritidis present in food implicated in food poisoning. **Revista de Microbiologia, 27:** 122-125, 1996.
- CAUÁS, R.C., FALBO, A.R., CORREIA, J.DE.B., OLIVEIRA, K.M.M.DE., MONTENEGRO, F.M.U. Diarréia por rotavírus em crianças desnutridas hospitalizadas no Instituto Materno infantil Prof. Fernando Figueira, IMIP. **Revista Brasileira de Saúde Maternal Infantil, 6:** 77-83, 2006.
- CDC. Outbreaks of *Salmonella* serotype Enteritidis infections associated with raw almonds - United States and Canada, 2003-2004. **Morbidity and Mortality Weekly Report, 53:** 484-486, 2004.
- CDC. Rotavirus Surveillance – Worldwide, 2001-2008. **Morbidity and Mortality Weekly Report – MMWR, 57:** 1255-1257, 2008.
- CDC. Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children. **Morbidity and Mortality Weekly Report – MMWR, 58:** 25p. 2009.
- CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (CVE) – PROF. ALEXANDRE VRANJAC. **Manual de Monitorização das Doenças Diarréicas Agudas – MDDA, normas e instruções.** São Paulo, 2008. 59p.
- CESARIO, R.R., NETO, J.T. Prevalência de diarréia na população do distrito docente-assistencial do Tucumã, Rio Branco, estado do Acre, Brasil, em 2003. **Epidemiologia e Serviços de Saúde, 15:** 19-28, 2006.
- CHOPRA, A.K., HOUSTON, C. Enterotoxins in *Aeromonas* – associated gastroenteritis. **Microbes and Infection, 1:** 1129-4625, 1999.
- COLAÇO, W., SILVA FILHO, S.V., RODRIGUES, D.P., HOFER, E. *Vibrio cholerae* O1 em amostras de ambientes aquáticos e de alimentos analisados no Estado de Pernambuco, Brasil. **Caderno de Saúde Pública, 14:** 465-471, 1998.

- CORREIA, J.B., PATEL, M.M., NAKAGOMI, O., MONTENEGRO, F.M.U., GERMANO, E.M., CORREIA, N.B., CUEVAS, L.E., PARASHAR, U.D., CUNLIFFE, N.A., NAKAGOMI, T. Effectiveness of monovalent *Rotavírus* vaccine (Rotarix) against severe diarrhea caused by serotypically unrelated G2P[4] strains in Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, **201**: 363-369, 2010.
- COSTA, M.C.N., MOTA, E.L.A., PAIM, J.S., SILVA, L.M.V., TEXEIRA, M.G., MENDES, C.M.C. Mortalidade infantil no Brasil em períodos recentes de crise econômica. **Revista Saúde Pública**, **37**: 699-706, 2003.
- COSTA, P.S.S., CARDOSO, D.D.P., GRISI, S.J.F.E., SILVA, P.A., FIACCADORI, F., SOUZA, M.B.L.D., SANTOS, R.A.T. Infecções e reinfecções por rotavírus A: genotipagem e implicações vacinais. **Jornal de Pediatria**, **80**: 119-122, 2004.
- COSTALUANGA, S., TONDO, E.C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, **33**: 342-346, 2002.
- CRUMP, J.A., LUBY, S.P., MINTZ, E.D. The global burden of typhoid fever. **Bulletin of the World Health Organization**, **82**: 346-353, 2004.
- DENNEHY, P.H. *Rotavírus* vaccines: an overview. **Clinical Microbiology Reviews**, **21**: 198-208, 2008.
- DIAS, D.M. **Morbimortalidade por enteroinfecções no Estado do Pará**. Monografia (Curso de Especialização em Análises Clínicas – Microbiologia) – Belém, Centro Universitário do Pará, 2007. 40p.
- DULGUER, M.V., FABBRICOTTI, S.H., BANDO, S.Y., FILHO, C.A.M., NETO, U.F., SCALETSKY, I.C.A. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between

- enteroagregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. **The Journal of Infectious Diseases**, **188**: 1685-1694, 2003.
- DU PONT, H.L., FORMAL, S.B., HORNICK, R.B., SNYDER, M.J., LIBONAT, J.P., SHEAHAM, D.G., LABREC, E.H., KALAS, J.P. Pathogenic of *Escherichia coli* diarrhea. **New England Journal of Medicine**, **285**: 1-9, 1971.
- ELAMREEN, F.H.A, ABED, A.A., SHARIF, F.A. Viral, bacterial and parasitic etiology of pediatric diarrhea in Gaza, Palestine. **Medical Principles and Practice**, **17**: 296-301, 2008.
- ELIAS JR, W.P., GOMES, T.A.T. *Escherichia coli* enteroagregativa. In: **Microbiologia**. TRABULSI, L.R. & ALTERTHUM, F. (eds). Atheneu, 2005. p. 289-292.
- EL-SHEIKH, S.M., EL-ASSOULI, S.M. Prevalence of viral, bacterial and parasitic enteropathogens among Young children with acute diarrhoea in Jeddah, Saudi Arabia. **Journal of Health Population, and Nutrition**, **19**: 25-30, 2001.
- EWING, W.H. **Edward and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae**. 4th ed. Elsevier, New York, 1986. 536p.
- FAÇANHA, M.C., PINHEIRO, A.C. Comportamento das doenças diarréicas agudas em serviços de saúde de Fortaleza, Ceará, Brasil, entre 1996 e 2001. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, **21**: 49-54, 2005.
- FAGUNDES, N.U., SCHMITZ, L.G., SACALETSKY, I.C.A. Características clínicas e epidemiológicas da diarréia aguda por *Escherichia coli* enteropatogênica clássica. **Revista da Associação Médica Brasileira**, **41**: 259-265, 1995.

- FASANO, A., NORIEGA, F.R., MANEVAL, D.R.JR. *Shigella* enterotoxin 1: Na enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a active in rabbit small intestine in vivo and in vitro. **Journal of Clinical Investigation**, **95**: 2853-2861, 1995.
- FAGUNDES-NETO, U., SCALETSKY, I.C.A. The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. **Revista Paulista de Medicina**, **118**: 21-29, 2000.
- FERNANDES, S.A., IRINO, K., SILVA, R.M., TAVECHIO, A.T., TRABULSI, L.R. Characterization of lactose-fermenting *Salmonella* Agona strains isolated in a pediatric unit. **Revista de Microbiologia**, **28**: 273-278, 1997.
- FERNANDES, S.A., TAVECHIO, A.T., GHILARDI, A.C.R., DIAS, A.M.G., ALMEIDA, I.A.Z.C., MELO, L.C.V. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, **48**: 179-184, 2006.
- FERNANDEZ, H. Termotolerant *Campylobacter* species associated with human diarrhea in Latin America. **Ciência e Cultura**, **44**: 39-43, 1992.
- FERNANDEZ, H. In: **Microbiologia**. Trabulsi, L.R. & Alterthum, F. (eds). Atheneu, 2005. p. 347-352.
- FERREIRA, E.O., CAMPOS, L.C. *Salmonella* In: **Microbiologia**. Trabulsi, L.R. & Alterthum, F. (eds). São Paulo, Atheneu, 2008. p. 329-338.
- FONTAINE, O., KOSEK, M., BHATNAGAR, S., PINTO, C.B., CHAN, K.Y., DUGGAN, C., MARTINEZ, H., RIBEIRO, H., ROLLINS, N.C., SALAM, M.A., SANTOSHAM, M., SNYDER, J.D., TSAI, A.C., VARGAS, B., RUDAN, I. Setting research priorities to reduce global mortality from childhood diarrhoea by 2015. **Guidelines and Guidance**, **6**: 246-251, 2009.

- FRANZOLIN, M.R. In: **Microbiologia**. Trabulsi, L.R. & Alterthum, F. (eds). Atheneu, 2005. p. 345-346.
- FRANZOLIN, R.M., 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**, **100 (4)**: 359-363, 2005.
- GALLAY, A., BOUSQUET, V., SIRET, V., MAULÉON, V.P., VALK, H.D., VAILLANT, V., SIMON, F., STRAT, Y.L., MÉGRAUD, F., DESENCLOS, J.C. Risk factors for acquiring sporadic *Campylobacter* infection in France: results from a national case-control study. **The Journal of Infectious Diseases**, **197**: 1477-1484, 2008.
- GERMANI, Y., MORILLON, M., BEUGAUD, E., DUBOURDIEU, H., COSTA, R., THEVENON, J. Two-year study of endemic enteric pathogens associated with acute diarrhea in New Caledonia. **Journal of Medical Microbiology**, **32**: 1532-1536, 1994.
- GHENGHESH, K.S., GHODBAN, A.E., DKAKNI, R., ABEID, S., ALTOMI, A., TARHUNI, A., MARIALIGETI, K. Prevalence, species differentiation, haemolytic activity, and antibiotic susceptibility of Aeromonads in untreated well water. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **96**: 169-173, 2001.
- GIBOTTI, A., TANAKA, T.L., OLIVEIRA, V.R., TADDEI, C.R., MARTINEZ, M.B. Molecular characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* *ipa* genes by PCR-RFLP Analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, **35**: 74-80, 2004.
- GOMES, D.K.M., LUCENA, M.C., BARROS, M.G. Perfil epidemiológico e coproparasitológico de crianças menores de 5 anos internadas no hospital

- Governador João Alves Filho em Aracajú-SE, com quadro de diarreia aguda. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, **37**: 257-259, 2005.
- 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.F. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, **164**: 331-337, 1991.
- GOMES, T.A.T., GRIFFIN, P.M., IVEY, C., TRABULSI, L.R., RAMOS, S.R.T.S. EPEC infection in São Paulo. **Revista de Microbiologia**, **27**: 25-33, 1996.
- GOMES, T.A.T., IRINO, K., GIRÃO, D.M., GIRÃO, V.B.C., GUTH, B.E.C., VAZ, T.M.I., MOREIRA, F.C., CHINARELLI, S.H. VIEIRA, M.A.M. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Emerging Infectious Diseases**, **10**: 1851-1855, 2004.
- GORDILLO, M.E., REEVE, G.R., PAPPAS, J., MATHEWSON, J.J., DUPONT, H.L., MURRAY, B.E. Molecular characterization of strains of enteroinvasive *Escherichia coli* O143, including isolates from a large outbreak in Houston, Texas. **Journal of Clinical Microbiology**, **30**: 889-893, 1992.
- GRÀCIA, N.T. **Estudio epidemiológico de los brotes de gastroenteritis aguda de etiología vírica em Cataluña**. Tese (Doutorado em Medicina Del Departamento de Salut Pública) – Barcelona, Universitat de Barcelona, 2008. 187p.
- GRIMES, K.A., MOHAMED, J.A., DUPONT, H.L., PADDA, R.S., JIANG, Z.D., FLORES, J., GERSON, J.B., SANDOVAL, F.G.M., OKHUYSEN, P.C. PCR-based assay using occult blood detection cards for detection of diarrheagenic *Escherichia coli* in specimens from U.S. travelers to Mexico with acute diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, **46**: 2227-2230, 2008.

GRIMONT, P.A.D., GRIMONT, F., BOUVET, P. Taxonomy of the Genus *Salmonella*.

In: ***Salmonella in Domestic Animals***. Wray, C. & Wray, A. (eds). New York – USA, CAB International, 2000. p. 1-17.

GUIMARÃES, Z.A., COSTA, M.C.N., PAIM, J.S., SILVA, L.M.V. Declínio e desigualdades sociais na mortalidade infantil por diarreia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 34**: 473-478, 2001.

GUNZBURG, S.T., TORNIÉPORTH, N.G., RILLEY, L.W. Identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-Based Detection of the Bundle-Forming Pilus Gene. **Journal of Clinical Microbiology, 33**: 1375-1277, 1995.

GUTH, B.E.C., GOMES, T.A.T., VAZ, T.M.I., IRINO, K. Inability to decarboxylate lysine as a presumptive marker to identify Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of serogroup O111. **Journal of Clinical Microbiology, 41**: 3450p. 2003.

HAQUE, R., MONDAL, D., KIRKPATRICK, B.D., AKTHER, S., FARR, B.M., SACK, R.B., PETRI, W.A. Epidemiologic and clinical characteristics of acute diarrhea with emphasis on *Entamoeba histolytica* infections in preschool children in an urban slum of Dhaka, Bangladesh. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 69(4)**: 398-405, 2003.

HAQUE, R. Human Intestinal Parasites. **International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Bangladesh, 25**: 387-391, 2007.

HAQUE, R., MONDAL, D., KARIM, A., MOLLA, I.H., RAHIM, A., FARUQUE, A.S.G., AHMAD, N., KIRKPATRICK, B.D., HOUP, E., SNIDER, C., JUNIOR, W.A.P. Prospective case-control study of the association between common enteric protozoal parasites and diarrhea in Bangladesh. **Clinical Infectious Disease, 48 (9)**: 1191-1197, 2009.

- HENEGARIU, O., HEEREMA, N.A., DLOUHY, S.R., VANCE, G.H. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. **Bio Techniques**, **23**: 504-511, 1997.
- HERVIO-HEATH, D., COLWELL, R.R., DERRIEN, A., ROBERT-PILLOT, A., FOURNIER, J.M., POMMEPUY, M. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. **Journal Applied Microbiology**, **92**: 1123-1135, 2002.
- HIEN, B.T.T., SCHEUTZ, F., CAM, P.D., SERICHANTALERGS, O., HUONG, T.T., THU, T.M., DALSGAARD, A. Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains isolated from children in a Hospital Case-Control Study in Hanoi, Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, **46**: 996-1004, 2007.
- HOFER, E. Considerações sobre a frequência de sorotipos de *Salmonella* na cidade do Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, **72**: 63-72, 1974.
- HOFER, E., ZAMORA, M.R.N., LOPES, A.E., MOURA, A.M.C., ARAÚJO, H.L., LEITE, J.D.D., LEITE, M.D.D., SILVA, F.S.J. Sorovares de *Salmonella* em carne de equinos abatidos no nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, **20**: 80-84, 2000.
- HOLFINGER, C., KARCH, H., SCHMIDT, H. Structure and function of plasmid pColD157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 and its distribution among strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, **36**: 24-29, 1998.
- HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T. Bergey's **Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore, Williams & Wilkins, 1994. 787p.

- HUANG, D.B., MOHANTY, A., DUPONT, H.L., OKHUYSEN, P.C., CHIANG, T. A.
Review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*.
Journal of Medical Microbiology, **55**: 1303-1311, 2006.
- HUANG, D.B., MOHAMED, J.A., NATARO, J.P., DUPONT, H.L., JIANG, Z.D.,
OKHUYSEN, P.C. Virulence characteristics and the molecular epidemiology of
enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from travelers to developing countries.
Journal of Medical Microbiology, **56**: 1386-1392, 2007.
- HUMPHREY, T. Public-health aspects of *Salmonella* infection. In: ***Salmonella in
Domestic animals***. Wray, C. & Wray, A. (eds). CABI Publishing, New York,
USA, 2000. p. 245-263.
- IRINO, K., KATO, M.A.M.F., VAZ, T.M.I., RAMOS, I.I., SOUZA, M.A.C., CRUZ,
A.S., GOMES, T.A.T., VIEIRA, M.A.M., GUTH, B.E.C. Serotypes and virulence
markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy
cattle in São Paulo state, Brazil. **Veterinary Microbiology**, **105**: 29-36, 2004.
- ITOH, Y., NAGANO, I., KUNISHIMA, M., EZARI, T. Laboratory investigation of
enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable: H10 associated a massive
outbreak of gastrointestinal illness. **Journal of Clinical Microbiology**, **35**: 2546-
2550, 1997.
- JAFARI, F., SHOKRZADEH, L., HAMIDIAN, M., AHRABI, S.S., ZALI, M.R. Acute
diarrhea due to enteropathogenic bacteria in patients at hospitals in Tehran.
Journal of Infectious Diseases, **61**: 269-273, 2008.
- JIANG, Z.D., MATHEWSON, J.J., ERICSSON, C.D., SVENNERHOLM, A.M.,
PULIDO, C., DUPONT, H.L. Characterization of Enterotoxigenic *Escherichia coli*

- strains in patients with travelers diarrhea acquired in Guadalajara, Mexico, 1992-1997. **The Journal of Infectious Diseases**, **181**: 779-782, 2000.
- JOHARGY, A., GHAZI, H., MUMENAH, A. Frequency of viral, bacterial and parasitic enteropathogens among young children with acute diarrhea in Saudi Arabia. **Journal Pakistan Medical Association**, **60**: 456-459, 2010.
- JURUTI. Prefeitura Municipal de Juruti - Secretaria Municipal de Saúde. **Plano Municipal de Saúde**. Juruti, 2005/2008. 40p.
- JURUTI. Governo do Estado do Pará - Secretaria Executiva de Estado de Planejamento, Orçamento e Finanças (SEPOF). **Estatística Municipal de Juruti**. Juruti, 2007. 46p.
- KAUFFMANN, F. **Enterobacteriaceae**. 2th ed. Copenhagen, Munksgaard, 1954. 382p.
- KAKU, M., PERESI, J.T.M., TAVECHIO, A.T., FERNANDES, S.A., BATISTA, A.B., CASTANHEIRA, I.A.Z., GARCIA, G.M.P., IRINO, K., GELLI, D.S. Surto alimentar por *Salmonella* Enteritidis no Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, **29**: 127-131, 1995.
- KETLEY, J.M. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. **Microbiology**, **143**: 5-21, 1997.
- KIMATA, K., SHIMA, T., SHIMIZU, M., TANAKA, D., ISOBE, J., GYOBU, Y., WATAHIKI, M., NEGAI, Y. Rapid categorization of pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. **Microbiology and Immunology**, **49**: 485-492, 2005.
- KNUTTON, S., COLLINGTON, G.K., BALDWIN, I.J., HAIGH, R.D., WILLAMS, P.H. Cellular responses to EPEC infection. **Revista de Microbiologia**, **27**: 89-94, 1996.

- KONEMAN, E.W., JR, W.C.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., PROCOP, G.W., SCHRECKENBERGER, P.C., WOODS, G.L. **Diagnóstico Microbiológico**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008. 1565p.
- KOSEK, M., BERN, C., GUERRANT, R.L. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bulletin of the World Health Organization, 81**: 197-204, 2003.
- 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, 77**: 651-666, 1999.
- KROVACEK, K., PASQUALE, V., BALODA, S.B., SOPRANO, V., CONTE, M., DUMONTET, S. Comparison of putative virulence factors in *Aeromonas hydrophila* strain isolated from the marine Environment and Human diarrheal cases in Southern Italy. **Applied and Environment Microbiology, 60**: 1379-1382, 1994.
- KUIJPER, E.J., BOLL, P., PEETERS, M.F., STEIGERWALT, A.G., ZANEN, H.C., BRENNER, D.J. Clinical and epidemiologic aspects of members of *Aeromonas* DNA hybridization groups isolated from human feces. **Journal of Clinical Microbiology, 27**: 1531-1537, 1989.
- LAHIRI, A., AGARWAL, R.K., SANYAL, S.C. Biological similarity of enterotoxins of *Vibrio cholera* serotypes other than type 1 to cholera toxin and Escherichia coli heat-labile enterotoxin. **Journal Medicine Microbiology, 15**: 429-440, 1982.
- LEAL, N.C., SÁ, A.T., SOLARI,C.A., SILVA, S.J., HOFER, E. Sorotipos de *Salmonella* isolados de processos entéricos humanos em Recife – Pernambuco,

- durante o triênio 1978-1980. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, **82**: 43-49, 1987.
- LE MINOR, L. & POPOFF, M.Y. Designation of *Salmonella enterica* sp.nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*: request for an opinion. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **37**: 465-468, 1987.
- LENCH, S.A. Growth, survival and pathogenicity of enteric campylobacters. **Reviews in Medical Microbiology**, **8**: 113-124, 1997.
- LEVINE, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. **Journal of Infectious Diseases**, **155**: 377-385, 1987.
- LEVINE, M.M., FERRECCIO, C., PRADO, V., CAYAZZO, M., ABREGO, P., MARTINEZ, J., MAGGI, L., BALDINI, M.M., MARTIN, W., MANEVAL, D. Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level Peri-urban community in Santiago, Chile. **American Journal of Epidemiology**, **138**: 849-866, 1993.
- LEVINE, W.C., GRIFFIN, P.M. Vibrio infections on Gulf Coast: results of first year of regional surveillance. Gulf Coast Vibrio Working Group. **Journal Infectious Diseases**, **167**: 479-483, 1993.
- LINHARES, A.C. Rotavírus infection in Brazil: epidemiology, immunity, and potencial vaccination. **Brazil Journal Infectious Diseases** **1**: 284-293, 1997.
- LINHARES, A.C., PINHEIRO, F.P., SCHMETZ, C., MÜLLER, G., PETERS, D. Duovírus (*Rotavírus*) em Belém, Pará (nota prévia). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **19**: 278-279, 1977.

LINHARES, A.C. Epidemiologia das infecções por *Rotavírus* no Brasil e os desafios para o seu controle. **Caderno de Saúde Pública**, **16**: 629-646, 2000.

LINHARES, A.C., VELÁZQUEZ, F.R., SCHAEEL, I.P, LLORENS, X.S., ABATE, H., ESPINOSA, F., LÓPEZ, P., PARRA, M.M., BARRÍA, E.O., MEDINA, D.M.R., RIVERA, L., RUZ, N.P., NUÑEZ, E., SILVIA, D., PALACIOS, G.M.R., VOS, B.D., O'RYAN, M., GILLARD, P., BOUCKENOOGHE, Efficacy and safety of an oral live attenuated human *Rotavírus* vaccine against *Rotavírus* gastroenteritis during the first 2 years of life in Latin American infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. **The Lancet**, **371**: 1181-1189, 2008.

LINS, Z.C. Studies on enteric bacteria in the lower Amazon region: I. Serotypes of *Salmonella* isolated from wild forest animals in Pará State, Brazil. **Trasactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **64**: 439-443, 1970.

LINS, Z.C. Studies on enteric bacteria in the lower Amazon region: II. *Salmonella* types isolated from wild reptiles in Pará State, Brazil. **Revista de Microbiologia**, **2**: 165-169, 1971.

LÓPEZ, E.L., PRAD-JIMÉNEZ, V., ÓRYAN-GALLARDO, M., CONTRINI, M.M. *Shigella* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* causing bloody diarrhea in Latin America. **Infections Disease Clinics of Norty America**, **14**: 41-65, 2000.

LOULIZI, K.S., KHÉLIFI, H.G., ROUGEMONT, A. DE., CHOUCANE, S., SAKLY, N., BALAY, K.A., HASSINE, M., GUÉDICHE, M.N., AOUNI, M., POTHIER, P. Acute infantile gastroenteritis associated with human enteric viruses in Tunisia. **Journal of Clinical Microbiology**, **46**: 1349-1355, 2008.

- LOUREIRO, E.C.B. Ocorrência do gênero *Salmonella* em animais silvestres da ordem Edentata, na Região Amazônica, norte do Estado do Pará, Brasil. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, **27**: 31-34, 1985.
- LOUREIRO, E.C.B. **Contribuição ao estudo bacteriológico de *Salmoella* oriundas de diferentes fontes da região Amazônica brasileira**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – São Paulo, Universidade de São Paulo, 1990, 102 p.
- LOUREIRO, E.C.B., MARQUES, N.D.B., RAMOS, F.L.P., REIS, E.M.F., RODRIGUES, D.P., HOFER, E. Sorovares de *Salmonella* de origem humana identificados no Estado do Pará, Brasil, no período de 1991 a 2008. **Revista Pan – Amazônica de Saúde**, **1**: 93-100, 2010.
- MACDONELL, M.T., SINGLETON, F.L., HOOD, M.A. Dilluent composition for use API 20E in characterization marine and estuariane bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, **44**: 423-427, 1982.
- MANGIA, R., DUARTE, A.N., DUARTE, R., SILVA, L.A., BRAVO, L.R., LEAL, M.C. Etiology of acute diarrhea in hospitalized children in Rio de Janeiro city, Brazil. **Journal of Tropical Pediatrics**, **39**: 365-367, 1993.
- MANGIA, A.H.R., GUTH, B.C., ANDRADE, J.R.C., IRINO, K., PACHECO, A.B.F., FERREIRA, L.C.S., ZAHNER, V., TEXEIRA, L.M. Genotypic and phenotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains isolated in Rio de Janeiro city, Brazil. **Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology**, **40**: 155-162, 2004.
- MANGINI, A.C.S., DIAS, R., GRISI, S.J.F.E., ESCOBAR, A.M.U., TORRES, D.M.A.G.V., ZUBA, I.P.R. Parasitismo por *Cryptosporidium* sp em crianças com diarréia aguda. **Revista Paulista de Medicina**, **34**: 341-345, 1992.

- MÁRQUEZ, A.P.I., DÁVILA, C.M.L., KU-PECK, P.P., SEGOVIA, P.T. Calidad sanitaria de los suministros de água para consumo humano em Campeche. **Salud Pública de México**, **36**: 655-661, 1994.
- 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 Riberão Preto-SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **34**: 21-24, 2001.
- MELO, M.C.N.DE., TADDEI, J.A.DE.A.C., SANTOS, D.R.D., MAY, D.S., CARNEIRO, N.B., SILVA, L.R. Incidence of diarrhea: poor parental recall ability. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, **11**: 571-574, 2007.
- MENEZES, A.M.B., VICTORA, C.G., BARROS, F.C., ALBERNAZ, E., MENEZES, F.S., JANNKE, H.A., ALVES, C., ROCHA, C. Mortalidade infantil em duas coortes de base populacional no Sul do Brasil: tendências e diferenciais. **Caderno de Saúde Pública**, **12**: 79-86, 1996.
- MERINO, S., RUBIRES, X., KNOCHER, S., TOMÁS, J.M. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **International of Journal Food Microbiology**, **28**: 157-168, 1995.
- MORABITO, S., KARCH, H., KURKDJIAN, P.M., SCHMIDT, H., MINELLI, F., BIGEN, E., CAPRIOLI, A. Enteroaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111: H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, **36**: 840-842, 1998.
- MOTTA, M.E.F.A., SILVA, G.A.P. Diarréia por parasitas. **Revista Brasileira Saúde Materno Infantil**, **2**: 117-127, 2002.

- MOTA, C.C.S., VIEIRA, H.R.A., PUZYNA, I.P., KALACHE, J., KONOLSAISEN, J.F., CAMARGO, N.J. Toxi-infecção alimentar por *Salmonella* Enteritidis – relato de um surto ocorrido em Curitiba-PR, Brasil, 1981. **Higiene Alimentar**, **2**: 123-131, 1983.
- MOYO, S., MASELLE, S.Y, MATEE, M.I., LANGELAND, N., MYLVAGANAM, H. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from infants and children in Dar es Salaam, Tanzania. **BioMed Central Infectious Diseases**, **7**: 1-7, 2007.
- MSHANA, S.E., JOLOBA, M., KAKOOZA, A., MULINDWA, K.D. *Campylobacter* spp among children with acute diarrhea attending Mulago hospital in Kampala - Uganda. **African Health Sciences**, **9**: 201- 205, 2009.
- MÜLLER, D., HAGEDORN, P., BRAST, S., HEUSIPP, G., BIELASZEWSKA, M., FRIEDRICH, A.W., KARCH, H., SCHMIDT, M.A. Rapid identification and differentiation of clinical isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), atypical EPEC, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by a one-step multiplex PCR method. **Journal of Clinical Microbiology**, **44**: 2626-2629, 2006.
- MWEU, E., ENGLISH, M. Typhoid Fever in Children in Africa. **Tropical Medicine & International Health**, **13(4)**: 532-540, 2009.
- NATARO, J.P., KAPER, J.B., BROWNE, R.R., PRADO, V., VIAL, P., LEVINE, M.M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatric Infection Disease Journal**, **6**: 829-831, 1987.
- NATARO, J.P., KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, **11**: 142-201, 1998.
- NATARO, J.P., MAI, V., JOHNSON, J., BLACKWELDER, W.C., HEIMER, R., TIRRELL, S., EDBERG, S.C., BRADEN, C.R., MORRIS Jr, J.G., HIRSHON,

- J.M. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. **Clinical Infectious Diseases**, **43**: 402-407, 2006.
- NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. São Paulo, Atheneu, 2007. 494p.
- NEWMAN, R.D., MOORE, S.R., LIMA, A.A.M., NATARO, J.P., GUERRANT, R.L., SEARS, C.L. A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in north-east Brazilian children. **Tropical Medicine and International Health**, **6**: 624-634, 2001.
- NGUYEN, T.V., VAN, P.L., HUY, C.L., GIA, K.N., WEINTRAUB, A. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, **43**: 755-760, 2005.
- NGUYEN, T.V., VAN, P.L., HUY, C.L., GIA, K.N., WEINTRAUB, A. Etiology and epidemiology of diarrhea in children in Hanoi, Vietnam. **International Journal of Infectious Diseases**, **10**: 298-308, 2006.
- NOJIMOTO, I.T.T., BEZANA, C.S.C., CARMO, C., VALADÃO, L.M., CARRIJO, K.M. Prevalência de *Aeromonas* spp em fezes diarréicas de crianças menores de 5 anos de idade na cidade de Goiânia, Goiás, no Biênio 1995-1996. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **30**: 385-388, 1997.
- NOKES, D.J., ABWAO, J., PAMBA, A., PEENZE, I., DEWAR, J., MAGHENDA, J.K., GATAKAA, H., BAUNI, E., SCOTT, A.G., MAITLAND, K., WILLIAMS, T.N. Incidence and clinical characteristics of group A rotavirus infections among children admitted to hospital in Kilifi, Kenya. **Plos Medicine**, **5**: 1154-1162, 2008.
- OCHOA, T.J., BARLETTA, F., CONTRERAS, C., MERCADO, E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **National Institutes of Health**, **102**: 852-856, 2008.

- OKASAKI, M., MIRANDA, P., NETO, J., DIEGUES, V., ALVES, J. Parasitological and serological studies on amebiasis and other intestinal parasitic infections in Recife and its suburban areas, Northeast, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo, 30:** 312-321, 1988.
- OKEKE, I.N., OJO, O., LAMIKANRA, A., KAPER, J.B. Etiology of acute diarrhea in adults in Southwestern Nigeria. **Journal of Clinical Microbiology, 41:** 4525-4530, 2003.
- OLESEN, B., NEIMANN, J., BÖTTIGER, B., ETHELBERG, S., SCHIELLERUP, P., JENSEN, C., HELMS, M., SCHEUTZ, F., OLSEN, K.E.P., KROGFELT, K., PETERSEN, E., MOLBALK, K., SMIDT, P.G. Etiology of diarrhea in Young children in Denmark: a case-control study. **Journal of Clinical Microbiology, 43:** 3636-3641, 2005.
- OLIVEIRA, C.S., LINHARES, A.C. Rotavírus: aspectos clínicos e prevenção. **Jornal de Pediatria, 75:** 91-102, 1999.
- OLIVEIRA, T.C.R., LATORRE, M.R.D.O. Tendências da internação e da mortalidade infantil por diarreia: 1995 a 2005. **Revista de Saúde Pública, 44:** 102-111, 2010.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Saúde nas Américas: 2007.** Washington, OPAS, 2007, 61p.
- ORLANDI, P.P., MAGALHÃES, G.F., MATOS, N.B., SILVA, T., PENATTI, M., NOGUEIRA, P.A., SILVA, L.H.P.DA. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho, Rondonia, Western Amazon region, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 39:** 507-517, 2006.
- ORLANDI, P.P., SILVA, T., MAGALHÃES, G.F., ALVES, F., CUNHA, R.P.A., DURLACHER, R., SILVA, L.H.P. Enteropathogens associated with diarrheal

- disease in infants of poor urban áreas of Porto Velho, Rondônia: a Preliminary Study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **96**: 621-625, 2001.
- OSEK, J. Development of a multiplex PCR approach for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. **Journal of Applied Microbiology**, **95**: 1217-1225, 2003.
- PALMA, O.D., CRUZ, L., RAMOS, H., BAIREZ, A.D., VILLATORO, N., PASTOR, D., OLIVEIRA, L.H.D., KERIN, T., BOWEN, M., GENTSCH, J., ESPOSITO, D.H., PARASHAR, U., TATE, J., PATEL, M. Effectiveness of *Rotavírus* vaccination against childhood diarrhea in El Salvador: case-control study. **British Medical Journal**, **341**: 1-7, 2010.
- PANIAGUA, G.L., MONROY, E., GONZÁLEZ, O.G., ALONSO, J., NEGRETE, E., VACA, S. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, **6**: 17, 2007.
- PARVEEN, S., ISLAN, M.S., HUQ, A. Abundance of *Aeromonas* sp in river and lake waters in and around Dhaka, Bangladesh. **Journal Diarrhoeal Diseases**, **13**: 183-186, 1995.
- PASS, M.A, ODEDRA, R., BATT, R.M. Multiplex PCRs for Identification *Escherichia coli* Virulence Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, **38**: 2001-2004, 2000.
- PATEL, P.K., KHANDEKAR, R. Intestinal parasitic infections among school children of the Dhahira Region of Oman. **Saudi Journal Medicine**, **27 (5)**: 627-632, 2006.
- PELAVO, J.S., SARIDAKIS, H.O. Sorotipos de *Salmonella* isolados de produtos cárneos em Londrina – Paraná. **Revista de Microbiologia**, **19**: 17-21, 1988.
- PEREIRA, M.D., ATWILL, E.R., BARBOSA, A.P., SILVA, S.A., GARCIA-ZAPATA, M.T. Intrafamiliar and extrafamiliar risk factors associated with

- Cryptosporidium parvum* infection among children. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, **66**: 787-793, 2002.
- PERESI, J.T.M., ALMEIDA, I.A.Z.C., LIMA, S.I., MARQUES, D.F., RODRIGUES, E.C.A., FERNANDES, S.A., GELLI, D.S., IRINO, K. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causadas por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**, **32**: 477-483, 1998.
- PETRI, W.A.JR., MILLER, M., BINDER, H.J., LEVINE, M.M., DILLINGHAM, R., GUERRANTE, R.L. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. **The Journal of Clinical Investigation**, **118**: 1277-1290, 2008.
- PINTO, C.B., VELEBIT, L., SHIBUYA, K. Estimating child mortality due to diarrhea in developing countries. **Bulletin of the World Health Organization**, **86**: 710-717, 2008.
- PODEWILS, L.J., MINTZ, E.D., NATARO, J.P., PARASHAR, U.D. Acute, infections diarrhea among children in developing countries. **Pediatric Infectious Diseases**, Elsevier Inc. 155-167, 2004.
- POLIS, M.A., TUAZON, C.U., ALLING, D.W., TALMANIS, E. Transmission of *Giardia lamblia* from a day care center to the community. **American Journal of Public Health**, **76**: 1142-1144, 1986.
- POPOVIC-URIIOC, T. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* diarrhea in rural and urban population in Yugoslavia. **Epidemiology and Infection**, **102**: 50-67, 1989.
- PRATS, G., LLOVET, T., MUÑOZ, C., SOLÉ, R., MIRELIS, B., IZQUIERDO, C., RODRIGUEZ, P., SABANÉS, M.E., RABELLA, N., PERICAS, R., SÁNCHEZ, F., MARGALL, N., NAVARRO, F., COLL, P. Etiology of enteritis in a university

- general hospital in Barcelona. **Clinical Microbiology and Infection**, **15 (7)**: 349-356, 1997.
- PUTHUCHEARY, S.D., PARASAKTHI, N., LIEW, S.T., CHEE, Y.W. *Campylobacter* enteritis in children: clinical and laboratory findings in 137 cases. **Singapore Medical Journal**, **35(5)**: 453-456, 1994.
- RAMOS, F.L. **Febre tifóide: a experiência do Instituto Evandro Chagas. Dissertação** (Mestrado em Doenças Tropicais) – Belém, Universidade Federal do Pará, 2005. 71 p.
- RAPPELLI, P., FOLGOSA, E., SOLINAS, M.L., DACOSTA, J.L., PISANU, C., SIDAT, M., MELO, J., CAPPUCINELLI, P., COLOMBO, M.M. Pathogenic enteric *Escherichia coli* in children with and without diarrhea in Maputo, Mozambique. **Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology**, **43**: 67-72, 2005.
- REDE INTERAGENCIAL DE INFORMAÇÃO PARA A SAÚDE (RIPSA). **Indicadores básicos para a saúde no Brasil: conceitos e aplicações**. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2008. 349p.
- REEVES, M.W., EVINS, G.M., HEIBA, A.A., PLIKAYTIS, B.D., FARMER, J.J. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other *Salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, **27**: 313-320, 1989.
- RILEY, L.W., REMIS, R.S., HELGERSON, S.D., MCGEE, H.B., WELLS, J.G., DAVIS, R.J. HELBERT, R.J., OLCOTT, E.S., JOHNSON, L.M., HARGRETT, N.T., BLAKE, P.A., COHEN, M.L. Hemorrhagic colitis associated with a rare

- Escherichia coli* serotype. **The New England Journal of Medicine**, **308**: 681-685, 1983.
- RIVAS, M., ESTANI, S.S., RANGEL, J., CALETTI, M.G., VALLÉS, P., ROLDÁN, C.D., BALBI, L., MOLLAR, M.C.M.D., AMOEDO, D., MILIWEBSKY, E., CHINEN, I., HOEKSTRA, R.M., MEAD, P., GRIFFIN, P.M. Risk factors for sporadic Shiga Toxin- producing *Escherichia coli* infections in children, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, **14**: 763-771, 2008.
- RODRIGUES, J., ACOSTA, V.C., CANDEIAS, J.M.G., SOUZA, L.O., FILHO, F.J.C. Prevalence of diarrheogenic *Escherichia coli* and rotavirus among children from Bocatú, São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **35**: 1311-1318, 2002.
- SACK, R.B., GORBACH, S.L., BANWELL, J.G., JACOBS, B., CHATTERJEE, B.D., MITRA, R.C. Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with severe cholera-like disease. **Journal of Infectious Diseases**, **123**: 378-385, 1971.
- SAMAL, S.K., KHUNTIA, S.H.K., NANDA, P.K., SATAPATHY, C.S., NAYAK, N.R., SARANGI, A.K., SAHOO, N., PATTNAIK, S.K., CHHOTRAY, G.P., PAL, B.B. Incidence of bacterial enteropathogens among hospitalized diarrhea patients from Orissa, India. **Journal Infectious Diseases**, **61**: 350-355, 2008.
- SANSONETTI, P.J., MOUNIER, J. Metabolic events mediating early killing of host cells infected by *Shigella flexneri*. **Microbial Pathogenesis**, **3**: 53-61, 1987.
- SANTOS, S.M., KUPEK, E. Serial outbreaks of foodborne disease in Blumenau, Brazil, caused by *Salmonella* Enteritidis. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, **4**: 275-278, 2000.

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

SAUCEDO, C.L., CERNA, J.F., SEPULVEDA, N.V., THOMPSON, R., VELAZQUEZ, F.R., TORRES, J., TARR, P.I., GARCÍA, T.E. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, **9**: 127-130, 2003.

SCALETISKY, I.C.A., FABBRICOTTI, S.H., CARVALHO, R.L.B., NUNES, C.R., MARANHÃO, H.S., MORAIS, M.B., NETO, U.F. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea young children in Northeast Brazil: a case-control study. **Journal of Clinical Microbiology**, **40**: 645-648, 2001.

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

SCHNACK, F.J., FONTANA, L.M., BARBOSA, P.R., SILVA, L.S.M., BAILLARGEON, C.M.M., BARICHELLO, T., PÓVOA, M.M., CAVASINI, C.E., MACHADO, R.L.D. Enteropatógenos associados com diarréia infantil (< 5 anos de idade) em amostra da população da área metropolitana de Criciúma, Santa Catarina, Brasil. **Caderno de Saúde Pública do Rio de Janeiro**, **19**: 1205-1208, 2003.

SHUBAIR, M.E., YASSIN, M.M., AL-HINDI, A.I., AL-WAHAIDI, A.A., JADALLAH, S.Y., AL-D, A.S.N. Intestinal parasites in relation to hemoglobin

- level and nutritional status of school children in Gaza. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, **30**: 365-375, 2000.
- SILVA, G.A.P. Diarréia aguda: fatores de risco e manejo. **Revista de Pediatria do Ceará**, **3**: 5-9, 2002.
- SINGH, D.V., SANYAL, S.C. Enterotoxicity of clinical and environmental isolated of *Aeromonas* spp. **Journal Medicine Microbiology**, **36**: 269-272, 1992.
- SMITH, H.R., SCOTLAND, S.M., CHEASTY, T., WILLSHAW, G.A., ROWE, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* infections in United Kingdom. **Revista de Microbiologia**, **27**: 45-49, 1996.
- SOUZA, E.C., MARTINEZ, M.B., TADDEI, C.R., MUKAI, L., GILIO, A.E., RACZ, M.L., SILVA, L., EJZENBERG, B., OKAY, Y. Perfil etiológico das diarreias agudas de crianças atendidas em São Paulo. **Jornal de Pediatria**, **77**: 31-38, 2002.
- STARNBACH, M.N., FALKOW, S., TOMPKINS, L.S. Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hibridization. **Journal of Clinical Microbiology**, **27**: 1257-1261, 1989.
- STEPHAN, R., SCHUMACHER, S. Resistance patterns of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from animals, food and asymptomatic human carriers in Switzerland. **Letters in Applied Microbiology**, **32**: 114-117, 2001.
- TAKAYANAGUI, O.M., OLIVEIRA, C.D., BERGAMINI, A.M.M., CAPUANO, D.M., OKINO, M.H.T., FEBRÔNIO, L.H.P., CASTRO, A.M.C., OLIVEIRA, M.A., RIBEIRO, E.G.A., TAKAYANAGUI, A.M.M. Fiscalização de verduras comercializadas no município de Ribeirão Preto – SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **34**: 37-41, 2001.

- TATE, J.E., CURNS, A.T, CORTESE, M.M., WEINTRAUB, E.S., HAMBIDGE, S., ZANGWILL, K.M., PATEL, M.M., BAGGS, J.M., PARASHAR, U.D. Burden of acute gastroenteritis hospitalizations and emergency department visits in US children that is potentially preventable by *Rotavirus* vaccination: a probe study using the now-withdrawn Rotashield vaccine. **American Academy of Pediatrics, 123:** 744-749, 2009.
- TAYLOR, D.N., ECHEVERRIA, O., SETHABUTR, O., PITARANGI, C., LEKSOMBOON, N.R., BLACKLOW, B., GROSS, R., GROSS, J. Clinical and microbiologic features of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infections detected by DNA hybridization. **Journal of Clinical Microbiology, 26:** 1362-1366, 1988.
- TENG, L.J., HSUEH, P.R., LIAW, S.T., HO, S.W., TSAI, J.C. Genetic detection of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with sporadic diarrhea. **Journal of Microbiology and Immunology Infections, 37:** 327-334, 2004.
- TINUADE, O., JOHN, O., SAHEED, O., OYEKU, O., FIDELIS, N., OLABISI, D. Parasitic etiology of childhood diarrhea. **Indian Journal of Pediatrics, 73:** 1081-1084, 2006.
- TJANIADI, P.A., LESMANA, M., SUBEKTI, D., MACHPUD, N., KOMALARINI, S., SANTOSO, W., SIMANJUNTAK, C.H., PUNJABI, N., CAMPBELL, J.R., ALEXANDER, W.K., BEECHAM, H.J., CORWIN, A.L., OYOFO, B.A. Antimicrobial resistance pathogens associated with diarrheal patients in Indonesia. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 68:** 666-670, 2003.
- TOMA, C., LU, Y., HIGA, N., NAKASONE, N., CHINEN, I., BASCHKIER, A., RIVAS, M., IWANAGA, M. Multiplex PCR assay for identification of human

- diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, **41**: 2669-2671, 2003.
- TOPOROVSKI, M.S., MÍMICA, I.M., CHIEFF, 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 grupo controle. **Journal of Pediatric**, **75**: 97-104, 1999.
- TORNIEPORTH, N.G., JOYLENE, J., SALGADO, K., JESUS, P., LATHAM, E., MELO, M.C.N.M., GUNZBURG, S.T., RILEY, L.W. Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, **33**: 1371-1374, 1995.
- TRABULSI, L.R., CAMPOS, L.C., LORENÇO, R. Salmoneloses. In: **Tratado de Infectologia**. Veronesi, R. & Focaccia, R. (eds). São Paulo, Atheneu, 2002. p. 878-885.
- TRABULSI, L.R., ORDOÑEZ, J.G. *Escherichia coli* enteropatogênica. In: **Microbiologia**. Trabulsi, L.R. & Alterthum, F. (eds). Atheneu, 2005. p. 277-283.
- UGRINOVICH, L.A., DE ÁVILA, F.A., OLIVEIRA, M.N., CASTRO, A.F.P. Identificação dos genes que codificam para a enterotoxina termolábil/ LT-II em amostras de *Escherichia coli* de bezerros com diarréia na região de Jaboticabal, SP, Brasil. **Ciência Rural**, **32**: 289-291, 2002.
- VANDERLEI, L.C.M., SILVA, G.A.P., BRAGA, J.U. Fatores de risco para internamento por diarréia aguda em menores de dois anos: estudo de caso-controle. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, **19**: 455-463, 2003.
- VAZ, T.M.I., IRINO, K., KATO, M.A.M.F., DIAS, Â.M.G., GOMES, T.A.T., MEDEIROS, M.I.C., ROCHA, M.M.M., GUTH, B.E.C. Virulence properties and

- characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, **42**: 903-905, 2003.
- VEGA, J.T.S., ZAVALA, J.T., GUERRERO, L.R., CABELLO, R.R., SÁNCHEZ, D.R., GARCÍA, C.R. Frecuencia de parasitosis intestinales em asentamientos humanos irregulares. **Revista de la Facultad de Medicina UNAM**, **43**: 80-83, 2000.
- VESIKARI, T., MATSON, D.O., DENNEHY, P., DAMME, P.V., SANTOSHAM, M., RODRIGUEZ, Z., DALLAS, M.J., HEYSE, J.F., GOVEIA, M.G., BLACK, S.B., SHINEFIELD, H.R., CHRISTIE, C.D.C., YLÍTALO, S., ITZLER, R.F., COIA, M.L., ONORATO, M.T., ADEYI, B.A., MARSHALL, G.S., GOTHEFORS, L., CAMPENS, D., KARVONEN, A., WATT, J.P., O'BRIEN, K.L., DINUBILE, M.J., CLARK, H.F., BOSLEGO, J.W., OFFIT, P.A., HEATON, P.M. Safety and Efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant *Rotavirus* vaccine. **The New England Journal of Medicine**, **354**: 23-22, 2006.
- VIDAL, M., KRUGER, E., DURÁN, C., LAGOS, R., LEVINE, M., PRADO, V., TORO, C., VIDAL, R. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diagnosis of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. **Journal of Clinical Microbiology**, **43**: 5362-5365, 2005.
- VIDAL, R., VIDAL, M., LAGOS, R., LEVINE, M., PRADO, V. Multiplex PCR diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, **42**: 1787-1789, 2004.
- WANG, S.C., CHANG, L.Y., HSUEH, P.R., LU, C.Y., LEE, P.I., SHAO, P.L., HSIEH, Y.C., YEN, F.P., LEE, C.Y., HUANG, L.M. *Campylobacter* enteritis in children in

- northern Taiwan – a 7 year experience. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, **41**: 408-413, 2008.
- WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **Journal of Medical Microbiology**, **56**: 4-8, 2007.
- WONGSTITWILAIROONG, B., SRIJAN, A., SERICHANTALERGS, O., FUKUDA, C., MCDANIEL,P., BODHIDATTA, L., MASON, C.J. Intestinal parasitic infections among pre-school children in Sangkhlaburi, Thailand. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, **76**: 345-350, 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Child Health Epidemiology Reference Group, First Meeting**, La Mainaz Gex, France, WHO Meeting Repot: 1-23, 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done**. Geneva, WHO, 2009, 60p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diarrhoeal Diseases. Disponível em: <http://www.who.int/vaccine_research/diseases/diarrhoeal/en/index4.html>. Acesso em 10/10/2010.
- YAMAMOTO, T., ECHEVERRIA, P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. **American Society for Microbiology**, **64**: 1441-1445, 1996.
- YANG, J.R., WU, H.S., CHIANG, C. S., MU, J.J. Pediatric campylobacteriosis in northern Taiwan from 2003 to 2005. **Bio Med Central Infections Diseases**, **8**: 1-8, 2008.

ZHENG, J., KEYS, C.E., ZHAO, S., MENG, J., BROWN, E.W. Enhanced subtyping scheme for *Salmonella* Enteritidis. **Emerging Infections Diseases**, **13**: 1932-1935, 2007.