

Valéria Cristina de Melo Lopes

**ESTUDO DA FREQUÊNCIA DE AGENTES
ENTEROPATOGÊNICOS NAS INFECÇÕES DIARRÉICAS
AGUDAS EM MENORES DE CINCO ANOS ANALISADAS
NO LACEN ALAGOAS**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2010

Valéria Cristina de Melo Lopes

**ESTUDO DA FREQUÊNCIA DE AGENTES
ENTEROPATOGÊNICO NAS INFECÇÕES DIARREICAS
AGUDAS EM MENORES DE CINCO ANOS ANALISADAS
NO LACEN ALAGOAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências pelo programa de pós-graduação em Saúde Coletiva.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Guiomar Silva Lopes

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Ramos

São Paulo
2010

Lopes, Valéria Cristina de Melo,
Estudo da frequência de agentes enteropatogênicos nas infecções diarréicas agudas em menores de cinco anos analisadas no Lacen Alagoas / Valéria Cristina de Melo Lopes. – São Paulo, 2010.

xv, f

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva.

Título em Inglês: Study of the frequency of intestinal pathogens in infections acute diarrhea in children under five years analyzed in Lacen Alagoas.

1. (Agentes enteropatogênicos). 2. (Diarréia infantil). 3. (Frequência). 4. (Infecções diarréicas).

Universidade Federal de São Paulo
Departamento de Medicina Preventiva
Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva

Chefe do departamento: Prof. Dr. Luiz Roberto Ramos

Coordenador do curso de Mestrado: Prof. Dr. Luiz Roberto Ramos

Valéria Cristina de Melo Lopes

**ESTUDO DA FREQUÊNCIA DE AGENTES
ENTEROPATOGÊNICOS NAS INFECÇÕES DIARREICAS
AGUDAS EM MENORES DE CINCO ANOS ANALISADAS NO
LACEN ALAGOAS**

Presidente da banca: Prof. Dra. Guiomar Silva Lopes

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Maria Lúcia de Moraes Bourroul

Prof. Ms. Alessandra Vaz Fernandes Fiuza Teles

Prof. Dr. Manoel Carlos Sampaio de Almeida Ribeiro

Prof. Ms. Vanessa Rosa Noal

Dedicatória

Ao meu marido, Geraldo, companheiro, amor da minha vida, pela compreensão, amor, carinho e incentivo constante durante todas as etapas deste estudo, não medindo esforços na condução do nosso lar quando a minha ausência se fazia necessária. Obrigada, meu Amor. Amo-te.

Aos meus queridos filhos, Patrícia e Victor, partes fundamentais da minha vida e do meu sucesso, pelos constantes incentivos, apoio, convivência amorosa e sincera que nos fazem crescer juntos, buscando um mesmo ideal, compreendendo a minha ausência, sempre presentes nos momentos desta importante etapa em nossas vidas. Amo vocês.

Aos Meus Pais, por todo o amor, preocupação, orações, dedicação e presença constante neste e em todos os momentos da minha vida, que acreditaram e me ensinaram a lutar para alcançar todos os objetivos almejados. Obrigada, "Painho" e "Mainha", por terem sido peças fundamentais para que eu tenha me tornado a pessoa que hoje sou. Amo vocês eternamente.

A minha querida irmã e amiga Vivi, pelo amor, carinho e admiração, pelo constante incentivo, e principalmente, por acreditar no meu sucesso. Obrigada por existir em nossas vidas. Amo você.

Aos meus irmãos, Ricardo, Gustavo e Marcelo, pelo amor, respeito e admiração, pois, mesmo à distância, estiveram na minha torcida. Amo todos vocês.

A minha querida amiga, Vaneska, companheira em todas as horas e momentos, nas alegrias e tristezas, na saúde e na doença, pela contribuição inestimável para a elaboração deste trabalho, grande incentivadora, que me transmitiu conhecimentos valiosos, contribuindo extraordinariamente desde o início, dirijo um agradecimento especial pelo amor, acolhimento, dedicação, generosidade, prontidão e interesse demonstrado. Agradeço, principalmente, pela confiança depositada no meu trabalho de dissertação e por acreditar no meu sucesso. Obrigada por tudo. Amo você.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por tudo na minha vida, por ter conseguido superar todos os obstáculos e dificuldades para realização deste sonho, pois, sem Ele, nada seria possível e não estaríamos aqui reunidos, desfrutando, juntos, destes momentos que nos são tão importantes. Obrigada, Senhor!

A minha orientadora, Prof^a Dra. Guiomar Silva Lopes, meus sinceros agradecimentos, pelos ensinamentos repassados na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luíz Roberto Ramos, Chefe de departamento de Medicina Preventiva e Coordenador do curso de Mestrado em Saúde Coletiva, por ter contribuído para uma primeira reflexão sobre o tema aqui tratado.

A Fernanda, Priscila e Luciana, (Indaiá, Poroca e Maroca), minhas filhas postizas de São Paulo, pelo incentivo, cooperação e apoio, durante a realização deste trabalho, pois, além de terem me acolhido durante todo o curso, compartilharam comigo os momentos de tristezas e também de alegrias, nesta etapa que, com a graça de Deus, está sendo vencida. Amo vocês: “A pessoa é para o que nasce”.

As minhas queridas “meninas”, Tiziane, Samara e Emanuelle, pelo amor, amizade, motivação e constante incentivo, durante todas as fases nesta caminhada, conduzindo a coordenação do curso, quando a minha ausência se fazia necessária, a Samarita, “a pequena notável”, amiga e companheira constante, em todos os momentos, um especial agradecimento.

Ao meu querido genro, Nal, pelo carinho, ajuda nos problemas com o computador, e pela disponibilidade.

A Desterro, pela amizade e contribuição na execução deste trabalho e por todos os momentos que compartilhamos juntas para a realização do nosso ideal, o Mestrado.

Ao Prof. Jairo Calado, pela importante assessoria na análise estatísticas dos dados.

A Sandra Fagundes, secretária do departamento de Medicina Preventiva da UNIFESP, pela atenção e gentileza com que sempre me atendeu.

Agradecimento especial à Secretaria de Estado da Saúde de Alagoas, pelo apoio, e a todos que fazem o LACEN/AL.

Ao Prof. Dr. Mauro Guilherme, diretor da FCBS/CESMAC, o qual me concedeu liberação, para me dedicar à finalização deste trabalho.

A todos que fazem parte da família, FCBS/CESMAC, em especial a Waléria Dantas, Ana Lúcia, Renata, Andréa Aragão, Fabiana, Anelise, Lucélia, Celinha, Roberta, Jeferson, Ana Lydia, Vanessa, Vitor, Leonardo, Fabiano, Giulliano, Yaskara, Daniela e Micheline, por colaborarem direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Enfim, a todos que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho, meu sincero agradecimento.

Sumário

DEDICATÓRIA	vi
AGRADECIMENTOS	vii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3 REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1. Aspectos Epidemiológicos	5
3.1.1 Frequência do rotavírus no Brasil	7
3.2 Características dos rotavírus	10
3.2.1 Diagnóstico Laboratorial	13
3.2.2 Controle e prevenção	15
3.2.3 Vacinas contra rotavírus	15
3.3 Etiologia das doenças diarreicas no Brasil	16
4 MÉTODOS	19
4.1 Delineamento do estudo	19
4.2 Casuística	19
4.2.1 Amostra	19
4.2.2 Critérios de Inclusão	20
4.2.3 Critérios de Exclusão	20
4.3 Procedimentos	20

4.3.1 Coleta, transporte e processamento das amostras fecais	20
4.3.2 Exame bacteriológico.....	20
4.3.2.1 Meios de cultivo, reagentes e soluções empregados no isolamento, enriquecimento e identificação de bactérias	22
4.3.2.1.2 Meio de enriquecimento utilizado no cultivo da <i>Salmonella</i>	22
4.3.2.1.3 Meios de cultivo utilizados para isolamento bacteriano	22
4.3.2.1.4 Meios de cultivo utilizados para identificação bioquímica de bactérias	23
4.3.2.2 Isolamento e identificação de bactérias enteropatogênicas.....	24
4.3.2.2.1 Isolamento de colônias bacterianas.....	24
4.3.2.2.2 Seleção e identificação de colônias bacterianas suspeitas de serem enteropatogênicas	24
4.3.3 Exame Viroológico.....	29
4.3.3.1 Identificação dos Rotavírus.....	29
4.4 Análise Estatística	32
5 RESULTADOS.....	33
5.1 Gênero.....	33
5.2 Faixa Etária.....	33
5.3 Número de casos de diarreia aguda e a presença do Rotavírus, conforme o período de coleta das amostras (mês/ano).....	34
5.4 Sintomas associados à doença diarreica aguda e a presença do RVs.....	35
5.5 Pesquisa de enteropatógenos.....	37
5.6 Vacinação	38
6 DISCUSSÃO	39
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
8 REFERÊNCIAS.....	46

Lista de Figuras

Figura 1	Procedimentos técnicos para a coleta e processamento das amostras fecais	21
Figura 2	Mostra fluxograma das principais etapas para o isolamento e caracterização dos principais enteropatógenos bacterianos	28
Figura 3	Fluxograma do procedimento do teste para identificação do Rotavírus (ELISA)	31

Lista de tabelas

Tabela 1	Frequência de diarreia aguda por faixa etária.....	34
Tabela 2	Distribuição do número de amostras de fezes, dos casos de diarreia aguda e a frequência do RVs, de acordo com os meses do ano	35
Tabela 3	Frequência dos sintomas associados à diarreia aguda nas 179 amostras de fezes	36
Tabela 4	Frequência dos sintomas associados à diarreia aguda por faixa etária	36
Tabela 5	Positividade do isolamento de enterobactérias e Rotavírus nas amostras de fezes de crianças com diarreia aguda	37
Tabela 6	Enterobactérias mais frequentes.....	37
Tabela 7	Frequência de vacinação	38

Lista de abreviaturas e símbolos

CMI	Coeficiente de Mortalidade Infantil
DAEC	<i>Escherichia coli</i> com adesão difusa
<i>E. coli.</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EGPA	Eletroforese em gel de poliacrilamida
EIE	Ensaio imunoenzimático
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
IME	Imuno microscopia eletrônica
LAT	Aglutinação em látex
LACEN/AL	Laboratório Central de Alagoas
MDDA	Monitorização das doenças diarreicas agudas
ME	Microscopia eletrônica
PNI	Programa Nacional de Imunização
OMS	Organização Mundial da Saúde
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase, antecedida de transcrição reversa
RVs	Rotavirus
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora da Toxina Shiga

Resumo

A doença diarréica aguda constitui um sério problema de saúde pública em crianças, sendo uma das principais causas de morbimortalidade infantil, constituindo um sério problema de saúde pública. Essa constatação conduz este trabalho de pesquisa.

Objetivo: Avaliar a frequência dos agentes enteropatogênicos nas doenças diarréicas agudas a partir da análise das amostras fecais de menores de cinco anos, recebidas no Lacen Alagoas, no período de 2007 a 2009. **Métodos:** Trata-se de um estudo de delineamento transversal descritivo com 179 amostras de fezes *in natura*, de crianças na faixa etária de zero a cinco anos, de ambos os gêneros, sendo 110 (61,5%) do gênero masculino. A média de idade constatada foi de 19,79 meses ($dp=\pm 15,84$), sendo o valor mínimo 0,13 meses, e o máximo de 60 meses. Foi utilizada análise descritiva. Foi utilizada análise descritiva. **Resultados:** Foram identificados enteropatógenos em 54 (30,1%) das amostras. Rotavírus foi encontrado em 35 (19,6%) e as bactérias enteropatogênicas, 19 (10,6%). A *E. coli* enteropatogênica foi isolada em 14 (73,7%), *Salmonella sp* 2 (10,5%) e *Shigella flexneri* 3 (15,8%). Foi observado que em duas amostras foram detectados bactérias e rotavírus. **Conclusões:** Dos enteropatógenos encontrados, o rotavírus foi o mais predominante. A maior frequência ocorreu na faixa etária entre 0-24 meses (42%). A *E.coli* enteropatogênica foi a bactéria mais frequentemente isolada nas amostras fecais.

Abstrat

Acute diarrheal disease is a serious public health problem in children, and a major cause of infant morbidity and mortality, constituting a serious public health problem. This observation leads this research. **Objective:** Evaluate the frequency of intestinal pathogens in acute diarrheal diseases through the analysis of fecal samples of children under five years, received Lacen in Alagoas, in the period 2007 to 2009. **Methods:** This is a cross-sectional descriptive study of 179 fresh stool samples of children aged zero to five years, of both genders, where among the included 110 (61.5%) were male. The mean age was of 19.79 months (SD = \pm 15.84), with minimum of 0.13 months and a maximum of 60 months. Were analyzed using descriptive. **Results:** Enteropathogens were identified in 54 (30.1%) samples. Rotavirus was detected in 35 (19.6%) and bacteria, 19 (10.6%). *E.coli* enteropathogenic was isolated in 14 (73.7%), Salmonella sp 2 (10.5%) and Shigella flexneri 3 (15.8%). It was observed that two samples were detected rotavirus and bacteria. **Conclusions:** Of the pathogens found, rotavirus was the most predominant. The most frequently occurred between the ages of 0-24 months (42%). Enteropathogenic *E. coli* was the most frequent bacterium in fecal samples.

Keywords: enteropathogenic agents, Frequency, infant diarrhea, diarrheal infections.

1. INTRODUÇÃO

A doença diarréica aguda constitui um sério problema de saúde pública, em todo o mundo (Schnack e col, 2003; Orlandi, 2006), tendo sido comprovado como uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil, principalmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (Cáceres e col, 2006; Sartori e col., 2008), em virtude de acometer 2,5 milhões (18%) dos óbitos em crianças na faixa etária de zero a cinco anos (Glass e col., 2006; Gutierrez e col., 2006).

Embora muitos enteropatógenos estejam envolvidos nas infecções diarreicas a etiologia tem apresentado, nos últimos anos, alterações nas variedades de microrganismos identificados, variando a incidência de seus achados conforme a região e população estudadas. Dados epidemiológicos mostram que a etiologia das doenças diarreicas, é bastante diversificada, podendo ser causadas por uma grande variedade de microrganismos como, vírus, bactérias e parasitas (Glass e col., 2006; Gutierrez e col., 2006).

No Brasil, embora existam limitações do sistema de informações, nos últimos anos, há registros de que mais de 600 mil internações por ano ocorrem devido à doença infecciosa intestinal, causando quase 8 mil mortes, o que representa uma perda econômica significativa para o país e um importante prejuízo à saúde da população (Brasil, 2008).

Apesar de todos os avanços alcançados na prevenção e controle das doenças infecciosas, as doenças diarréicas agudas persistem como um dos principais problemas de saúde pública, além de um grande desafio às autoridades sanitárias (Cauás e col., 2006; Linhares, 2000).

Em 2004, foram notificados, pelo sistema de vigilância da MDDA ao Ministério da Saúde, 2.395.485 episódios diarreicos, destes, 813.830 foram em crianças menores de um ano, distribuídos por região de procedência, concentrando no nordeste o maior número de casos (Ministério da Saúde, 2006).

Em 2006, no Estado de Alagoas, 53% dos casos de infecções diarreicas agudas ocorreram em menores de cinco anos, com 11% de óbitos em menores de um ano de idade (Secretaria de Estado da Saúde de Alagoas, 2006).

Dados informados pela Secretaria Estadual de Saúde, através do Programa de Imunização Nacional (PNI), em Alagoas, mostram que a cobertura vacinal contra rotavírus em menores de 1 ano de idade foi de 31,61% (2006), 67,56% (2007), 68,18% e 75% (2009).

De acordo com a Secretaria da Saúde de Alagoas, em 2008 os dados da Morbidade Hospitalar do SUS foram registradas 14.175 internações por diarreia e gastroenterite de origem infecciosa, 2.726 (19%), em menores de 1 ano, destes 25 (1%) foram a óbito, no mesmo ano, foi registrado no SIAB um total de 34 óbitos por diarreia em menores de 1 ano. Comparando com 2007 onde ocorreram 68 óbitos, verificando-se uma redução de 50%.

O coeficiente de mortalidade infantil por diarreia (CMID) no Estado de Alagoas atingiu a taxa de 1,9/1000 nascidos vivos no ano de 2007, e em 2008 1,5/1000, índices considerados elevados, segundo dados do SIAB a Taxa de Mortalidade Infantil (TMI) foi de 24% em 2007 e 20,9% em 2008 (Secretaria da Saúde de Alagoas, 2008).

O programa da Monitorização das Doenças Diarréicas (MDDA) consta de um processo sistemático, capaz de detectar precocemente os casos, para conferir agilidade na tomada de decisão.

Nessa perspectiva, o protocolo exige em primeira instância a identificação e notificação dos casos com coleta oportuna de amostras para exames, instituição de tratamento imediato, conforme as características da diarreia e presença ou não de desidratação, com sua respectiva classificação. Com o objetivo de definir a fonte de infecção e interromper a cadeia de transmissão, deve-se proceder a investigação e busca ativa dos casos e contatos e desencadear as medidas gerais de controle, as quais consistem em orientação sobre a qualidade da água, destino adequado de lixo e dejetos, controle de vetores, higiene pessoal e alimentar e educação em saúde (Brasil, 2008).

A despeito da magnitude dos casos de doenças diarréicas agudas, em Alagoas, Nordeste do Brasil, região onde apresenta altos índices de morbimortalidade fez-se necessário a realização e divulgação deste estudo, o qual objetivou avaliar a frequência dos agentes enteropatogênicos nas doenças

diarréicas agudas a partir da análise das amostras fecais de menores de cinco anos, recebidas no Lacen Alagoas, no período de 2007 a 2009.

O conhecimento sobre a etiologia e direcionamento dos casos colaborará para a redução da letalidade infantil por diarreia; implementação de protocolo para melhorar o atendimento clínico; e a vigilância das doenças diarréicas de diversos centros urbanos brasileiros e nas diferentes regiões do país.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a frequência dos agentes enteropatogênicos nas doenças diarreicas agudas a partir da análise das amostras fecais de menores de cinco anos, recebidas no Lacen Alagoas, no período de 2007 a 2009.

2.2 Objetivos Específicos

- Descrever a presença de agentes enteropatogênicos B com as variáveis (gênero, faixa etária, e distribuição sazonal) das infecções diarreicas;
- Identificar as bactérias enteropatogênicas mais frequentes nas infecções diarreicas agudas em menores de cinco anos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Aspectos epidemiológicos

As diarreias são responsáveis por 2,5 milhões (18%) dos óbitos em crianças na faixa etária de zero a cinco anos (Bryce e col., 2005; Glass e col., 2006; Gutierrez e col., 2006).

Dados epidemiológicos mostram que as doenças diarreicas, na maioria das vezes, são de natureza infecciosa, podendo ser causadas por uma grande variedade de microrganismos (Schmitz e col., 1992; Almeida e col., 1998; Bryce e col., 2005; Glass e col., 2006; Gutierrez e col., 2006).

Embora muitos enteropatógenos estejam envolvidos nas infecções diarreicas, a etiologia dessas doenças tem apresentado, nos últimos anos, alterações nas variedades de microrganismos identificados, variando a incidência de seus achados conforme a região e população estudadas por isso se observam a prevalência dos vírus nos países desenvolvidos do globo (Caprioli e col. 1996; Glass e Kilgore, 1997; Richardson e col, 1998; Barlow e col., 1999; Souza e col., 2002); enquanto as bactérias têm um relevante papel em países em desenvolvimento, onde as condições sanitárias são menos favoráveis (Ogunsanya e col., 1994; Caprioli e col. Brunser e col., 1997; Richardson, 1996; Gracey, 1996; Notario e col., 1996; e col., 1998; Barlow e col., 1999; Souza e col, 2002).

Destaca-se o papel fundamental dos rotavírus como um dos mais importantes agentes etiológicos de infecções diarreicas agudas em crianças em todo o mundo, constituindo uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil (Candeias e col, 1978; Baldacci e col, 1979; Andrade e col, 1999; Linhares, 2000; Kapikian e col., 2001; Schnack e col., 2003; Costa e col, 2004a; Cáceres e col, 2006; Gutierrez e col., 2006; Orlandi, 2006; Fischer e col., 2007; Perez-Schael e col., 2007; Sartori e col., 2008).

Estima-se, contudo que, nos países em desenvolvimento, a ocorrência das gastroenterites associadas ao rotavírus determine cerca de 600.000 a 870.000 mortes a cada ano, refletindo 20 a 25% no total de óbitos por doenças diarreicas, e 6% da

mortalidade global entre crianças com idades inferiores a cinco anos (De Soysa e Feachem, 1985, Linhares, 2000).

Os rotavírus são responsáveis por, em média, 111 milhões dos casos de diarreia aguda, 2,4 milhões de hospitalizações e 600 mil mortes em todo o mundo, sendo que cerca de 80% ocorrem nos países em desenvolvimento (Bryce e col., 2005; Parashar e col., 2006). Até nos países desenvolvidos, onde predominam condições de higiene e saneamento satisfatórios, os RVs estão presentes nos casos de epidemias, constituindo um sério problema de saúde pública, porém com um número limitado de mortes (Glass, 2006; Glass e Parashar, 2006; Bernstein, 2009).

Nas regiões dos países que fazem parte da Comunidade Europeia, estima-se que 56,2% das hospitalizações e 32,8% das emergências por gastroenterites agudas acontecem em crianças menores de cinco anos. A prevalência de doenças diarreicas agudas infantis por rotavírus foi de 29%, cerca de 40% atribuídas ao RVS, equivalendo a 75.000 hospitalizações por ano. O índice de mortalidade por esse vírus, nessas regiões varia de uma até três mortes/milhão de crianças nessa faixa etária. Anualmente, são estimados de US\$ 1,7 a US\$ 1,8 milhões com custos nas hospitalizações. (Soriano-Gabarro e col., 2006; Fischer e col., 2007; Kavaliotis e col., 2008) (Forest e col., 2009).

Nos Estados Unidos, anualmente, são registradas cerca de 500.000 visitas à emergência de clínicas e hospitais e 55.000 hospitalizações. O impacto das diarreias por rotavírus na economia desse país está avaliado em torno de US\$1 bilhão (Bresee e col., 2004).

Atualmente, dados epidemiológicos, mostram que o número de hospitalizações decorrentes de diarreias atribuídas aos RVs continua em escala crescente. Anualmente, 611 mil crianças, menores de cinco anos, morrem por este vírus em todo o mundo. Sendo 80% dessas mortes acontece em países de baixa renda, como o Sul da Ásia e da África (Parashar e col., 2006).

Nos países que fazem parte do Continente Asiático, como: Bangladesh; Ásia; Índia; Japão estima-se que, 20% a 25% dos casos de diarreia grave infantil e 20% a 45% das hospitalizações estão associadas aos RVs-A. Sendo 35% das infecções neonatais, contraídas na comunidade e 22,5% nosocomiais (Bresee e col., 2004; Ramani e Kang, 2007; Phan e col., 2007).

No Continente Africano, no Norte de Ghana, onde a principal causa de diarreia aguda na infância está associada aos de RVs, a prevalência desse vírus é de 55% (Reither, 2007).

Na América Latina, 31% a 38%, em média, das internações por doença diarreica aguda grave foram atribuídas aos RVs-A (Kane e col., 2004).

3.1.1 Frequência do rotavirus no Brasil

Estudos conduzidos, nas diferentes regiões do Brasil, indicam que a frequência de diarreia em crianças menores de cinco anos, associada aos rotavírus, varia de 12% a 42% (Linhares, 2000). Considerando as médias dos índices de positividade por regiões destaca-se o Norte com 36,5% (Linhares e col., 1983), registrando-se também taxas de 25% para o Nordeste (Stewien e col., 1991), 24% no Centro Oeste (Teixeira e col., 1991; Cardoso e col., 1992), 22% no Sudeste (Rácz e col., 1988; Candeias e col., 1989; Gomes e col., 1991; Stewien e col., 1994) e 42% no Sul (Coiro e col., 1985).

A característica enteropatogênica do rotavirus torna-se importante no desencadeamento dos quadros epidêmicos de gastroenterite aguda na infância, nas regiões de clima temperado, e no caráter endêmico das regiões tropicais (Kapikian e col., 2001). Nas regiões tropicais, a sazonalidade não é definida, entretanto, em países de clima temperado, onde as estações são definidas, as infecções por RVs adquirem características tipicamente sazonais, acontecendo principalmente nos meses secos e frios do ano (Cook e col., 1990; Pereira e col., 1993; Kale e col., 2004; Amarilla e col., 2007); ao passo que a maioria das diarreias de origem bacteriana, prevalece nos períodos chuvosos e quentes (Kale, 2004).

Em 1993, Pereira e col., analisaram, no Brasil, aspectos tipicamente sazonais nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste, o que não se registrou no Norte e Nordeste do país. Na cidade de Belém, no Estado do Pará, também não foi ressaltado padrão sazonal, quanto à ocorrência das gastroenterites por RVs (Linhares e col., 1983; 1989). Registros provenientes de intensa vigilância dos casos

de diarreia indicam predominância das gastroenterites por RVs ao longo dos meses mais secos do ano (Linhares e col., 1996).

Em virtude da gravidade com que se distinguem os episódios de diarreia aguda por RVs, geralmente a ocorrência é superior no âmbito hospitalar ou ambulatorial, com média de 34% para os quadros diarreicos, do que no comunitário, onde ocorrem cerca de 10% de positividade (Kapikian e col., 2001).

Nos últimos sete anos, no Brasil, 20,6% a 37% das hospitalizações de crianças menores de cinco anos, com diarreia aguda grave foi associada ao RVs, (Carmo, 2006).

Estudo realizado no Estado de São Paulo mostrou que 25% das doenças diarréicas agudas graves apresentavam RVs como agente etiológico (Carmona e col., 2006).

No Estado da Bahia, em Salvador, os RVs foram detectados nas fezes de 60,9% dos pacientes atendidos, apresentando diarreia aguda grave, sendo que 39,1% necessitaram de internação (Carneiro e col., 2005). Em Rondônia, na cidade de Porto Velho, 23,62% das infecções diarreicas tinham o RV como agente etiológico (Orlandi e col., 2006). No Estado de Mato Grosso do Sul, na cidade de Campo Grande, observou-se um índice de 23,2% de positividade para RVs-A (Andreasi e col., 2007).

Monitorização das doenças diarreicas agudas - MDDA

A Monitorização das doenças diarréicas agudas (MDDA) consiste na coleta sistemática de dados relativa aos casos de diarreia atendidos nas unidades de saúde. Seu objetivo é capacitar o nível local com recursos e atitudes ágeis e simplificadas, que lhe permitam descobrir alterações nas condições sanitárias (inadequação da água para consumo humano, destino dos dejetos e lixo, falta de higiene pessoal e preparo de alimentos) através do comportamento anormal das doenças diarréicas. A MDDA surgiu como um instrumento importante para combater e prevenir o cólera, é uma atividade de grande importância em todo o território

nacional, que fornece informações para que as medidas sejam adotadas em tempo hábil, a fim de evitar o agravamento dos casos e, conseqüentemente, os óbitos. (Secretaria Executiva de Saúde de Alagoas, 2006).

Há muitas décadas que o Brasil permanece vivenciando as conseqüências sociais e de saúde pública que permeiam as epidemias e endemias das diarreias em crianças menores de 5 anos. Mas só recentemente o Estado instituiu a Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas – MDDA, um sistema de vigilância sentinela, ágil e de avaliação continuada, configurando um importante instrumento no acompanhamento desses agravos na esfera municipal, tendo sido implantado em 4.379 (78,8%) municípios do país, objetivando, principalmente, conhecer a magnitude das diarreias agudas, subsidiar análise dos indicadores de morbidade e mortalidade, identificar os agentes envolvidos, detectar os surtos de forma precoce.

Em 2004, no Brasil, foram notificados, pelo sistema de vigilância da MDDA ao Ministério da Saúde, 2.395.485 episódios diarreicos, distribuídos por região de procedência, concentrando no nordeste o maior número de casos (Ministério da Saúde, 2006).

Em Alagoas, a implantação da MDDA teve início em 1996, em 10% dos municípios. Em 1997, 60% dos municípios já utilizavam essa estratégia e em 1998, 100% do Estado realizavam a monitorização (Secretaria Executiva de Saúde de Alagoas, 2006).

O Ministério da Saúde preconiza que as diarreias devem ser monitorizadas apenas nas unidades sentinelas. A definição das unidades de saúde sentinela para vigilância epidemiológica deve atender aos seguintes critérios: Um município em cada micro região com unidade hospitalar, contemplando: MDDA implantada; leito de internação pediátrica; Núcleo de Vigilância Epidemiológica implantada; envolvimento da direção do hospital e áreas afins. Alagoas possui 13 micro regiões com 16 unidades de saúde sentinelas, destas quatro estão localizadas na capital, Maceió.

Alagoas enfrenta sérios problemas sócio-econômicos. Dos dez municípios brasileiros mais pobres, sete localizam-se nesse Estado, incluindo o mais miserável de todos, São José da Tapera, no sertão. Lá, a taxa de mortalidade infantil em

menores de um ano é das mais altas do país: 71,94/1000, e o índice de analfabetismo é também o maior (Ministério da Saúde, 2005).

Em 2008, de acordo com os dados da Morbidade Hospitalar do SUS (SIH/SUS), foram registradas 14.175 internações por diarreia e gastroenterite de origem infecciosa, 2.726 (19%) foram em menores de 1 ano, destas 25 (1%) foram a óbito, no mesmo ano, foi registrado no SIAB um total de 34 óbitos por diarreia em menores de 1 ano. Comparando com 2007 onde ocorreram 68 óbitos, verificando-se uma redução de 50% (Secretaria da Saúde de Alagoas, 2008).

O coeficiente de mortalidade infantil por diarreia (CMID) no Estado de Alagoas atingiu a taxa de 1,9/1000 nascidos vivos no ano de 2007, e em 2008 1,5/1000, índices considerados elevados, segundo dados do SIAB a Taxa de Mortalidade Infantil (TMI) foi de 24% em 2007 e 20,9% em 2008 (Secretaria da Saúde de Alagoas, 2008).

3.2 Características dos rotavírus

Os Rotavírus (RVs) pertencem à família Reoviridae, constituindo o gênero único, Rotavírus.

Esses agentes foram associados à infecção diarreica em humanos em 1973, na Austrália, quando a partícula viral foi visualizada pela microscopia eletrônica, em material de biópsia duodenal e nas fezes de crianças hospitalizadas com diarreia grave não bacteriana (Bishop e col., 1973).

No Brasil, os rotavírus foram registrados pela primeira vez em 1976, por Linhares e col., (1977), que o detectaram através da microscopia eletrônica, dando início a vários relatos de outros estudos, no território nacional (Perez e col., 1988; Teixeira e col., 1991; Cardoso e col., 1992; Pereira e col., 1993; Stewien e col., 1994; Gusmão e col., 1999; Fernandes e col., 2000; Linhares, 2000).

Os RVs estão divididos em sete grupos sorológicos (A-G), sendo os pertencentes ao grupo A os maiores responsáveis por diarreia no homem (Espejo, Calderon e Gonzalez, 1977; Kalica e col., 1981; Lourenço, 1981; Pereira e col.,

1983; Santos, Gouveia, 1977; Linhares, 1997), apesar de que integrantes dos grupos B e C sejam achados também infectando seres humanos (Kapikian, 2001).

O RVs é um vírus não-envelopado, medindo de 70 a 90nm de diâmetro, apresentando simetria icosaédrica. A partícula viral madura compreende uma tripla camada proteica concêntrica: capsídeos externo, intermediário e interno. O core possui internamente o genoma viral, constituído por 11 segmentos de RNA, fita dupla denominado dsRNA, além da enzima transcriptase e das proteínas segmento VP1, VP2 e VP3. Cada seguimento genômico (ou gen) é responsável pela regulação da síntese de uma proteína específica. Os RVs possuem doze proteínas, seis são estruturais, designadas VPs (VP1-VP4, VP6 e VP7) e seis não estruturais, NSPs (NSP1-NSP6), exceto as NSP5 e NSP6 que são codificadas pela sobreposição da região de um único segmento (Estes, 2001; Ramig, 2004; Mascarenhas e col., 2006).

A proteína VP6 compõe a camada intermediária, sendo a responsável pela definição dos grupos antigênicos específicos (A-G), relacionados a diferentes espécies animais susceptíveis à infecção por rotavírus (Estes, 2001; Gabbay e col., 2005; Mascarenhas, 2006).

A camada externa é formada pelas proteínas estruturais, VP4 pertinente aos genótipos P, que exercem um papel importante no mecanismo de penetração do vírus na célula (Estes, 2001). A proteína VP7, uma glicoproteína, é responsável pela produção de anticorpos neutralizantes, contendo os sorotipos-específicos. Essas proteínas, por pertencerem às camadas mais externas, estão envolvidas com a resposta imune do hospedeiro, e por essa razão, são objeto de estudo para elaboração de vacinas contra os RVs (Estes, 2001).

Os RVs são classificados baseados na combinação binária dos tipos G e P (Estes, 2001; Kapikian, 2001). Existem pelo menos 42 diferentes sorotipos de cepas G/P com diferentes combinações; atualmente, predominam 5 sorotipos (G1, G2, G3, G4 e G9), responsáveis por aproximadamente 95% infecções em todo o mundo (O’Ryan, 2009).

A principal via de transmissão dos RVs é a via fecal-oral, sendo que, na fase aguda, são eliminados até um trilhão de partículas virais por mililitro de fezes, no entanto a dose infectante é de apenas dez partículas virais (Ward e col., 1985). O

período de incubação varia de um a três dias, ocorrendo o pico máximo de excreção entre o terceiro e quarto dias, após o surgimento dos primeiros sinais e sintomas associados à estabilidade físico-química deste vírus. A alta transmissibilidade (Kapikian e col., 2001) ocorre principalmente em ambientes fechados, como enfermarias pediátricas e creches (Bernstein, 2009).

A transmissão através do trato respiratório, por meio de aerossóis, já foi evidenciada, mas, ainda, são necessários experimentos para confirmação (Kapikian e col., 2001). A água, os alimentos contaminados e/ou gotículas respiratórias desempenham enorme função na disseminação dos RVs, principalmente em situações epidêmicas, nos surtos de diarreia aguda, notificados no Brasil (Linhares e col., 1981; Bernstein, 2009).

Estudos realizados em crianças hospitalizadas, com quadro clínico de diarreia aguda por RVs, mostraram maior incidência de infecção do que os estudos conduzidos em ambulatórios (Bresee e col., 1999; Linhares, 2000).

De uma maneira geral, o surto de diarreia aguda se inicia pela criança e se transmite ao restante da família. Nos adultos, as infecções podem ser assintomáticas ou subclínicas, na maioria das vezes associadas a indivíduos que residem em comunidades fechadas, como escolas, creches, hospitais e casas de repouso e que funcionam como prováveis reservatórios da infecção (Linhares e col., 1981; Linhares, 2000).

Os RVs causam doença diarreica em crianças e animais jovens, infectando facilmente o trato entérico (Estes, 2001; Kapikian e col., 2001; Linhares e Col., 2009). Esses vírus infectam os enterócitos diferenciados maduros do intestino delgado e, por meios ainda desconhecidos, migram para o trato gastrointestinal ocasionando viremia (Crawford e col., 2006).

Uma teoria para patogênese do RVs é que a diarreia causada por esse vírus é de natureza de má-digestão e má-absorção dos nutrientes, gerada pela morte dos enterócitos maduros na superfície do trato intestinal, causando uma extensa lesão no epitélio intestinal (Davidson e col., 1977; Ramig, 2004; Crawford e col., 2006).

A fisiopatologia das diarreias por RVs é visivelmente multifatorial. Observa-se uma extensa lesão no epitélio intestinal, provocada pela má-absorção, em virtude do acúmulo de dissacaridases no lúmen intestinal. O vírus tem um ciclo de origem lítica,

originando um quadro diarréico de natureza osmótica devido ao influxo de líquidos (Kapikian e col., 2001). O resultado da estimulação do sistema nervoso entérico (SNE) parece também estar no componente secretor das diarreias por RVs. A maneira de ativação desse sistema ainda não está bem elucidada, contudo, pode ser através da NSP4 ou de citocinas, além de outros fatores liberados pelas células epiteliais infectadas (Lundgren e Svensson, 2001; Ramig, 2004).

3.2.1 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial das doenças diarreicas por RVs representa uma significativa ferramenta para a confirmação de um quadro clínico suspeito. O fato de os sintomas clínicos serem semelhantes aos de outros enteropatógenos é importante para que o esclarecimento diagnóstico ocorra o mais precocemente possível. Dessa maneira, é imprescindível que a coleta das fezes aconteça nos primeiros 2-5 dias do início dos sintomas, na fase aguda da doença, no qual há uma alta concentração de partículas de RVs excretadas nas fezes (Kapikian e col., 2001).

Ao longo dos anos, inúmeros métodos foram desenvolvidos para o diagnóstico do RVs. A microscopia eletrônica (ME) ou imuno microscopia eletrônica (IME), utilizada como método pioneiro no diagnóstico do RVs, detecta a partícula viral nas fezes, possui elevada especificidade, rapidez diagnóstica, como também identifica os RVs não pertencentes ao grupo A, os RVs atípicos (Peñaranda e col., 1989).

Novas técnicas foram desenvolvidas, com o passar dos anos: eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), que se configura como recurso diagnóstico na detecção do genoma viral, tem elevadas sensibilidade e especificidade, o que viabiliza a detecção de perfis genômicos, mesmo aqueles RVs atípicos (B, C, D, E e F), que são constituídos principalmente com base na velocidade de migração dos seguimentos genômicos “10” e “11”, sendo classificados em “curtos”, “supercurtos” e “longos” (Taniguchi e Urasawa, 1995), são identificados através dessa nova técnica.

O teste de seleção mais utilizado para a detecção do antígeno viral é o EIE, que detecta antígenos virais nas fezes. É comercialmente encontrado para o

diagnóstico do RVs do grupo A, com o emprego de anticorpos policlonais ou monoclonais direcionados ao antígeno comum de grupo (VP6) (Flewett e col., 1989).

Outro método configurado como importante no diagnóstico dos RVs é a aglutinação em látex (LAT), que envolve microesferas sensibilizadas com anticorpos. Essa técnica detecta também, antígenos virais nas fezes, tem sensibilidade análoga à da EIE, com rapidez no resultado (média de 20 minutos), por este motivo o seu uso é recomendado em consultórios e hospitais (Brandt e col., 1987; Gabbay e col., 2005).

O ensaio imunoenzimático (ELISA), teste de referência utilizado como padrão-ouro é reconhecido pela sensibilidade e especificidade elevadas para a detecção do antígeno viral humano do grupo A nas fezes (Ishak e col., 1988; Gabbay e col., 2005; Phillips e col., 2009).

Com o aparecimento da biologia molecular, diversas técnicas têm sido descritas para a detecção do genoma viral, como a reação em cadeia de polimerase, antecedida de transcrição reversa (RT-PCR), ou hibridização (“dot-blot”) a partir de sondas moleculares. A RT-PCR mostra altas sensibilidade e especificidade, baseando-se na amplificação enzimática dos genes 4 (tipos P) e 9 (tipos G), empregando-se iniciadores consensuais específicos (Gouveia e col., 1990; Gentsch e col., 1992). Uma variante dessa técnica está na RT-PCR em tempo real, mais sensível, permitindo quantificar a carga viral durante uma infecção (Kang e col., 2004).

A técnica de hibridização molecular consiste na utilização de sondas de RNA marcadas com enzimas ou isótopos radioativos (Leite e col., 1996). O sequenciamento de nucleotídeos é outra técnica utilizada atualmente, no entanto, sua aplicabilidade está restrita à investigação científica (Mascarenhas, 2006).

Os RVs, podem ser, também, isolados de cultura de células com o uso de linhagens MA104 (provenientes de rim de macaco) e CaCo-2 (provenientes de células de carcinoma da cérvix uterina). A imunofluorescência é usada para a identificação, em virtude do efeito citopatogênico, onde se observa típico padrão granular citoplasmático (Kapikian e col., 2001). O método não possui importância prática para o diagnóstico, uma vez que a propagação do vírus é lenta, limitando-se à investigação científica (Mascarenhas, 2006).

3.2.2 Controle e prevenção

A lavagem das mãos, os cuidados com a água e alimentos, como também o destino adequado de dejetos animais e humanos são antigas práticas de higiene, que não mostram exercer impacto no controle e na profilaxia das doenças diarreicas por RVs (Fischer e col., 2004; Glass e col., 2004).

Devido ao grande impacto das infecções por RVs no mundo, muitos estudos têm conduzido ao desenvolvimento de vacinas capazes de reduzir a morbimortalidade (Costa e col., 2004a). A melhoria de saneamento básico e as práticas de higiene não diminuem a prevalência dos RVs, considerando o fato das repetidas epidemias ocorridas por ano, no mundo, e principalmente nos países desenvolvidos onde os níveis de saneamento e higiene são elevados, decorrendo a necessidade de contar-se com o recurso de uma vacina eficaz contra os RVs-A (Fischer e col., 2004; Glass e col., 2004). Portanto a vacinação constitui uma intervenção primária de saúde pública (Carneiro e col., 2005; Bernstein, 2009).

3.2.3 Vacinas contra rotavírus

A proteção dos sorotipos específicos contra a diarreia por RVs é de grande importância e ainda está sob discussão. Determinados estudos indicam que a vacina induz a proteção tipo específica (Pérez e col., 1990; Hoshino e Kapikian, 2000). No entanto, outros estudos não evidenciaram correlação entre proteção e anticorpos sorotipo específicos (Kapikian e col., 2001; Ward e col., 1992), entretanto a maior parte das vacinas analisadas correntemente, ou em desenvolvimento, foi formada de maneira a ofertar uma ampla cobertura antigênica para os significantes tipos G e/ou P que circulam mundialmente, ou regionalmente.

Várias estratégias têm sido exploradas no desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz anti RVs-A, sobretudo no sentido de proteger contra as infecções diarreicas graves (Linhares e Breese, 2000; Mascarenhas e Linhares, 2005; Linhares e Villa, 2006).

Em Alagoas, assim como em todo o país, a vacina contra o rotavírus, Vacina Oral de Rotavírus Humano (VORH), foi implantada em março de 2006, dirigida à população de menores de seis meses de idade (1 mês e 15 dias e 5 meses e 15 dias de vida), para proteger antecipadamente as crianças na faixa etária de 6-24 meses, onde observa a maior carga de complicações decorrentes da infecção pelo rotavírus. (Secretaria da Saúde de Alagoas, 2006).

3.3 Etiologia das doenças diarreicas no Brasil

Dados epidemiológicos indicam nitidamente que a maior parte das doenças diarreicas agudas é de natureza infecciosa, podendo ser causada por grande diversidade de microrganismos (Schmitz e col., 1992; Almeida e col., 1998).

Na década de 80, foi estimado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e UNICEF, que 800 milhões de crianças menores de cinco anos adoecem e 4,6 milhões morrem, por ano, vítimas de infecções diarreicas agudas (Campos e col, 1995).

É importante ressaltar que, no Brasil, as infecções diarreicas agudas causadas por enterobactérias em crianças são predominantes em relação aos quadros virais e estão relacionadas ao perfil sócioeconômico (Silva, 2008).

Vários estudos a respeito da etiologia das doenças diarreicas agudas têm indicado que a incidência das bactérias enteropatogênicas associados à gastroenterite, está relacionada a diversos fatores como: situação socioeconômica, condições habitacionais dos sujeitos em estudo, localização geográfica, estações do ano, tipo e local de residência (zona rural e urbana), saneamento básico, faixa etária da população estudada, práticas inadequadas de higiene, estado nutricional e desmame precoce (Almeida e col.,1998; Souza e col., 2002; Gomes e col., 2005).

Estudos desenvolvidos em centros urbanos, de países em desenvolvimento, têm registrado que quadros graves de diarreia aguda positiva para os sorogrupos de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), são os mais importantes agentes enteropatogênicos em crianças menores de dois anos de idade, pertencentes às

classes socioeconômicas desfavorecidas (Fagundes-Neto e col., 1989; 1991; Ministério da Saúde 2005). No Brasil, esta bactéria tem sido assinalada, como um dos agentes mais comumente isolados em crianças hospitalizadas, principalmente nos primeiros seis meses de vida, no primeiro ano de idade (Magalhães e col., 1981; Toledo e col., 1983; Oliva e col., 1997).

As *E.coli* enteropatogênicas podem ser classificadas em seis grupos diarréogênicos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora da Toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* com adesão difusa (DAEC). (Ministério da Saúde, 2005).

O gênero *Salmonella* é composto de bastonetes Gram negativos, móveis, compreendendo atualmente mais de 2000 diferentes sorotipos, muito deles estão associados com a etiologia da infecção diarreica aguda. É um enteropatógeno muito frequente no Brasil e em diversos países (Kitagawa e col., 1989; Magalhães e col., 1990; Schmitz e col., 1992). A salmonelose é de distribuição mundial, sendo os alimentos os principais veículos de sua transmissão. São responsáveis por significantes índices de morbidade e mortalidade, tanto nos países em desenvolvimento como nos desenvolvidos (Ministério da Saúde 2006). No Reino Unido, nos Estados Unidos e em diversos países europeus, a *Salmonella* tem sido a bactéria mais notificada nos casos de toxinfecção alimentar, sendo essa infecção mais frequente e importante nos países desenvolvidos do que nos menos desenvolvidos (Pinto, 2000). No México, houve 6,0% de isolamento de *Salmonella*, com predominância em pacientes na faixa etária entre um e cinco anos (González e col., 1995).

O gênero *Shigella* são bastonetes Gram negativos, anaeróbios facultativos que medem 2 a 3 µm de comprimento por 0,4 a 0,6µm de diâmetro, constituído de quatro sorogrupos ou espécies designadas como: *S.sonnei*, *S. flexneri*, *S. dysenteriae* e *S. boydii* (Who, 1980; Ministério da Saúde, 2005).

A *S. sonnei* e *S. flexneri* são as espécies mais predominantes na maior parte das vezes, no entanto a *S. dysenteriae* pode ser responsável por epidemias em grande magnitude, mesmo não sendo frequente nos casos endêmicos (Levine e col., 1973; Keusch e col., 1982). A Shigellose é frequentemente endêmica, sendo uma importante causa de morbidade, principalmente nos países onde existem más

condições de saneamento ambiental e práticas inadequadas de higiene. Sua distribuição é universal, afetando todas as faixas etárias (Thapa e col., 1995).

4. MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

O estudo foi do tipo transversal descritivo com amostras de fezes de crianças de zero a cinco anos, recebidas no Laboratório de Saúde Pública Dr. Aristeu Lopes (LACEN/AL), laboratório de referência do Estado de Alagoas, responsável pelo diagnóstico das doenças de notificação compulsória, para a pesquisa de agentes enteropatoênicos, no período de 2007 a 2009.

4.2 Casuística

4.2.1 Amostra

No período de 2007 a 2009, foram estudadas todas as amostras (179) de fezes *in natura*, obtidas de crianças, na faixa etária de zero a cinco anos, de ambos os gêneros, com quadro clínico de diarreia aguda, que receberam soro reidratante por via endovenosa, notificado pelas 17 unidades de saúde hospitalar sentinelas, conveniadas ao Sistema Único de Saúde (SUS), notificadas pelo sistema de vigilância epidemiológica MDDA (Monitorização das Doenças Diarréicas Agudas), responsável pela coleta de informações, a análise, e a circulação dos dados analisados em todos os níveis do sistema de saúde, para o desencadeamento de investigações na identificação de possíveis surtos ou epidemias frente às mudanças de comportamento observadas nas diarreias. As amostras fecais foram enviadas para análise, ao Laboratório Central de Saúde Pública de Alagoas, Dr. Aristeu Lopes (LACEN/AL), referência estadual, responsável pelo diagnóstico laboratorial das doenças de notificação compulsória.

4.2.2 Critérios de Inclusão

Foram incluídas na pesquisa amostras de fezes de crianças de zero a cinco anos, de ambos os gêneros, com infecções diarreicas agudas, que receberam soro reidratante por via endovenosa.

4.2.3 Critérios de Exclusão

Foram excluídas do estudo amostras de fezes de crianças maiores de cinco anos.

O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (protocolo nº 417/09). (Anexo 1) e da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (protocolo nº 865/08). (Anexo 2)

4.3 Procedimentos

4.3.1 Coleta, transporte e processamento das amostras fecais

As amostras de fezes foram coletadas por evacuação espontânea. Em seguida, o material foi acondicionado em recipientes plásticos, estéreis e sem conservantes, devidamente identificados e armazenados, sendo encaminhados ao LACEN/AL sob refrigeração, acompanhados de ficha epidemiológica de investigação, preenchida por médicos das respectivas unidades de saúde sentinela, de onde foram retiradas todas as informações para o preenchimento do formulário de coleta de dados.

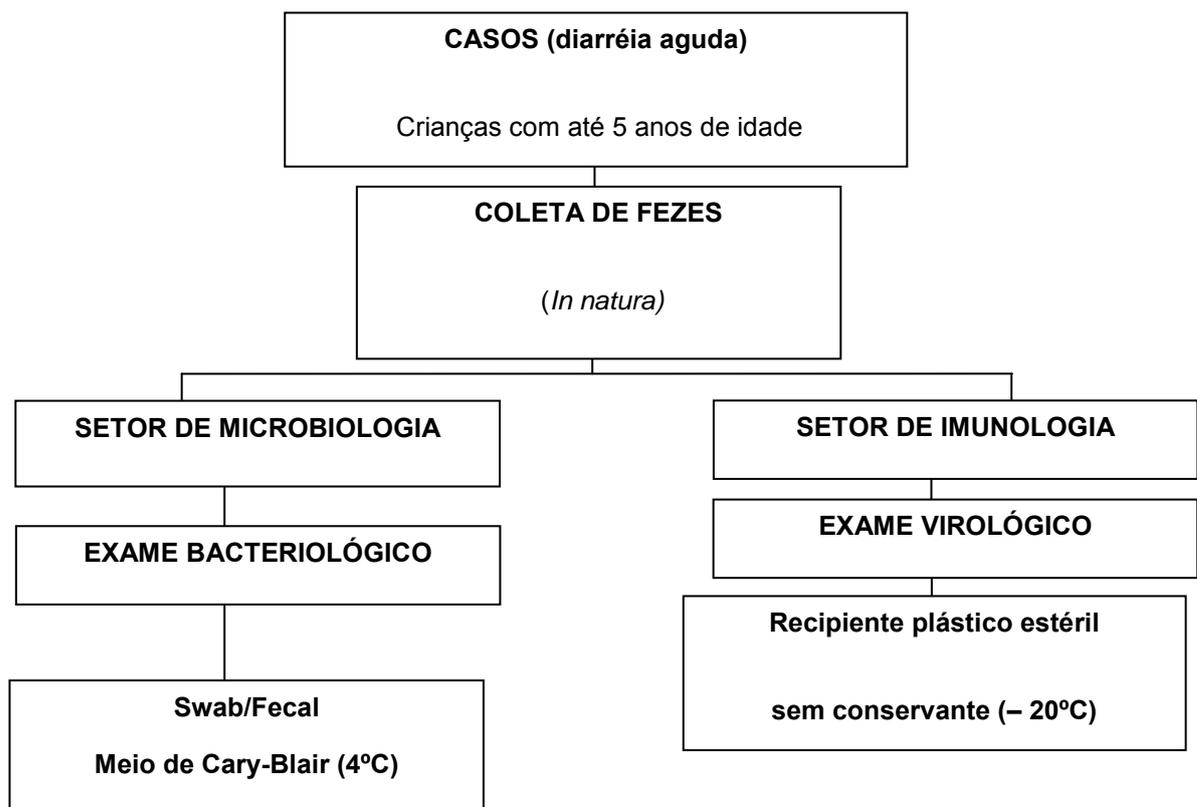
Para a pesquisa das bactérias enteropatogênicas, utilizou-se a coprocultura da parte mais líquida ou com muco e/ou sangue das fezes, que foram semeadas

imediatamente, ou em até duas horas após a coleta em meios de cultivo bacterianos apropriados. Após a sementeira, o material foi conservado em swab, inserido em meio de transporte Cary-Blair a 4°C¹⁴, para uma possível necessidade de repetição do exame. As fezes *in natura* foram conservadas em freezer (-20°C), para pesquisa viral, até o início de seu processamento.

Para a detecção de rotavírus, as amostras de fezes *in natura*, foram submetidas ao método imunoenzimático (ELISA), através do *Kit* IDEIA™ ROTAVIRUS (Oxoid).

A **FIGURA 1** mostra os procedimentos técnicos para a coleta e processamento das amostras fecais.

FIGURA 1: Procedimentos técnicos para a coleta e processamento das amostras fecais



4.3.2 Exame bacteriológico

4.3.2.1 Meios de cultivo, reagentes e soluções empregados no isolamento, enriquecimento e identificação de bactérias

Para a pesquisa de bactérias, os procedimentos básicos, preparo dos meios de cultivo, reagentes e soluções utilizadas, foram descritos por Oplustil (2000) e Ministério da Saúde (2005).

4.3.2.1.2 Meios de cultivo utilizados para isolamento bacteriano

O isolamento de enterobactérias foi realizado em meio de ágar MacConkey (MC), ágar *Salmonella-Shigella* (SS), todos preparados no LACEN/AL, de acordo com as recomendações dos fabricantes.

4.3.2.1.3 Meio de enriquecimento utilizado no cultivo de *Salmonella*

Para o enriquecimento de *Salmonella*, foi utilizado o caldo tetrionato, preparado segundo indicação dos fabricantes e adicionado de novobiocina (Merck) a uma concentração final de 40µg/ml.

No momento da semeadura das fezes nesse processo foi adicionada solução de iodo-iodetado numa concentração final de 2% (v/v).

4.3.2.1.4 Meios de cultivo utilizados para identificação bioquímica de bactérias

Para a identificação bioquímica bacteriana, foram utilizados os meios de Agar Tríplice Açúcar Ferro (TSI), Meio de Sulfeto-Indol-Motilidade (SIM), Meio de Ureia de Christensen, Agar Citrato de Simmons, Agar Lisina Ferro (LIA), Meio de Ornitina e Agar Nutriente. (Oplustil, 2000; Santos Filho, 2001; Ministério da Saúde, 2005).

A reação do Tríplice Açúcar Ferro (TSI) determina a habilidade dos microrganismos em degradarem carboidratos específicos incorporados ao meio, com ou sem produção de gás ou H₂S.

O meio de SIM (Sulfeto-Indol-Motilidade) permite verificar a mobilidade e capacidade da amostra bacteriana de produzir Indol, produto de degradação metabólica do aminoácido triptófano. As bactérias que possuem a enzima triptofanase são capazes de hidrolisar e desaminar o triptófano, com produção de indol, ácido pirúvico e amoníaco (Ministério da Saúde, 2005).

O meio de Ureia de Christensen determina a habilidade do microrganismo de desdobrar a ureia em amônia, pela ação da enzima urease, resultando em alcalinização do meio.

O meio de Agar citrato de Simmons possibilita a observação da capacidade bacteriana de utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono.

O Agar Lisina Ferro (LIA) tem a finalidade de evidenciar a capacidade da bactéria de descarboxilar ou desaminar a lisina e produzir gás sulfídrico (H₂S).

O meio de Ornitina permite verificar a descarboxilação da ornitina através da alcalinização do meio.

O Agar nutriente tem a finalidade de conservar e manter as cepas bacterianas.

4.3.2.2 Isolamento e identificação de bactérias enteropatogênicas

4.3.2.2.1 Isolamento de colônias bacterianas

As fezes do *swab* foram semeadas da seguinte maneira: primeiramente no Agar *Salmonella-Shigella* (SS), em seguida no ágar MacConkey (MC) e, por fim, no caldo tetrionato (CT).

Em seguida, os meios de ágar SS e o ágar MC foram incubados a 37°C, por 24 horas.

O caldo tetrionato (CT), permaneceu a 37°C por 24 horas, antes de ser semeado em meio de ágar SS; decorrido esse prazo, o meio SS foi semeado e incubado a 37°C por 24 horas.

Após o período adequado de incubação das placas de MC e SS e de selecionar as colônias de interesse, conforme explicação no próximo item, as referidas colônias foram identificadas através dos testes de identificação bioquímica.

4.3.2.2.2 Seleção e identificação de colônias bacterianas suspeitas de serem enteropatogênicas

A seleção e identificação bioquímica e sorológica de colônias bacterianas suspeitas de serem enteropatogênicas foram realizadas da seguinte maneira:

- Seleção de colônias bacterianas suspeitas de serem enteropatogênicas

As colônias foram selecionadas, a partir das placas de MC: quatro colônias fermentadoras de lactose (lac +) com características morfológicas típicas de *Escherichia coli* (colônias vermelhas e com halo turvo) e duas colônias não fermentadoras de lactose (lac -) (incolor e transparente) e de cada tipo morfológico.

Da placa de SS, foi selecionada uma colônia (lac -) (incolor e transparente) de cada tipo; (H₂S +) (com centro preto) e (H₂S -) (sem centro preto) e uma (lac +) (colônia vermelha).

- Identificação bioquímica de colônias bacterianas suspeitas de serem enteropatogênicas

Foram selecionadas todas as colônias (lac +) e (lac -), nos diferentes meios de isolamento de enterobactérias, e semeadas individualmente para os testes bioquímicos, nos meios TSI, SIM/Indol, Ureia, Citrato de Simmons, LIA, Ornitina, e Agar nutriente, incubadas à temperatura de 37°C durante 24 horas (o citrato foi sistematicamente reincubado por mais 24 horas).

Após o período de incubação, as colônias suspeitas de *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Shigella*, foram, a partir do crescimento do meio de Ágar nutriente, submetidas ao teste de oxidase, que é baseado na produção bacteriana de uma enzima oxidase intracelular. A reação é devido à presença do sistema citocromo-oxidase, a qual ativa a oxidação do citocromo reduzido pelo oxigênio molecular. Esse processo serve para a confirmação de que verdadeiramente pertenciam à família *Enterobacteriaceae*, uma vez que qualquer microrganismo que desenvolva a atividade de citocromo oxidase pode ser excluído desta Família (Ministério da Saúde, 2005).

Os resultados dos testes bioquímicos observados nos meios de identificação, referidos anteriormente, permitiram o diagnóstico presuntivo dos gêneros e eventualmente das espécies bacterianas isoladas.

A confirmação do diagnóstico foi realizada através dos testes de soroaglutinação com antissoros específicos, polivalentes e monovalentes (PROBAC do Brasil) anti *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Shigella*, descritos abaixo.

- Identificação sorológica de colônias bacterianas suspeitas de serem enteropatogênicas
- Identificação sorológica de *Escherichia coli*

O crescimento obtido na superfície do meio de Ágar nutriente foi ressuspenso em 0,3 ml de solução salina (NaCl a 0,85% - p/v) estéril, para os testes de aglutinação em lâmina.

Foram utilizados para a identificação de *E.coli* antissoros específicos, polivalentes e monovalentes (Probac do Brasil), para a detecção dos seguintes grupos de *E.coli*:

- EPEC (*E.coli* enteropatogênica);
- EIEC (*E.coli* enteroinvasora)

O Kit de antissoros para identificação de EPEC possui os seguintes antissoros polivalentes:

- A (com os seus monovalentes: O26, O55, O111 e O119);
- B (com seus monovalentes: O114, O125, O142 e O158) e;
- C (com seus monovalentes: O86, O126, O127 e O128).

Para a identificação de EIEC, o *Kit* de antissoros foi composto pelos antissoros polivalentes A e B.

Foram utilizados primeiramente os antissoros polivalentes A, B e C para identificação da EPEC.

Quando observada a aglutinação das colônias bacterianas com algum desses antissoros polivalentes, deu-se continuidade à sorotipagem, utilizando-se os antissoros monovalentes correspondentes descritos acima.

As colônias que não se aglutinaram com os antissoros polivalentes contra EPEC, e que apresentaram o teste da lisina descarboxilase negativo, foram testados contra os antissoros polivalentes A e B específicos anti EIEC.

As colônias bacterianas que se apresentaram bioquimicamente sugestivas de *Shigella* (urease negativas), que não se tenham aglutinado nos antissoros específicos foram também submetidas à soroaglutinação em lâmina com os antissoros anti EIEC e EPEC.

- Identificação sorológica de espécies de *Shigella*

As colônias bacterianas bioquimicamente sugestivas de *Shigella* foram ressuspensas da superfície do meio Ágar nutriente, com 0,3 ml de solução salina (0,85% - p/v) e submetida ao teste de aglutinação em lâmina com os seguintes antissoros polivalentes específicos procedentes da Probac do Brasil, na seguinte ordem:

- *Shigella flexneri* (contendo anticorpos contra os sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e variantes X e Y);
- *Shigella sonnei* (contendo anticorpos contra as formas I e II);
- *Shigella boydii* polivalente I (contendo anticorpos contra sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 14);
- *Shigella boydii* polivalente 2 (contendo anticorpos contra os sorotipos 8, 9, 10, e 11);
- *Shigella boydii* polivalente 3 (contendo anticorpos contra os sorotipos 7, 12, 13 e 15);
- *Shigella dysenteriae* polivalente 1 (contendo anticorpos contra os sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) e;
- *Shigella dysenteriae* polivalente 2 (contendo anticorpos contra os sorotipos 8ab, 8ac, 9 e 10).

Se a soroaglutinação em lâmina com ressuspensões de culturas bacterianas apresentasse resultado negativo, ela seria repetida com ressuspensões bacterianas aquecidas em banho-maria fervente por 10 minutos.

- Identificação sorológica do gênero *Salmonella*:

As colônias bacterianas bioquimicamente sugestivas de *Salmonella* foram, primeiramente, ressuspensas do crescimento no meio de Ágar nutriente com 0,3 ml de solução salina (NaCl a 0,85%-p/v) estéril. Posteriormente, foram submetidas a teste de aglutinação em lâmina com antissoro polivalente anti-*Salmonella* (contendo anticorpos contra os antígenos “O” de *Salmonella* pertencentes aos grupos A, B, C1, C2, D, E, contra o antígeno Vi e contra os flagelares a, b, d, i, 1, 2, 5).

Alíquotas de 0,2 ml de ressuspensões bacterianas, que não aglutinaram, foram transferidas para tubos de vidro estéreis e aquecidas em banho-maria fervente, durante 10 minutos e novamente testadas contra esse mesmo antissoro polivalente anti-*Salmonella*.

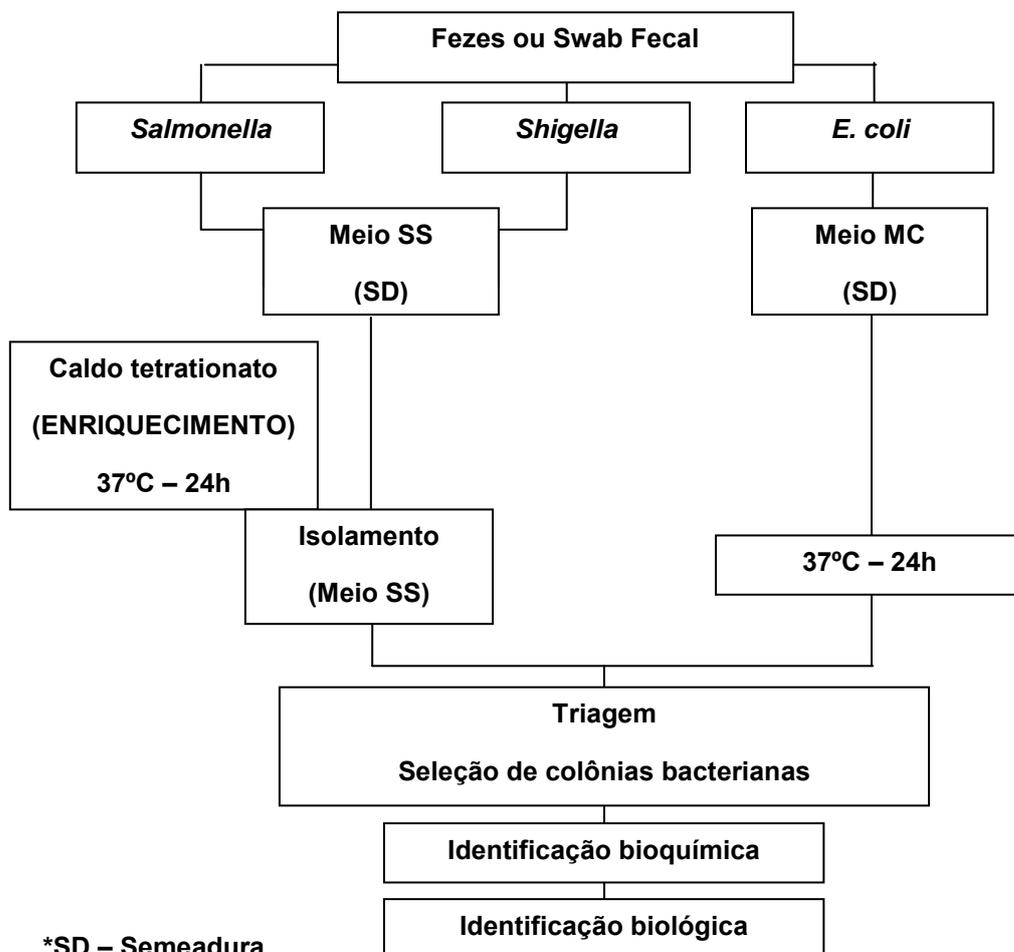
Quando houve aglutinação nesse antissoro polivalente anti-*Salmonella*, as amostras foram testadas contra os respectivos antissoros “O” monovalentes (A, B, C1, C2, D, E e antígeno Vi).

O restante da ressuspensão bacteriana, que não foi aquecida, foi posteriormente utilizada para a determinação dos antígenos flagelares correspondentes (antissoros monovalentes flagelares a, b, c, d, i, 1, 2, 5), como orientado pelo fabricante.

Todos os soros utilizados para identificação de *Salmonella* foram da empresa Probac do Brasil.

A **FIGURA 2** mostra fluxograma das principais etapas para o isolamento e caracterização dos principais enteropatógenos bacterianos.

FIGURA 2: Fluxograma das principais etapas para o isolamento e caracterização dos principais enteropatógenos bacterianos



4.3.3 Exame Viroológico

Para o exame virológico utilizou-se o ensaio imunoenzimático (ELISA), teste de referência, utilizado como padrão-ouro, para a detecção do antígeno viral humano do grupo A (Gabbay e col, 2005; Phillips e col, 2009), reconhecido pela sua elevada sensibilidade e especificidade na detecção dos antígenos do Rotavírus nas fezes (Ishak e col, 1988).

A pesquisa do vírus foi realizada no Laboratório de Imunologia Clínica do LACEN/AL. As amostras fecais foram submetidas ao método imunoenzimático (ELISA), para a detecção de rotavírus através do *Kit* IDEIA™ ROTAVIRUS (Oxoid), obedecendo às técnicas estabelecidas pelo fabricante, testes estes, rotineiramente utilizados no LACEN/AL, fornecidos pelo Ministério da Saúde.

O IDEIA™ ROTAVÍRUS é um teste (ensaio) imunoenzimático tipo sanduíche de fase única que utiliza anticorpo policlonal para detectar antígeno específico presente no grupo A do rotavírus.

4.3.3.1 Identificação dos Rotavírus

- **Preparação das amostras fecais:**

No momento do exame, todas as amostras fecais foram descongeladas, diluídas a 1/10, com o diluente, que vem no *Kit* pronto para uso, em um tubo de ensaio e agitadas em agitador mecânico. Após esse procedimento, a suspensão permaneceu à temperatura ambiente por 10 minutos, sendo utilizada posteriormente.

- **Execução do Teste (ELISA)**

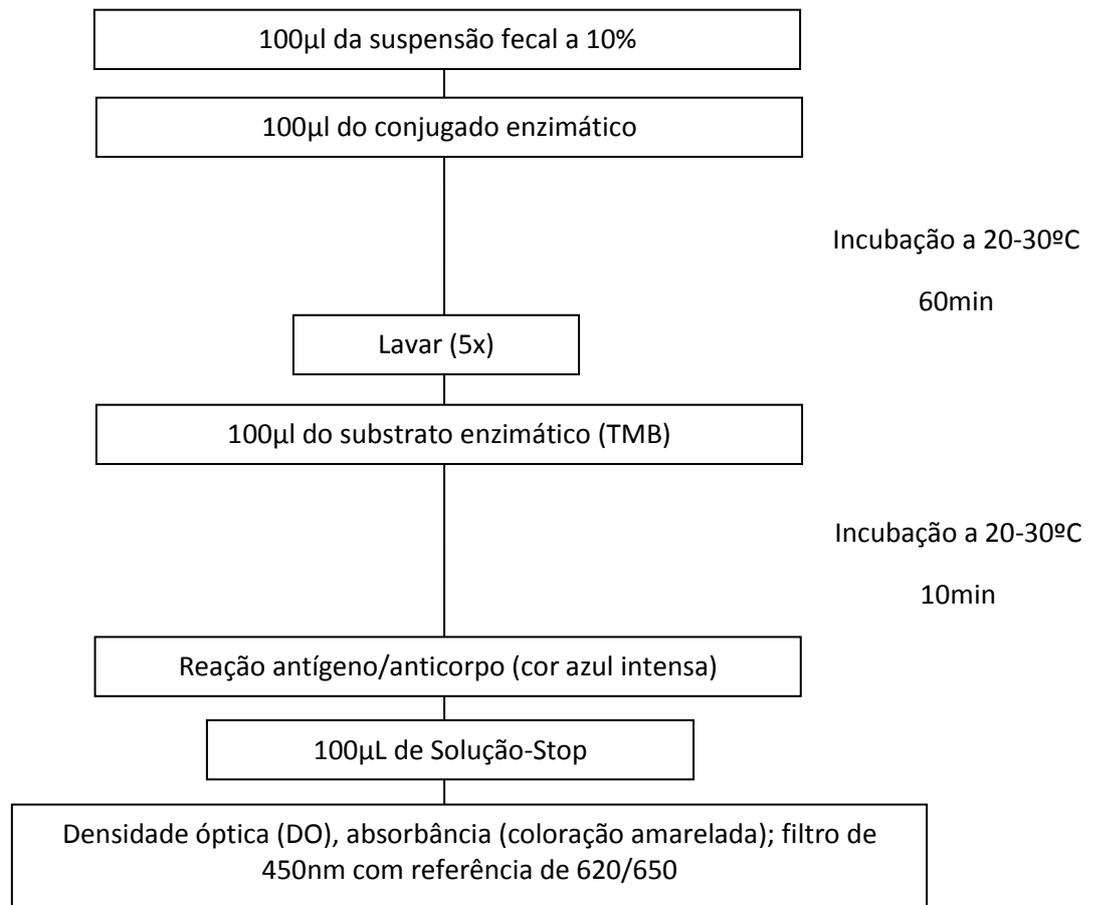
As fases desse procedimento são descritas a seguir: foram utilizadas microplacas de poliestireno, fundo chato, contendo 96 micropoços (12 colunas numeradas e 8 fileiras de A a H), ou *strips*, previamente sensibilizados com anticorpos policlonal específico para Rotavírus. A primeira fase do teste constitui na adição de 100µL da suspensão fecal a 10% (previamente diluída como descrito anteriormente) nos micropoços. Logo após foram adicionados 100µL do conjugado enzimático (anticorpo policlonal específico para rotavírus produzido em coelho, acoplado à peroxidase); paralelamente, acrescentou-se o mesmo volume de controle positivo de antígeno, suprido com *Kit*. Aponta-se que, para cada espécime clínico, usaram-se dois micropoços de uma determinada fileira (ex: A1 e A2). Em seguida, procedeu-se à leve agitação de microplaca (ou *strip*), incubando-se por 60 minutos à temperatura de 20-30°C.

Passado o período de incubação, os micropoços foram preenchidos com uma solução-tampão, contendo agente antimicrobiano e detergente, tal procedimento foi repetido por mais cinco vezes, para remover o excesso de espécime e qualquer resíduo presente e, entre cada lavagem, havia o esgotamento total dos micropoços, invertendo as microplacas (ou *strip*), sob pressão, em papel espesso (tipo toalha). Sucedeu-se a deposição de 100µL do substrato enzimático TMB (solução estabilizadora de tetramethylbenzidina) e incubados por 10 minutos, à temperatura ambiente, e realizada a leitura dos micropoços, à simples observação visual, as amostras positivas, que indicam a presença de anticorpos ligados (reação antígeno/anticorpo), denotaram cor azul intensa, comparável àquela do controle antigênico. As medidas de densidade óptica (D.O), absorbância, entretanto, (efetuadas em leitor de ELISA, Diasorin®, filtro de 450nm com referência de 620/650), foram sistematicamente precedidas do bloqueio da reação cromogênica enzima-substrato, a partir do acréscimo de 100µL, em todos os micropoços, de Solução-Stop (0,46mol/L de ácido sulfúrico). A coloração primária converte-se para o amarelo, indicativa de positividade. O resultado foi calculado a partir do cut-off. O valor do cut-off é obtido pela soma da média da absorbância dos controles negativos ao fator 0,100. (CUC= CN + 0.100). Portanto todas as amostras que obtiveram valor acima do valor do cut-off foram consideradas reagentes para rotavírus. As amostras que obtiveram absorbância com valor 10% acima ou abaixo do valor do cut-off foram consideradas indeterminadas (zona cinza), incorriam em repetição sistemática do

teste. Para a validação dos resultados, a absorbância do controle negativo teve valor máximo de 0,150, segundo recomenda a técnica.

A **FIGURA 3** mostra fluxograma do procedimento do teste para identificação do Rotavírus (ELISA)

FIGURA 3: Fluxograma do procedimento do teste para identificação do Rotavírus (ELISA)



Fonte: IDEIA™ ROTAVÍRUS

4.4 Análise Estatística

Após a coleta de dados, estes foram armazenados em planilha eletrônica (Microsoft Excel 2003®. Redmond, WA, EUA). Os resultados foram tabulados e as frequências das variáveis de cada grupo foram calculadas e dispostas em tabelas.

Para realização da estatística descritiva e testes estatísticos, foi utilizado o *software* EPI-INFO versão 3.51.

5. RESULTADOS

5.1 Gênero

Foram enviadas ao LACEN/AL 179 amostras de fezes de crianças de zero a cinco anos, de ambos os gêneros, com infecção diarreica aguda, que receberam soro reidratante por via endovenosa, no período de 2007 a 2009. Foi constatado que 69 ou 38,5% das crianças pertenciam ao gênero feminino; destas, 23 ou 20,9% apresentavam exame positivo para RV. Do número total de amostras 110 ou 61,5% pertenciam ao gênero masculino, sendo que 12 ou 17,39% apresentaram teste positivo para RVs.

5.2 Faixa etária

A média de idade das crianças que compuseram a amostra deste estudo foi de 19,79 meses ($\pm 15,84$ DP), sendo a idade mínima observada de 0,13 meses e a máxima de 60 meses.

A distribuição das amostras de fezes, de crianças com diarreia aguda, de acordo com a faixa etária, está discriminada na tabela 1, na qual se observa que, entre as amostras de fezes estudadas, a maioria é de menores de 12 meses (56,4%), estando distribuídas, respectivamente, na faixa etária de 0-6 meses (15,7%) e de 6-12 meses (40,7%).

Tabela 1 - Frequência de diarreia aguda por faixa etária

FAIXA ETÁRIA (meses)	CASOS DE DIARREIA N(%)
0 – 6	28 (15,7%)
6 12	73 (40,7%)
12 18	8 (4,5%)
18 24	28 (15,8%)
24 30	2 (1,1%)
30 36	19 (10,6%)
36 42	0 (0%)
42 48	9 (5,0%)
48 54	1 (0,6%)
54 60	11 (6,0%)
TOTAL	179 (100%)

O Rvs esteve associado a 17,5% dos 56,4 % de amostras de fezes de crianças menores de 12 meses. Quando se considera o intervalo entre 0 e 24 meses, esse percentual atinge 42%.

5.3 Número de casos de diarreia aguda e a presença do Rotavírus, conforme o período de coleta das amostras (mês/ano)

A tabela 2 mostra a distribuição do número de amostras de fezes, coletadas dos casos de diarreia aguda, e a presença de rotavírus, de acordo com os meses do ano. Durante o período do estudo, houve um maior predomínio de amostras de fezes diarreica nos meses de março 27 (15,1%), abril 34 (19,0%) e maio 21 (11,7%) e RVs reagentes em março, maio, julho e agosto, totalizando 6 (17,2%), 4 (11,5%), 5 (14,3%) e 7 (20%), respectivamente.

Tabela 2 – Distribuição do número de amostras de fezes, dos casos de diarreia aguda e a frequência do RVs, de acordo com os meses do ano

MESES	NÚMERO DE AMOSTRAS	FREQUÊNCIA DE
	N (%)	AMOSTRAS RVs REAGENTE N (%)
Janeiro	3 (1,7%)	3 (8,5%)
Fevereiro	16 (8,9)	_____
Março	27 (15,1%)	6 (17,2%)
Abril	34 (19%)	3 (8,5%)
Maiο	21 (11,7%)	4 (11,5%)
Junho	19 (10,6%)	3 (8,5%)
Julho	14 (7,8%)	5 (14,3%)
Agosto	13 (7,3%)	7 (20%)
Setembro	1 (0,6%)	1 (2,8%)
Outubro	5 (2,8%)	_____
Novembro	18 (10,1%)	2 (5,8%)
Dezembro	8 (4,5%)	1 (2,9%)
TOTAL	179 (100%)	35 (100%)

5.4 Sintomas associados à doença diarreica aguda e a presença do RVs

Quanto à presença de sintomas associados à diarreia aguda, foram observados em maior frequência febre e vômito.

164 doentes, do total de 179 amostras, informaram a ocorrência ou não de febre, enquanto 163 informaram a ocorrência ou não de vômito, conforme pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3 – Frequência dos sintomas associados à diarreia aguda nas 179 amostras de fezes

	FEBRE	VÔMITO
Sim	89 (54,3%)	100 (61,3%)
Não	75 (45,7%)	63 (38,7%)
TOTAL	164 (100%)	163 (100%)

Febre foi mais frequente na faixa etária compreendida entre 12 e 24 meses (67,4%); enquanto vômito, entre 1 e 9 meses (76,2%). Na tabela 4, observa-se a distribuição, por faixa etária, dos sintomas associados das crianças com diarreia aguda.

Tabela 4 – Frequência dos sintomas associados à diarreia aguda por faixa etária

FAIXA ETÁRIA	FEBRE		VÔMITO	
	SIM	NÃO	SIM	NÃO
< 9 meses	23	19	32	10
de 9 meses < 12 meses	9	9	9	9
de 12 meses < 24 meses	31	15	30	15
≥ 24 meses	26	32	29	29
SUBTOTAL	89 (54,3%)	75 (45,7%)	100 (61,3%)	63 (38,7%)
TOTAL	164 (100%)		163 (100%)	

Quando associados aos casos RVs reagentes, o sintoma mais frequente foi vômito, conforme pode ser observado na tabela 5. Vale ressaltar que em apenas uma das amostras que foi RVs reagente não foi possível saber se houve a presença de quaisquer sintomas.

5.5 Pesquisa de enteropatógenos

Foi observado que 54 ou 30,1% dos casos eram positivos para bactéria ou rotavírus sendo que 35 ou 19,6% das amostras apresentaram positividade exclusiva para rotavírus enquanto que o isolamento exclusivo de bactérias ocorreu em 19 ou 10,6% das amostras.

Tabela 5 – Positividade do isolamento de enterobactérias e Rotavírus nas amostras de fezes de crianças com diarreia aguda

	ROTAVÍRUS	BACTÉRIAS
	N (%)	N (%)
SIM	35 (19,6%)	19 (10,6%)
NÃO	144 (80,4%)	160 (89,4%)
TOTAL	179 (100%)	179 (100%)

Entre os resultados positivos para enterobactérias, a EPEC ocorreu em 14 (73,7%), sendo 2 (10,5%) pertencentes ao grupo “A” e 12 (63,2%) pertencentes ao grupo “B”. A *Salmonella* sp foi isolada em 2 (10,5%) e a *Shigella flexneri* em 3 (15,8%) das amostras. Entre os resultados positivos foi observado que 2 amostras foram positivas para bactéria e rotavírus.

Tabela 6 – Enterobactérias mais frequentes

TIPO DE BACTÉRIA	FREQUÊNCIA
	N (%)
EPEC A	2 (10,5%)
EPEC B	12 (63,2%)
<i>Salmonella</i> sp	2 (10,5%)
<i>Shighella flexneri</i>	3 (15,8%)
TOTAL	19 (100%)

5.6 Vacinação

Das 179 amostras de fezes de crianças com diarreia aguda, enviadas ao laboratório, apenas 47 (26,2%) informaram situação de vacinação contra RVs, sendo 31(66%) vacinadas e 16(34%) não vacinadas, porém 12,9% das vacinadas foram RVs reagente.

Tabela 7 – Frequência de vacinação

	VACINAÇÃO
	N (%)
SIM	31 (66,0%)
NÃO	16 (34,0%)
TOTAL	47 (100%)

6. DISCUSSÃO

Os agentes etiológicos mais importantes, responsáveis pela doença diarreica aguda, são os vírus, bactérias e parasitas (Bryce e col., 2005; Glass e Parashar, 2006; Gutierrez e col., 2006; Moyo e col., 2007). Entre esses agentes, os vírus são os maiores responsáveis das gastroenterites (Gutierrez e col., 2006; Orlandi e col., 2006; Amarilla e col., 2007; Fischer e col., 2007; Perez-Schael e col., 2007; Reither 2007; Loulizi e col., 2008; Forster e col., 2009).

A doença diarreica aguda constitui um sério problema de saúde pública no mundo, tanto nos países desenvolvidos como em desenvolvimento (Linhares, 2000; Kapikian e col., 2001; Schnack e col., 2003; Orlandi, 2006; Fischer e col., 2007; Perez-Schael e col., 2007) sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil (Candeias e col., 1978; Baldacci e col., 1979; Andrade e col., 1999; Costa e col., 2004a; Cáceres e col., 2006; Sartori e col., 2008), os quais são frequentemente responsáveis pelas hospitalizações e visitas ambulatoriais de crianças, nos primeiros cinco anos de vida, causando um grande impacto na economia de vários países (Constenla e col., 2006; Rheingans e col., 2007; López-de-Andrés e col., 2008; T.Díaz e col., 2008; Bernstein, 2009).

Os resultados positivos de isolamento de enteropatógenos em estudos nacionais e internacionais são variáveis, com relação à incidência dos agentes etiológicos, responsáveis pelas doenças diarreicas, possivelmente em virtude das peculiaridades epidemiológicas das populações estudadas, da metodologia empregada, do número de pesquisadores e do período no qual foi realizado o estudo (Luz, 2002).

Em 1983, em São Paulo, região sudeste do Brasil, Osmo e col., dos 252 casos de diarreia aguda analisados, encontraram 49 ou 19,5% de *E.coli* enteropatogênica (EPEC), nenhum caso de *E.coli* enteroinvasora (EIEC), 26 ou 10,3% de *Salmonellas*, 6 ou 2,4% de *Shigella* dos 32,2% agentes bacterianos isolados, enquanto Souza e col.,(2002), no mesmo Estado, analisaram 154 amostras fecais de crianças entre 0-59 meses de idade, isolando agente bacteriano em 34,4% dos casos, verificaram grande variedade de grupos diarregênicos de *Escherichia*

coli em que, das 90 cepas isoladas, 25 ou 16,2% foram EPEC, 12 ou 7,8% *Shigella sp* e 1 ou 0,7% *Salmonella sp*.

Nos estudos semelhantes, conduzidos por Pontual, Falbo e Gouveia (2006), em Recife, Pernambuco, Nordeste do Brasil, com 35 crianças de zero a 60 meses, a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) apareceu como único agente etiológico em 8,4% dos casos, *Shigella sp*, *Salmonella sp* e outros grupos de *E.coli* não foram identificados.

Neste ano, 2010, Moreno e col., em estudo conduzido em João Pessoa, também no Nordeste do Brasil, selecionaram 290 amostras de fezes de crianças menores de 24 meses de vida, com diarreia aguda. Nesse estudo, foram detectados agentes patogênicos em 62,7% dos casos. A *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) foi o agente etiológico mais frequente detectado (25%), contrastando com os outros estudos citados, seguindo de EPEC (11%), ETEC (10%), *Salmonella sp* (8%) e *Shigella sp* (4%).

Na região Norte do país, em Porto Velho, RO, Orlandi e col., (2006), estudando 407 amostras de crianças de 0-6 anos de idade, mostraram que a *E. coli* foi o segundo mais frequente grupo de patógenos e o primeiro entre os agentes bacterianos, associados à diarreia aguda, nessa faixa etária.

Entre os agentes enteropatogênicos isolados neste trabalho, o rotavírus foi mais predominante que as bactérias, contradizendo com a literatura onde estudos relatam que há prevalência maior dos vírus nos países desenvolvidos e as bactérias nos países em desenvolvimento (Souza e col., 2002).

Nesta pesquisa, com relação à frequência de enteropatógenos, os resultados mostraram que, o RVs esteve presente em 19,6% das 179 amostras de fezes analisadas.

No Brasil, nas regiões Norte, Nordeste, Sul, Suldeste e Centro Oeste (Gusmão, 1999; Souza e col., 2002; Cardoso, 2003; Luz, 2005; Santos, 2005; Carmona, 2006; Ribeiro e col., 2008), obtiveram resultados próximos a este estudo..

Nos países, que fazem parte da América Latina, como Colômbia, Abril e col. (2006), Cáceres e col. (2006), observaram ocorrência de 48,1% e 49% das crianças, na faixa etária entre 6-23 meses. Na Venezuela, González e col. (2008) encontraram 40% na mesma idade.

No Brasil, Sartori, (2008), em uma revisão sobre a morbidade e mortalidade do RVs, observou a média de proporção de RVs nos países da América Latina, (Brasil, Argentina, Chile, Venezuela, Peru e El Salvador), que variou de 29,2% a 71%.

Na Europa, Tcheremenskaia e col. (2007), observaram uma incidência de 34,1% em crianças, entre 12-24 meses de idade, com maior predominância na faixa etária entre 12-23 meses (47%). Ainda nos países Europeus, como França, Alemanha, Espanha, Forster (2009), obteve resultados positivos para rotavírus em 43%, em menores de cinco anos, com gastroenterite aguda. (Forster, 2009).

Enquanto nos países do Continente Africano os índices atingiram 70% a 91% (Moyo e col., 2007; Rahman e col., 2007) e no Continente Asiático, estudos mostraram que 41,3% foram reagentes para RVs; destas 20,6% de crianças menores de um ano de vida (Koh e col. 2008). Phan e col., (2007), em cinco diferentes localidades do Japão, encontraram 19,4%, valores esses similares aos deste estudo.

Nos EUA, trabalhos realizados por Mast e col. (2009), obtiveram 36% na faixa etária entre 6-12 meses.

As bactérias são reconhecidas como enteropatógenos, predominantes nas diarreias agudas em países subdesenvolvidos, em virtude da relação com as baixas condições de higiene das populações e das precárias condições sanitárias, provocando a disseminação das enterobactérias (Kitagawa e col., 1989; Magalhães e col, 1990; González e col., 1995).

Entre as enterobactérias isoladas neste trabalho, a *E. coli* enteropatogênica foi o patógeno mais freqüente entre os agentes associados à diarreia aguda, dados semelhantes foram observados também em Recife Pontual, Falbo e Gouveia (2006).

Os casos de diarreia, registrados nos primeiros meses de idade, são raros. Provavelmente, a baixa frequência de infecção sintomática, nesta faixa, etária deve-se a anticorpos da classe IgA, presentes na mucosa intestinal, transferidos passivamente através do leite materno, de mãe para filho. Os Rvs ocorrem mundialmente, sabendo-se que quase todas as crianças, nos primeiros anos de vida, já tiveram infecção por esse vírus. A frequência das doenças diarreicas por

esses enteropatógenos assumem maior importância na faixa etária entre 6-24 meses (Linhares e col., 1989; Oliveira, Linhares, 1999).

Neste estudo, os dados relacionados à faixa etária foram concordantes com a maioria expressiva das pesquisas, que afirmam que é na faixa etária entre seis e vinte e quatro meses, como o encontrado por Linhares (1983) e Luz (2002) nas regiões Norte e Nordeste e Carmona e col., (2006); Costa e col., (2006) e Santos e col., (2008), regiões Sul e Sudeste. Onde se observa a maior frequência de doenças diarreicas agudas, sendo os índices mais elevados entre 6-12 meses, principalmente nas áreas desfavorecidas socioeconomicamente (Fagundes- Neto e col., 1989; Schmitz, 1990; Amorim e col., 1992; Gusmão, 1995; Linhares, 2000; Maranhão, 2001; Gomes e col., 2005; Amarilla e col., 2007; Loulizi e col., 2008).

Dessa maneira, os resultados deste trabalho são concordantes com os de outras regiões, assim como em outras partes do mundo. Por outro lado, um número inferior de doenças diarreicas por rotavírus foi observado nas crianças com mais de 24 meses de vida, reforçando o conceito de que, após os dois anos de idade, o índice de infecções por RVs tende a diminuir, em virtude da imunidade adquirida pela maioria das crianças, nessa faixa etária, ao terem tido contato anterior com o vírus (Velasquez e col. 2000).

Com relação ao gênero, observou-se que, o número de amostras foi maior em crianças do gênero masculino, ao contrário dos estudos semelhantes realizados nos Estados do Rio Grande do Norte e Maranhão, na região Nordeste, onde houve predomínio de crianças do gênero feminino, confirmando que não há relação do gênero com a doença (Maranhão, 2001; Luz, 2002).

No Brasil, a sazonalidade das doenças diarreicas é variável. Nos estados da região central, sul e sudeste a maior incidência é verificada nos meses frios ou no período de seca, para rotavírus e nos períodos chuvosos para as enterobactérias. Porém, no nordeste se distribui por todo o ano (Cardoso e col., 1992; Linhares e Bresee, 2000).

As maneiras de apresentação das doenças diarreicas por Rvs variam desde um quadro assintomático, subclínico ou de baixa intensidade, a processos extremamente graves, levando crianças menores de um ano de vida ao óbito (Oliveira e col., 1994).

Vale ressaltar que a principal característica da gastroenterite é a tríade febre, vômitos e diarreia (Gilio e col., 1991, Oliveira e Linhares, 1999; Linhares, 2000).

A presença de diarreia, vômitos e febre ocorre de forma mais grave entre os casos de diarreia aguda por RVs, quando comparados aos de outra etiologia (Linhares e col., 1989; Stewien e col., 1991; Urrestarazu e col., 1999). Os episódios diarreicos por RVs, geralmente permanecem de 5-8 dias, evoluindo para um quadro de diarreia persistente em lactentes e em pacientes desnutridos. A excreção do vírus pode permanecer, mesmo depois do desaparecimento dos sintomas, prolongando-se em indivíduos imunocomprometidos (Pickering e col., 1988).

No presente estudo a febre (67,4%), foi mais observada na faixa etária compreendida entre 12 e 24 meses e vômito entre 0 e 9 meses (76,2%).

Em relação a outras regiões do Brasil, quanto à frequência de febre e vômitos, houve semelhança dos percentuais encontrados em Natal, no Nordeste e em Vitória, na região Centro Oeste (Maranhão, 2001; Luz, 2002; Ribeiro e col., 2008).

A vacinação constitui uma intervenção primária de saúde pública (Carneiro e col., 2005; Bernstein, 2009), Determinados estudos indicam que a vacina induz a proteção tipo específica (Pérez-Schael e col., 1990; Hoshino e Kapikian, 2000). No entanto, outros não evidenciaram correlações entre proteção e anticorpos sorotipo específicos (Ward e col., 1992; Kapikian e col., 2001).

A partir de um surto, as diarreias por RVs tornam-se casos de notificação compulsória, e uma vacina eficaz seria a medida profilática de maior impacto, pois medidas higiênicas convencionais, tão importantes na profilaxia de gastroenterites por outros patógenos, no caso, parecem não surtir muito efeito na incidência da doença (Secretaria de Estado da Saúde de Alagoas, 2006).

No Brasil, assim como em Alagoas, em 2006, foi introduzida pelo Ministério da Saúde, vacina oral de rotavírus humano (VORH), licenciada e comercializada internacionalmente, no ano de 2004, com o nome de Rotarix. Trata-se de uma vacina oral, monovalente, atenuada, preparada com vírus humano, para conservar a capacidade imunogênica (Secretaria de Estado da Saúde de Alagoas, 2006).

Dados informados pela Secretaria Estadual de Saúde, através do Programa de Imunização Nacional (PNI), em Alagoas, mostram que a cobertura vacinal contra

rotavírus em menores de 1 ano de idade foi de 31,61% (2006), 67,56% (2007), 68,18% e 75% (2009) (Secretaria de Estado da Saúde de Alagoas, 2010).

Quanto à baixa cobertura vacinal encontrada neste estudo, pode ser explicado pelo fato da vacina contra rotavírus ter sido implantada no país no início do ano de 2006, quando significativa parcela das crianças estudadas já estava fora do grupo-alvo.

Neste estudo, das 47 amostras, 26,2% informaram situação de vacinação contra o RVs, destas 66% foram vacinadas com 12,9% reagentes para RVs, e 34%, não vacinadas.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os RVs foram os agentes enteropatogênicos mais predominantes (19,1%), enquanto as bactérias foram freqüentes em 10,6% das amostras de fezes analisadas.
- As amostras de fezes Rotavírus reagente foram mais frequentes na faixa etária compreendida entre 0- 24 meses (42%).
- Não foi possível observar a ocorrência de um padrão sazonal.
- O vômito foi o sintoma mais frequente nas amostras RVs reagentes.
- A *E. coli* enteropatogênica foi a bactéria mais frequentemente isolada (10,6%).
- Outras bactérias enteropatogênicas também foram isoladas, como:
 - *Shigella flexneri* (15,8%);
 - *Salmonella Sp* (10,5%).
- A frequência de crianças vacinadas que foram RVs reagentes ainda foi elevada (12,9%), dado que mostra a necessidade de uma investigação mais detalhada sobre a efetividade da vacina, como também da presença de grupos diversos de RVs no estado de Alagoas.
- O estudo mostra também a necessidade sistemática e contínua no programa de Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas, principalmente em crianças na faixa etária entre 6-24 meses, onde houve uma maior incidência.
- Os estudos epidemiológicos sobre as infecções diarréicas infantis, no Brasil, têm evidenciado a importância dos agentes enteropatogênicos, no desenvolvimento das diarréias agudas, principalmente as causadas por rotavírus, especialmente daquelas mais graves. Neste contexto, faz-se necessária a implementação das medidas de vigilância epidemiológica das doenças diarréicas.

8. REFERÊNCIAS

- Abril FGM, Tigne DBY, Bello SE, Ospina JM. Agentes causantes de diarreia em niños menores de 5 años em Tunja, Colombia. Rev. Salud Pública. 2006;8(1): 88-97.
- Adonis-Koffy L, Akoua-Koffi C, Adja EA, Gnamien C, Timité-Konan M, Dosso M. Place Du Rotavirus em milieu pédiatrique hospitalier à Abidjan. Archives de Pédiatrie. 2009;16:1298-1301.
- Almeida MTG, Silva RM, Donaire LM, Moreira LE, Martinez MB. Enteropatógenos associados com diarreia aguda em crianças. J Pediatr 1998; 74:291-8.
- Amarilla A, Espínola EE, Galeano ME, Fariña N, Russomando G, Parra GI. Rotavirus infection in the Paraguayan population from 2004 to 2005; High incidence of rotavirus strains with electropherotype in children and adults. Med. Sci. Mont. 2007;13(7): CR333-337.
- Amorim RJM, Magalhães M, Andrade M, Silva GAP, Antas MG. Diarreia aguda associada a *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC) em crianças menores de 2 anos na cidade do Recife. J Pediatric. 1992;68:54-7.
- Andrade JAB, Oliveira JOT, Neto UF. Letalidade em crianças hospitalizadas com diarreia aguda – fatores de risco associados ao óbito. Rev. Ass. Med. Brasil, S. Paulo. 1999;45(2): 121-7.
- Andreasi MSA, Batista FM, Tozetti IA, Ozaki CO, Nogueira MM, Fiaccadori FS et.al. Rotavirus A em crianças de até três anos de idade, hospitalizadas com gastroenterite aguda em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2007;40(4):411-414.
- Baldacci ER, Candeias JAN; Breviglieri JC, Grisi, SJE. Etiologia viral e bacteriana de casos de gastroenterites infantil: uma caracterização clínica. Rev. Saúde públ. S. Paulo. 1979; 13:47-53.
- Barlow RS, Hirst RG, Norton RE, Ashhurst-Smith C, Bettelheim KA. A novel serotype of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) as a major pathogen in an outbreak of infantile diarrhea. J Med Microbiol. 1999; 48(12):1123-5.
- Bernstein DI. Rotavirus Overview. Pediatr Infect. Dis. J. 2009;28(3): S50-3.
- Brandt CD, Ardnt CW, Evans GL, Kim HW, Stallings EP, Rodrigues WJ, Parrot RH. Evaluation of a latex test for rotavirus detection. J.Clin Microbiol. 1987;25: 1800-2.
- Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K & Black RE, WHO estimates of the causes of death in children. Lancet. 2005;365(9465): 1147-52.
- Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. Lancet. 1973;2: 1281-3.

Brasil; Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença diarréica por rotavírus: Vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humano – VORH: informe técnico. Brasília: Ministério da Saúde. 2006;1-36.

Bresee J, Fanf ZY, Wang B, Nelson EA, Tam J, Soenarto Y, et al. First report from the Asian Rotavirus Surveillance Network. *Emerg Infect Dis*. 2004; 10(6):988-95.

Brunser O, Espinoza J, Brunser AM. Etiology of diarrhea: bacteria and parasites .In: Gracey M & Walker- Smith JA. *Diarrheal Disease*. Nestlé Nutrition Workshop Series Philadelphia. Vevey-Lippincott-Raven Publishers. 1997;38: 13-37.

Cáceres DC, Peláez D, Sierra, Estrada E, Sánchez L. La carga de La enfermedad por rotavírus en niños menores de cinco años, Colombia, 2004. *Rev. Saúde Pública*. Panamá. 2006;20(1): 9-21.

Campos GJV, Filho SAR, Silva AAM, Novochadlo MAS, Silva RA, Galvão CE S. Morbimortalidade infantil por diarreia aguda em área metropolitana da região Nordeste do Brasil, 1986-1989. *Rev. Saúde Pública*. São Paulo. 1995;29(2): 132-9.

Candeias JAN, Rosenberg CP, Racz, ML. Identificação por contraímunoelctroforese de rotavírus em casos de diarreia infantil. *Rev. Saúde públ. S. Paulo*. 1978; 12:99-103.

Candeias JAN, Fagundes Neto U, Racz ML, Pedra MA, Ferreira VC, Trabulsi L. Rotavírus identification in jejunal juice and stools of acute and chronic forms of infantile gastroenteritis. *Braz J Med Biol Res*. 1989; 22(7): 833-9.

Cardoso DDP, Martins RMB, Kitajima EW, Barbosa AJ, Camarota SCT, Azevedo MSP. Rotavírus e adenovírus em crianças de 0-5 anos hospitalizadas com ou sem gastroenterite em Goiânia – GO., Brasil. *Rev. Inst. Med Trop São Paulo*. 1992;34:433-9.

Cardoso DDP, Soares CMA, Souza MBLD, Azevedo MSP, Martins RMB, Queiróz DAO .Epidemiological features of rotavírus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, from 1986 to 2000. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2003;98(1):25-29.

Caprioli A, Pezzella C, Morelli R, Guglielmetti P, Piersimon C, Luzzi I. & The Italian Study Group on Gastrointestinal Infectious. Enteropathogens associated with childhood diarrhea in Italy. *J Pediatr Infect Dis*. 1996;15:876-83.

Carmo EH. Doença diarréica por rotavírus: magnitude, introdução da vacina e desafios para a vigilância. *Cad. Saúde Pública*. Rio de Janeiro. 2006;22(11): 2266-2267.

Carmona RC, Timenetsky MdoCST, Morillo SG & Richtzenhain LJ. Human rotavirus serotype G9, São Paulo, Brazil, 1996-2003. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12(6):963-8.

Carneiro NB, Santos DRD, Fagunde SQ, Neves, LL, Reges RMB, et al. Clinical and Epidemiological Aspects of Children Hospitalized with Severe Rotavirus-Associated Gastroenteritis in Salvador, BA, Brazil. 2005;BJID, 9.

Carraro E, Perosa AHS, Siqueira I, Pasternak J, Martino MDV. Rotavirus infection in children and adult patients attending in a tertiary hospital of São Paulo, Brazil. *The Brazilian Journal of Infections Diseases*. 2008;12(1):44-46.

Cauás RC, Falbo AR, Correia, JB, Oliveira KMM, Montenegro FMU. Diarréia por rotavírus em crianças desnutridas hospitalizadas no Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira, IMIP. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*. Recife. 2006;6(Supl. 1): 577-583.

Coiro JRR, Heuser MCF, Vasconcellos VL, Bendati MMA, Almeida Neto AJ, Rosa Y. Rotavírus e bactérias associados a enterite aguda em crianças de Porto Alegre. *J Pediatr*. 1985;59:367-73.

Collins J, Candy DC, Starkey WG, Spencer AJ, Osborne MP & Stephen J. Disaccharidase activities in small intestine of rotavirus-infected suckling mice: a histochemical study. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1990;11(3): 395-403.

Cook SM, Glass , RI, Le Baron CW, Ho MS. Global seasonality of rotavirus infections. *Bull WHO*. 1990;68:171-7.

Costa FF, Luchs A, Cilli A, Morillo SG, Carmona RCC, Timenetsky MCST. Rotavírus em comunidades indígenas sul-americanas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. Rio de Janeiro. 2006;65(2): 73-77.

Costa PSS, Cardoso DDP, Grisi SJFE, Silva PA, Fiaccadori F, Souza, MBLD, Santos RAT. Infecções e reinfecções por Rotavírus A: genotipagem e implicações vacinais. *Jornal de Pediatria*. Rio de Janeiro. 2004a;80(2): 119-22.

Costa PSS, Grisi SJFE, Cardoso DDP, Fiaccadori FS, Souza MBLD, Santos R AT. Manifestações clínicas e epidemiológicas das infecções por rotavírus. *Pediatria*. São Paulo. 2004b;26(3): 151-8.

Constenla D, O’Ryan M, Navarrete MS, Antil L, Rheingans RD. Evaluación de costo-efectividad de la vacuna anti-rotavirus en Chile. *Rev Med Chile*. 2006; 134: 679-688.

Crawford SE, Patel DG, Cheng E, Berkova Z, Hyser JM, Ciarlet M, ET AL. Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model. *J Virol*. 2006;80(10):4820-32.

De Soysa I, Feachem RV. Interventions for o controlo f diarrhoeal diseases among rotavirus and cholera immunization. *Bull Who*. 1985;63: 569-83.

Diaz TJ, Olea NA, O’Ryan MG, Mamani MN, Galeno HA, Mora JR. Resultados de La vigilancia centinela de gastroenteritis por rotavirus em Chile. *Rev Chil Infect*. 2008;25(6): 453-456.

Espejo RT, Calderon E & Gonzalez N. Distinct reovirus-like agents associated with acute infantile gastroenteritis. *J Clin Microbiol*. 1977;6(5):502-6.

Estes MK. Rotaviruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, editors. *Fields Virology*. 4th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001;1426-1454.

Fagundes-Neto U, Reis JC, Sabbag NA, Oliva CAG. Diarréia aguda: evolução clínica em crianças. *Rev Paul Pediatr.* 1989;7: 27-34.

Fagundes-Neto U, Penna FJ. Diarréia Aguda. In: Fagundes-Neto U, Penna FJ, Wehba J. *Gastroenterologia Pediátrica.* 1991;163-77.

Fernandes JV, Fonseca SMD, Azevedo JCV, Maranhão HS, Fonseca MHM, Dantas MT, Meissner RV. Detecção de rotavírus nas fezes de crianças com diarréia aguda. *J Pediatr.* 2000;76: 300-4.

Fischer TK, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus vaccines and the prevention of hospital-acquired diarrhea in children. *Vaccine.* 2004;22(Suppl 1):S49-54.

Fischer TK, Nielsen NM, Wohlfahrt J & Paerregaard A. Incidence and cost of rotavirus hospitalizations in Denmark. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(6): 855-9.

Flewett TH, Arias CF, Avendano LF, Ghafoor A, Mathan MM, Mendis L, Moe K, Bishop RF. Comparative evaluation of the Who and dakopatts enzyme – linked immunoassay *kits* for rotavirus detection. *Bull Who.* 1989;67:369-74.

Forster J, Guarino A, Perez N, Moranga F, Román E, Mory O ET AL. Hospital-based surveillance to estimate the burden of rotavirus gastroenteritis among European children younger than 5 years of age. *Pediatrics.* 2009;(123): 393-400.

Gabbay YB, Morais MA, Alves AS, Oliveira KK. Detecção de rotavírus por imunocromatografia: ensaio simples e de rápida execução. *Revista Paranaense de Medicina.* Paraná. 2005;19(1):13-18.

Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, ET AL. Identification of group A rotavirus gene 4 types by Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30(6):1365-73.

Gilio AE, Terra CM, Fenerich TC, Baldacci ER, Okay Y, Issa RMN, Moreira AF. Etiologia da diarréia aguda em crianças do sub-distrito do Butantã atendidas ambulatorialmente em hospital geral. *Pediatrics.* São Paulo. 1991; 13:68-70.

Glass RI, Bresee JS, Parashar UD, Jiang B, Gentsch J. The future of rotavirus vaccines: a major setback leads to new opportunities. *Lancet.* 2004;363 (9420):1547-50.

Glass RI, Kilgore PE. Etiology of acute viral gastroenteritis. In: Gracey M e Walker-Smith JA. *Diarrheal Disease.* Nestlé Nutrition Workshop Series. Vevey/Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia. 1997;38: 39-54.

Glass RI, Parashar UD. The promise of new rotavirus vaccines. *N Engl J Med.* 2006;354(1):75-7.

Glass RI, Parashar UD, Bresee JS, Turcios R, Fischer TK, Widdowson MA, Jiang B & Gentsch JR. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. *Lancet.* 2006;368 (9532):22, 323-32.

Gomes DKM, Lucena MC, Barros, MG. 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. RBAC. 2005;37(4): 257-259.

Gomes TAT, Rassi V, Macdonald KL, Ramos SRT, Trabulsi LR, Vieira MAM, Guth EC, Candeias JAN, Ivey C, Toledo MRF, Blake PA, Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. J Infect Dis.1991;164:331-7.

González R, Maronsky HS, Balebona E, Martínez JR, Serrano N, Schael IP. Estudio epidemiológico y clínico de las diarreas por rotavirus em niños menores de 5 años atendidos em centros asistenciales Del estado Miranda-Venezuela. Investigación Clínica. 2008;49(4): 499 – 510.

González RG, Nava EP, Acosta NV, Barbosa PA. Incidência de *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli* enteropatógena (1986-1993), em El Instituto Nacional de Pediatría. Labacta 1995;7:97-102.

Gouveia V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B. Polimerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. J. Clin. Microbiol. 1990;28(2):276-82.

Gracey M. Diarrhea and malnutrition: a challenge for pediatricians. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1996;22(1): 6-16.

Gusmão RHP, Mascarenhas JDP, Gabbay YB, Lins-Lainson Z, Ramos FLP, Monteiro TAF, ET AL. Rotaviruses as a cause of Nosocomial, infantile diarrhoea in Northern Brazil: Pilot Study. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 1995;90(6):743-9.

Gusmão RHP, Mascarenhas JD, Gabbay YB, Lainson ZL, Ramos FLP, Monteiro TAF, Valente B, Fagundes- Neto U, Linhares AC. Rotavirus subgroups, G serotypes, and electrophoretotypes in cases of nosocomial infantile diarrhoea in Belém, Brazil. J Trop Pediatr. 1999;45:81-6.

Gutierrez MF, Matiz A, Trespalacios AA, Parra M, Riano M, Mercado M. Vírus diversity of acute diarrhea in tropical highlands. Rev Latino Am Microbiol. 2006;48(1): 17-23.

Halaihel N, Lievin V, Alvarado F & Vasseur M. Rotavirus infection impairs intestinal brush-border membrane Na(+)-solute cotransport activities in Young rabbits. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2000;279(3): G587-96.

Hoshido M. Laboratory diagnosis of infectious diarrhea. Pediatric Annals. 1994;23:570-4.

Hoshino Y, Kapikian AZ. Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. J Health Popul Nutr. 2000; 18(1):5-14.

Ishak R, Gabbay YB, Ishak MOG. Comparação entre a prova do látex (Biolab-Mérieux) e o teste imunoenzimático (ELISA) na detecção de rotavírus nas fezes de crianças com diarreia. Rev. Bras. Pat. Clín. Belém. 1988;24(3).

Jourdan N, Brunet JP, Sapin C, Blais A, Cotte-Laffitte J, Forestier F, Quero AM, Trugnan G&Servin AL. Rotavirus infection reduces sucrose-isomaltase expression in human intestinal epithelial cells by perturbing protein targeting and organization of microvillar cytoskeleton. J Virol. 1998;72:7228-36.

Kale PL, Fernandes C, Nobre F. F. Padrão temporal das internações e óbitos por diarreia em crianças, 1995 a 1998. Rev. Saúde Pública. São Paulo. 2004; 38(1): 30-7.

Kalica AR, Greenberg HB, Espejo RT, Flores J, Wyatt RG, Kapikian AZ & Chanock RM. Distinctive ribonucleic acid patterns of human rotavirus subgroups 1 and 2. Infect Immun. 1981; (33):(3):958-61.

Kane EM, Turcios RM, Arvay ML, Garcia S, Bresee JS, Glass RI. The epidemiology of rotavirus diarrhea in Latin America. Anticipating rotavirus vaccines. Rev Panam Salud Publica. 2004;16(6):371-7.

Kang G, Iturriza-Gómara M, Wheeler JG, Crystal P, Monica B, Ramani S, ET al. Quantitation of group A rotavirus by real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction: correlation with clinical severity in children in South India. J Med Virol. 2004;73(1):118-22.

Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Editors. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins. 2001;2:1787-833.

Kavaliotis I, Papaevangelou V, Aggelakou V, Mantagou L, Trimis G, Papadopoulou V, Vlachaki G, Nikolakopoulou N & Konstantopoulos A. Rotascore Study: Epidemiological observational study of acute gastroenteritis with or without rotavirus in Greek children younger than 5 years old. Eur J Pediatr. 2008; Jul 25.

Keusch GT, Donohue-Rolfe A, Jacewicz M. *Shigella* toxin(s): description and role in diarrhea and dysentery. Pharmacol Ther 1982;15:403-38.

Kitagawa SMS, Toledo MRF, Trabulsi LR, Ramos SRTS, Murahovisch J, Fagundes-Neto U, Candeias JAN. Etiologia da diarreia infecciosa endêmica, da criança de baixo nível socioeconômico em São Paulo. Ver Paul Pediatr. 1989; 7:16-25.

Koh H, Baek SY, Shin JI, Chung KS, Jee YM. Coinfection of viral agents in Korean Children with acute watery diarrhea. J Korean Med Sci. 2008;23:937-40.

Leite JP, Alfieri AA, Woods PA, Glass RI & Gentsch JR. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. Arch Virol. 1996;141(12): 2365-74.

Levine MM, Dupont HL, Formal SB, Hornick RB, Takeuchi A, Gangarosa EJ, Snyder MJ, Libonati JP. Pathogenesis of *Shigella dysenteriae* (Shiga) dysentery. J Infect Dis. 1973;127:261-70.

Lima AAM, Moore SR, Barbosa Jr, MS, Soares AM, Schlepner MA, Newman, RD, Sears CL, Natarato JP, Fedororko DP, Wuhib T, Shorling JB & Guerrant R L. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: A prospective cohort study among children in Northeastern Brazil. *Journal of Infectious Diseases*. 2000;181: 1643-1651.

Linares RC, Barry AF, Alfieri AF, Médici KC, Feronato C, Grieder W, Alfieri AA. Frequency of group A rotavirus in piglet stool samples from non-vaccinated Brazilian pig herds. *Braz. Arch. Biol. Technol*. 2009;52: 63-68.

Linhares AC, Bresee JS. Rotavírus vaccines and vaccination in Latin América. *Pan Am. J. Pub. Health*. 2000;8(5):305-31.

Linhares AC, Lanata CF, Hausdorff WP, Gabbay YB, Black RE. Reappraisal of the Peruvian and Brazilian lower titer tetravalent rhesus-human reassortant rotavirus vaccine efficacy trials: analysis by severity of diarrhea. *Pediatr Infect Dis J*. 1999;18(11):1001-6.

Linhares AC, Pinheiro FP, Schmetz C, Muller G, Dietrich P. Rotavirus em Belém do Para, Brasil (nota prévia). *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1977;19:278-9.

Linhares AC, Pinheiro FP, Freitas RB, Gabbay YB, Shirley JA, Beards GM. An outbreak of rotavirus diarrhea among a nonimmune, isolated South American Indian community. *Am J Epidemiol*. 1981;113(6):703-10.

Linhares AC, Ferreira FS, Mauués BC, Benchimol JA, Gabbay BY. Prevalência de anticorpos para rotavirus em crianças diarréicas de Belém, Brasil. *R. Fundação SESP, Rio de Janeiro*. 1983;28(2):95-105.

Linhares AC, Gabbay YB, Freitas RB, Travassos da Rosa ES, Mascarenhas JDP, Loureiro ECB. Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. *Epidem Infect* 1989;102(1): 129-45.

Linhares AC, Gabbay YB, Mascarenhas JDP, Freitas RB, Oliveira CS, Bellesi N, Monteiro TAF, Lins-Lainson Z, Ramos FLP, Valente SA. Immunogenicity, safety and efficacy of rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belém, Brazil. *Bull Who* 1996;74:491-500.

Linhares AC. Rotavirus Infection in Brazil: Epidemiology, immunity and potential vaccination. *Braz J Infect Dis* 1997;1:284-93.

Linhares AC. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. *Cad. de Saúde Públ. Rio de Janeiro*. 2000; 16(3): 629-646.

Linhares AC, Villa LL. Vaccines against rotavirus and human papillomavirus (HPV). *J Ped. Rio de Janeiro*, 2006;82(3):S25-34.

López A A, Garcia JR, Garrido CP, Meca AA, Galarza PG, Miguel AG. Hospitalizations associated with rotavirus gastroenteritis in Spain, 2001-2005. *BCM Public Health*. 2008;8:109.

Loulizi KS, Khélifi HG, Rougemont A, Chouchane S, Sakly N, Balay KA et al. Acute infantile gastroenteritis associated with human enteric viruses in Tunisia. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;1349-1355.

Lourenço MH, Nicolas JC, Cohen J, Scherrer R, Bricout F. Study of human rotavirus genome by electrophoresis: Attempt of classification among strains isolated in France. *Ann Inst. Pasteur. Virologie. Paris*. 1981;132(2): 161-73.

Lundgren O & Svensson L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes Infect*. 2001; 3(13): 1145-56.

Luz CR. Pesquisa de agents enteropatogênicos nas fezes de lactentes com diarreia aguda em São Luís – MA. São Paulo. 2002.

Luz CR, Mascarenhas JD, Gabbay YB, Motta AR, Lima TV, Soares LS, ET AL. Rotavirus serotypes and electropherotypes identified among hospitalised children in São Luís, Maranhão, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2005; 47(5):287-93.

Magalhães M, Andrade M, Carvalho AE. Pathogenic *Escherichia coli* associated with infantile diarrhea. *Rev Microbiol*. 1981;12: 38-41.

Magalhães M, Linhares MI, Andrade GP, Aca I, Takeda Y, Okuzawa E, Tateno S. Microbiologia da diarreia aguda endêmica em crianças do Recife. *Ver IMIP* 1990;4:23-8.

Maranhão HS. Diarreia aguda: Aspectos clínicos-epidemiológicos, evolução nutricional e isolamento de enteropatógenos em lactentes na cidade de Natal, Nordeste do Brasil [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo.

Mascarenhas JPD, Linhares AC. Rotavirus gastroenteritis and the urgent need for a vaccine in developing countries. *Postgrad Doct Carib*. 2005;21(5):152-61.

Mascarenhas JDP, Linhares AC, Gabbay YB, Lima CS, Guerra, SFS, Soares L S. Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and Young children in Belém, Brasil . *Jornal de Pediatria*. 2006.

Mast TC, Mercon CD, Kelly CM, Floyd LE, Walter EB. The impact of rotavirus gastroenteritis on the family. *BMC Pediatrics*. 2009;9:11.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Patógenos emergentes e reemergentes veiculados pela água e alimentos e detectados em espécimes clínicos. 2005.

Ministério da Saúde. Informe Técnico. Doenças Diarréicas por Rotavírus: Vigilância Epidemiológica e Prevenção pela Vacina Oral de Rotavírus. Brasília-Brasil. Março. 2006.

Moreno ACR, Filho AF, Gomes TAT, Ramos STS, Montemor LPG, Tavares VT, Filho LS, Irino K, Martinez MB. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. *Diagnostic Microbiology and Infections Disease*. 2010;66: 50-57.

Moyo SJ, Gro N, Kirsti V, Matee MI, Kitundu J, Maselle SY et al. Prevalence of enteropathogenic viruses and molecular characterization of group A rotavirus among children with diarrhea in Dar es Salaam Tanzania. BMC Public Health. 2007;7:359.

Notario R, Borda N, Gambade T, Sutich E. Species and serovars of enteropathogenic agents associated with acute diarrheal disease in Rosário, Argentina. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1996; 38(1):5-7.

Ogunsanya TI, Rotimi VO, Adenuga A. A study of the aetiological agents of childhood diarrhoeae in Lagos, Nigéria. J Med Microbiol. 1994;40(1): 10-4.

Oliva CAG, Scaletsk I, Morais MB, Fagundes-Neto U. Diarréia aguda grave associada à *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC): características clínicas e perdas fecais em lactentes hospitalizados. Rev Ass Med Brasil. 1997; 43: 283-9.

Oliveira CS, Linhares AC, Mascarenhas JDP, Freitas RB, Gabbay YB, Monteiro TF. Gastroenterites infantis por rotavirus. Temas de pediatria 1994;55:4-22.

Oliveira CS, Linhares AC. Rotavirus: aspectos clínicos e prevenção. J Pediatr 1999;75:S91-S102.

Osmo AA, Araújo MCK, Barison E, Gilio AE, Bernabé ALBC, Carneiro RG, Costa MTZ, Manissadjian A, Mamizuka E. Estudo etiológico de 252 casos de diarréia aguda internados no hospital universitário da universidade de São Paulo. Pediatr. 1983;5:175-83.

Oplustil CP, ZCM, Tobouti NR, Sinto SI. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. Sarvier. São Paulo. 2000;10: 78-81.

O' Ryan MD. The ever-changing landscape of rotavirus serotypes The Pediatric Infectious Disease Journal. 2009;28(3).

Orlandi PP, Magalhães GF, Matos NB, Silva T, Penatti M, Nogueira PA, Silva LHP. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). Brazilian Journal of Medical Biological Research. 2006;39(4):507-517.

Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. Emerg Infect Dis. 2006;12(2):304-6.

Penaranda ME, Cubitt WD, Sinarachatanant P, Taylor DN, Likanonsakul S, Saif L, et al. Group C rotavirus infections in patients with diarrhea in Thailand, Nepal, and England. J Infect Dis. 1989; 160(3):392-7.

Pereira HG, Azeredo RS, Leite JPG, Barth OM, Suttmoller F, Farias V, et al. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), imuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1983;78(4):483-90.

Pereira HG, Linhares AC, Candeias JAN, Glass RI. National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. *Bull Pan Am Health Organ.* 1993;27(3):224-33.

Perez JN, Reis LFL, Gotijo JG. Participação de rotavírus e adenovírus na diarreia aguda da infância, em Belo Horizonte. *Rev Microbiol. São Paulo.* 1988; 180-3.

Perez-Schael I, Garcia D, González M, Gonzalez R, Daoud N, Perez M, et al. Prospective study of diarrheal diseases in Venezuelan children to evaluate the efficacy of rhesus rotavirus vaccine. *J Med Virol.* 1990;30(3):219-29.

Perez-Schael I, Salinas B, Gonzales R, Salas H, Ludert JE, Escalona M, Alcala A, Rosas MA & Materan M. Rotavirus mortality confirmed by etiologic identification in Venezuela children with diarrhea. *Pediatr Infect Dis J.* 2007; .26 (5):393-7.

Phan GT, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Detection and Genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan. *Journal of Virology.* 2007; 4645-4653.

Phillips G, Lopman B., Tam CC, Gomara MI, Brown D., Gray J. Diagnostico de rotavírus A associados a IID: Using ELISA to identify a cut – off real time RT-PCR. *Journal of Clinical Virology.* 2009; 44: 242-245.

Pickering LK, Bartiet AV, Reves RR, Morrow A. Asymptomatic excretion of rotavirus before and after rotavirus diarrhea in children in day care centers. *J Pediatrics.* 1988; 112: 261-365.

Pinto PSA. Aspectos sanitários da salmonelose como uma zoonose. *Hig aliment* 2000;14:39-43.

Pontual JPS, Falbo AR, Gouveia JS. Estudo etiológico da diarreia em crianças hospitalizadas no Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira, IMIP, em Recife, Pernambuco. *Ver Bras. Saúde Matern. Infant, Recife,* 2006; 6 (Supl 1): S11-S17.

Rahman M, Sultana R, Ahmed G, Nahar S, Hassan ZM, Saiada F et al. Of Prevalence G2P[4] and G12P[6] Rotavirus, Bangladesh. *Emerging Infectious Diseases.* 2007;13(1).

Ramani, S e Kang G, Burden of disease & molecular epidemiology of group A rotavirus infections in India. *Indian J Med Res.* 2007; 125(5):619-32.

Ramig RF. Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection. *Journal of Virology.* 2004;78(19): 10213-10220.

Reither K, Ignatius R, Weitzel T, Korkor AS, Anyidoho L, Saad E et al. Acute childhood diarrhea in northern Ghana: epidemiological, clinical and microbiological characteristics. *BCM Infectious Diseases.* 2007;7: 104.

Rheingans RD, Constenla D, Antil L, Innis BL, Breuer T. Economic and health burden of rotavirus gastroenteritis for the 2003 birth cohort in eight Latin American and Caribbean countries. *Rev Panam Salud Pública.* 2007;21 (4).

Ribeiro LR, Giuberti RSO, Barreira DMPG, Saick KW, Leite JPG, Miagostovich MP et al. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2008;103(2): 2001-2006.

Richardson S, Grimwood K, Gorrel R, Palombo E, Barnes G, Bishop R. Extended excretion of rotavirus after severe diarrhoeae in young children. *Lancet.* 1998;351(9119): 1844-8.

Santos Filho L. *Manual de Microbiologia Clínica.* 2. ed. João Pessoa. Editora Universitária. UFPB, 2001;247.

Santos JS, Alfieri AF, Leite JPG, Skraba I, Alfieri AA. Molecular Epidemiology of the human group A Rotavirus in the Paraná State, Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2008;51(2): 287-294.

Santos N, Gouvea V. Infecções por rotavirus: Aspectos atuais. *J Bras Patol* 1997;33:94-102.

Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol.* 2005;15(1): 29-56.

Sartori AMC, Valentin J, de Soárez PC, Novaes HDM. Rotavirus morbidity and mortality in children in Brazil. *Rev Panam Salud Pública.*2008;23(2):92-100.

Schmitz LG, Inhan Tm, Teixeira JMS, Tanus R, Turnes O, Fagundes-Neto U. Etiologia da diarréia aguda em Brasília. *Rev Paul Pediatr.* 1992;10:61-7.

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

Secretaria de Estado da Saúde de Alagoas. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Monitorização das Doenças Diarréicas Agudas. Impresso IV. Alagoas. 2006.

Secretaria de Estado da Saúde de Alagoas. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Monitorização das Doenças Diarréicas Agudas. Impresso IV. Alagoas. 2008.

Secretaria de Estado da Saúde de Alagoas – Programa de Imunizações – PNI/API – Série Histórica do Imunobiológico contra rotavírus. 2010.

Silva T, Nogueira PA, Magalhães GF, Grava AF, Silva LHP, Orlandi PP, Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2008;103(7): 731-733.

Souza CE, Martinez MB, Taddei CR, Mukai L, Gílio AE, Racz ML, Silva L, Ejzenberg B, Okay Y. Perfil etiológico das diarréias agudas de crianças atendidas em São Paulo. *Jornal de Pediatria.* Rio de Janeiro. 2002;78(1): 31-38.

Soriano-Gabarro M, Mrukowicz J, Vesikari T & Verstraeten T. Burden of rotavirus disease in European Union countries. *Pediatr Infect Dis J.* 2006; 25(1): S7-S11.

Stewien KE, Cunha LCF, Alvim AC, Filho RSA, Alvim MAB, Brandão AAP, Neiva MNR. Rotavirus associated diarrhoea during infancy in the city of S. Luís Luís (MA), Brazil: A two-year longitudinal study. *Rev. Inst. Med.Trop. São Paulo.* 1991;33(6): 459-464.

Stewien KE, Mehnert DU, Hársi CM, Stewien ETM, Candeias JMG, Tanaka K. Serotypes and eletropherotypes of human rotavirus detected in the city of São Luis (Ma), Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 1994;27(6):1355-61.

Taniguchi K, Urasawa S. Diversity in rotavirus genomes. In: *Seminars in Virology.* 1995;6:123-31.

Tcheremenskaia O, Marucci G, Petris SD, Ruggeri FM, Dovecar D, Sternak SL. Molecular epidemiology of rotavirus in Central and Southeastern Europe. *Journal of Clinical Microbiology.* 2007;2197-2204.

Teixeira JMS, Figueiredo RB, Santos HMP, Ferreira MNR, Câmara GNNL. Aspectos epidemiológicos das infecções por rotavirus no Distrito Federal, Brasil. *Ver Bras Med Trop* 1991;(24): 223-30.

Thapa BR, Ventkateswarlu K, Malik AK, Panigrahi D. Shigellosis in children from North India: A clinicopathological Study. *J Trop Pediatrics.* 1995;41: 303-7.

Toledo MRF, Alvariza MCB, Murahovschi J, Ramos SRTS, Trabulsi LR. Enteropathogenic *E.coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. *Infect Immun* 1983;39:586-9.

Urrestarazu MI, Liprandi F, Suárez EP, González R, Pérez-Schael I. Características etiológicas, clínicas y sociodemográficas de La diarrea aguda em Venezuela. *Rev Panam Salud Pública* 1999;(6):149-56.

Velázquez FR, Protective Effects of Natural Rotavirus Infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(3): S54-S56

Ward CW, Azad A, A e Dyal-Smith, ML. Structural homologies between RNA gene segments 10 and 11 from UK bovine, simian SA11, and human Wa rotaviruses. *Virology.* 1985;144:328-36.

Who Scientific Working Group Enteric infection due to *Campylobacter*, *Yersinia*, *Salmonella* and *Shigella*. *Bull Who* 1980;(58):519-37.