



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Marcela Cristina Braga Yassaka Germini

**Pesquisa de bactérias e vírus intestinais em
uma população infantil do Noroeste Paulista**

São José do Rio Preto
2012

Marcela Cristina Braga Yassaka Germini

Pesquisa de bactérias e vírus intestinais em
uma população infantil do Noroeste Paulista

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina de São
José do Rio Preto para obtenção do
Título de Mestre no Curso de Pós-
graduação em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dra. Andréa Regina de Souza Baptista

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado

São José do Rio Preto

2012

Germini, Marcela Cristina Braga Yassaka

Pesquisa de bactérias e vírus intestinais em uma população infantil do Noroeste Paulista.
São José do Rio Preto, 2012.
79 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP
Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profª. Dra. Andréa Regina de Souza Baptista
Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado

1.Creches; 2.Criança; 3.Epidemiologia; 4.Enterobactérias;
5.Enterovírus humanos; 6.Diarréia.

Marcela Cristina Braga Yassaka Germini

Pesquisa de bactérias e vírus intestinais em uma
população infantil do Noroeste Paulista

BANCA EXAMINADORA
DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Presidente e Orientador: Prof^a. Dra. Andréa Regina
de Souza Baptista

1º Examinador: Claudia Eli Gazetta

2º Examinador: Renilda Rosa Dias

1º Suplente: Silvia Helena Figueiredo Vendramini

2º Suplente: Natalia Sperli Geraldes Marin dos
Santos Sasaki

São José do Rio Preto, 31/07/12.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	vi
Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	viii
Resumo.....	xi
Abstract.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1 Justificativa.....	10
1.2 Objetivos.....	12
2. Material e Método.....	13
2.1 Desenho do estudo e população.....	14
2.2 Aspectos éticos.....	14
2.3 Análise laboratorial.....	15
2.4 Pesquisa de enterobactérias.....	15
2.5 Pesquisa de vírus entéricos.....	16
2.6 Análise estatística.....	19
3. Resultados.....	20
4. Discussão.....	25
5. Conclusão.....	31
6. Referências Bibliográficas.....	33
7. Apêndices.....	52

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Helio e Sonia, às minhas irmãs, Ana Paula e Ivy, e ao meu marido, Danilo, pelo amor eterno em todos os momentos, apoio incondicional, amizade e conselhos sempre importantes.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, amparo e coragem na realização dos meus sonhos;

Aos meus pais, Helio e Sonia, por eu existir. Pelo amor, pelas oportunidades que me propiciaram e pelo apoio constante, e principalmente pelo exemplo de dedicação e determinação para o alcance dos meus ideais. Minha admiração e eterna gratidão.

À Prof^a. Dr^a. Andréa Regina de Souza Baptista, meus sinceros agradecimentos, pela orientação competente, confiança e ensinamentos profissionais valiosos, além de mostrar novos caminhos para minha carreira, pela oportunidade concedida e pelo incentivo e cobrança. Minha eterna gratidão;

Ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado, pela co-orientação, oportunidade, ensinamentos e paciência. Minha eterna gratidão;

Ao meu marido Danilo Alessandro Germini pelo companheirismo, solidariedade, paciência e amor;

Às minhas irmãs Ana Paula e Ivy pela presença, torcida e apoio incondicional em todas minhas conquistas;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da FAMERP pela contribuição em minha formação científica e profissional;

Ao Diretor da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Prof. Dr. Humberto Liedtke Junior e ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da FAMERP, Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile pela oportunidade de desenvolver o meu trabalho nesta Instituição.

À Prefeitura de São José do Rio Preto - Secretaria de Educação - Departamento de Convênios Escolas de Período Integral, em nome da Prof^a. Dra. Telma Antonia Marques Vieira, por aceitar que realizássemos esta pesquisa na Creche de Educação Infantil Professora Neide Egêa Laguna.

À Direção e funcionários da Escola, pela ajuda no desenvolvimento deste estudo, em especial à Coordenadora Greice.

À Edna Castro, minha amiga em todos os momentos, pelas ideias compartilhadas, pelo aprendizado, e cuja eficiência foi fundamental à realização deste trabalho. Muito obrigada pela amizade além do profissional e a tudo o que passamos juntas.

À Cecília S. Ceregatti Camolezi e à Fabiana Santos do Centro de Investigação de Microrganismos pela coleta das amostras;

Às funcionárias do laboratório CIM/FAMERP e amigas, Valéria Fraga e Luciana Moran, pessoas muito especiais, que me ajudaram muito e me apoiaram sempre durante esta caminhada.

À Ana Carolina Musa Gonçalves, minha sincera gratidão, pelo estímulo, colaboração, parceria e principalmente pela amizade.

A todos os funcionários, professores e alunos do Centro de Investigação de Microrganismos que direta ou indiretamente, colaboraram para que eu pudesse realizar este trabalho.

À Dr^a. Joana Darc Mascarenhas e Yvonne Gabbay do Setor de Virologia do Instituto Evandro Chagas - Pará, pela análise viral.

Aos funcionários da Câmara de Pós Graduação em especial ao Luiz Henrique, que sempre me atenderam com gentileza e competência.

Às famílias das crianças participantes do projeto por colaborarem e acreditarem na ideia e em nossos objetivos.

Agradecimentos v

Aos meus colegas de trabalho, por compreenderem a dificuldade de conciliar trabalho, laboratório e estudo;

Aos membros examinadores da Banca de Qualificação, Prof^a. Dr^a. Cláudia Cesarino e Prof^a. Dr^a. Beatriz Barco pelo incentivo, carinho e pelas valiosas correções e sugestões.

Aos membros examinadores da Banca de Defesa pela avaliação final deste trabalho.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Jamais poderemos compreender o que o outro espera de nós e o que esperamos do outro, mas ainda é preferível fazer mesmo errando, a nada fazer pelo medo de errar.”

(Anônimo)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Indicadores sociais, de higiene e os hábitos alimentares da população de crianças avaliada em uma creche da rede pública de ensino do município de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo	22
Tabela 2. Frequência de microrganismos detectados nas fezes de 100 crianças de uma creche da rede pública de ensino do Noroeste paulista, de acordo com a faixa etária	23
Tabela 3. Associação entre a presença de bactérias e vírus segundo aspecto fecal	24

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS	Organização Mundial de Saúde
WHO	Organização Mundial de Saúde
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica clássica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasora
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>E. coli</i> entero-hemorrágica
DAEC	<i>E. coli</i> de adesão difusa
RV	Rotavírus
HCV	Calicivírus humano
NV	Norovírus
SV	Sapovírus
HAstV	Astrovírus humano
AdV	Adenovírus entéricos
G1P[8]	Genótipo Rotavírus
G2P[4]	Genótipo Rotavírus
P[8]	Genótipo Rotavírus
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1

EAggEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
CIM	Centro de Investigação de Microrganismos
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
DRS XV	Departamento Regional de Saúde XV
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DIFCO	Meio de cultura
Lac+	Colônias fermentadoras de lactose
Lac-	Colônias não fermentadoras de lactose
SS	Salmonela Shigela
EPM	Meio de cultura
MILI	Meio de cultura
H₂S	Ácido Sulfídrico
TSA	Tryptic Soy Agar
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase precedida de transcrição reversa
MON	Pares de iniciadores
RT	Transcriptase reversa
DNA	Ácido dextronucléico
cDNA	DNA complementar
bp	Pares de base

PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
dsRNA	Ácido ribonucléico de fita dupla
HuCVs	Calicivírus humano
ORF	Fase aberta de leitura (open reading frame)
ssRNA	RNA fita simples
ul	Microlitro
UV	Ultravioleta

RESUMO

Introdução: A diarréia infecciosa aguda infantil é um dos maiores problemas de saúde enfrentado pelos países em desenvolvimento e tem sua incidência aumentada em crianças que frequentam creches. **Objetivo:** Avaliar a possível associação de enteropatógenos bacterianos e virais com a diarréia em uma população infantil de uma creche pública do município São José do Rio Preto – SP, pela equipe do Centro de Investigação de Microrganismos (CIM) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). **Material e Método:** A equipe do Centro de Investigação de Microrganismos (CIM) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) efetuou a coleta e o processamento de 100 amostras fecais, provenientes de 50 crianças sadias (grupo controle) e de outras 50 crianças que apresentaram material fecal com aspecto compatível à clínica diarréica. Para análise bacteriológica, parte do material fecal foi utilizado em meio de transporte Cary Blair, com imediata semeadura as amostras foram semeadas em meio Ágar MacConkey (DIFCO), Ágar SS (DIFCO), em caldo Tetratonato, anterior à semeadura em em Ágar Verde Brilhante (DIFCO) e em Ágar Columbia (DIFCO) com carvão ativado. A técnica de aglutinação a partir de uma suspensão bacteriana foi utilizada para a identificação tipagem sorológica das enterobactérias. Para análise viral, uma alíquota do material fecal obtido foi congelada a -70 graus Celsius e, posteriormente, encaminhada ao Setor de Virologia do Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Estado do Pará. Para detecção dos Astrovírus e

Formatado: Espaçamento entre linhas: 1,5 linhas

Calicivírus ~~foram-foi~~ realizadas por RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase via transcriptase reversa). ~~Já Aa~~ detecção dos rotavírus foi ~~realizada-efetuada~~ por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em tampão Tris-glicina, e ~~o seu~~ perfil ~~de~~ genômico ~~de—rotavírus foi—~~ definido após

eletroforese do RNA fita dupla (dsRNA) extraído em géis verticais s_s

de ~~_~~ bisacrilamida-acrilamida a 5%. **Resultados e Discussão?**: Não houve diferença quanto ao gênero entre os dois grupos, com ~~ligeira maior representação maior frequência~~ do sexo feminino 52 (52,0%). A faixa etária variou de seis meses a sete anos de idade (média de 1,6 anos). As bactérias mais frequentes na população ~~são foram~~ 38 ~~cepaseases~~ de *E. coli* (38%), ~~assim distribuídas: sendo~~ EPEC (~~_~~ 12%), EIEC ~~_~~ (3%), ~~*Pseudomonas spp.* :~~ (2%) e *E. coli* O157 (~~_~~ 1%). ~~Heuve também~~ Catorze ~~14~~ crianças apresentaram ~~casos de~~ colonização ~~mista por mista de~~ *Enterobacter* e *E. coli* (14,1%). Os vírus entéricos circulantes ~~nessas população infantil~~ ~~crianças~~ são o Norovírus (2%) e o Astrovírus (1%). A presença de Norovírus e Astrovírus está ~~tradicionalmente~~ associada ~~com àa~~ população residente em área urbana. O consumo de alimentos fora da creche e do domicílio foi indicativo ~~dae~~ presença de enteropatógenos. Os agentes bacterianos e virais detectados não estão associados aos casos de diarréia na população estudada. **Conclusão:** Os dados obtidos neste estudo demonstram que as crianças que frequentam creches são portadores assintomáticas de potenciais agentes patogênicos, fato este merece investigação adicional nesta ~~região~~ ~~área~~, bem como em outras ~~regiõesdo país~~. Este estudo contribuirá para a criação de estratégias efetivas de prevenção, controle e tratamento, melhorando assim a condição de vida do grupo em estudo.

Formatado: Fonte: Itálico

Formatado: Fonte: Itálico

Formatado: Fonte: Itálico

Formatado: Fonte: Itálico

Formatado: Fonte: Itálico

Palavras-chaves: 1. Creches; 2. Criança; 3. Epidemiologia; 4. Enterobactérias; 5. Enterovírus humanos; 6. Diarréia.

ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction – Childhood acute infectious diarrhea is one of the biggest health problems faced by developing countries and its incidence has been increased in children who attend daycare. **Objective** – To evaluate the possible relation between bacterial and viral enteropathogens with diarrhea in a children population of a public daycare in São José do Rio Preto city – São Paulo state.

Material and methods – The group of Microorganisms Investigation Center (CIM) of the Medicine College of São José do Rio Preto (FAMERP) collected and processed 100 fecal samples of 50 healthy children (control group) and other 50 children who presented fecal material with compatible aspect to diarrheic clinic. Stool samples were transported in Cary–Blair transport media for bacterial analysis. All specimens were examined on the day of collection according to standard bacteriologic procedures. Briefly, suggestive bacterial colonies were isolated from McConkey, Salmonella–Shigella, brilliant green (after enrichment in tetrathionate broth), and Columbia agar. Isolates identified by biochemical tests were serotyped by standard techniques (EPM-Milli and Oxidase stripes plus commercially available antisera; PROBAC, Brazil). For a viral analysis, an aliquot of the obtained fecal material was frozen under -70 degrees Celsius and, afterwards, conducted to the Virology Section of the Institute Evandro Chagas, Ananindeua, Pará state. The identification of the

astrovirus and calicivirus was done by RT-PCR (Polymerase chain reaction, through reverse transcriptase). Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was carried out in Tris-glycine buffer and rotavirus genome profile was defined

following electrophoresis of extracted dsRNA through vertical 5% acrylamide bisacrylamide gels. **Results and discussion** – There was no difference concerning the gender between the two groups, with a slight higher representation of female 52 (52,0%). The age group ranged from 6 months to 7 years old (an average of 1,6 years). The most frequent bacteria in the population was 38 strains of *E.coli* (38%), distributed like this: EPEC (12%), EIEC (3%), *Pseudomonas spp.* (2%) and *E.coli* O157 (1%). Fourteen children presented mixed colonization of *Enterobacter* and *E.coli* (14,1%). The circulating of enteric viruses in the children population are the Norovirus (2%) and Astrovirus (1%). The presence of Norovirus and Astrovirus is traditionally associated with the urban area inhabitants. The food intake out of the daycare and home indicated the presence of enteropathogens. The bacterial and viral agents detected are not associated with the diarrhea occurrence in the studied population. **Conclusion:** The results obtained in this study demonstrated that the children who attend daycare are asymptomatic carriers of potential pathologic agents, this fact deserves further investigation in this area, as well as in other country areas. This study will be useful for creating effective strategies of prevention, control and treatment, in order to improve the life condition of the group in this work.

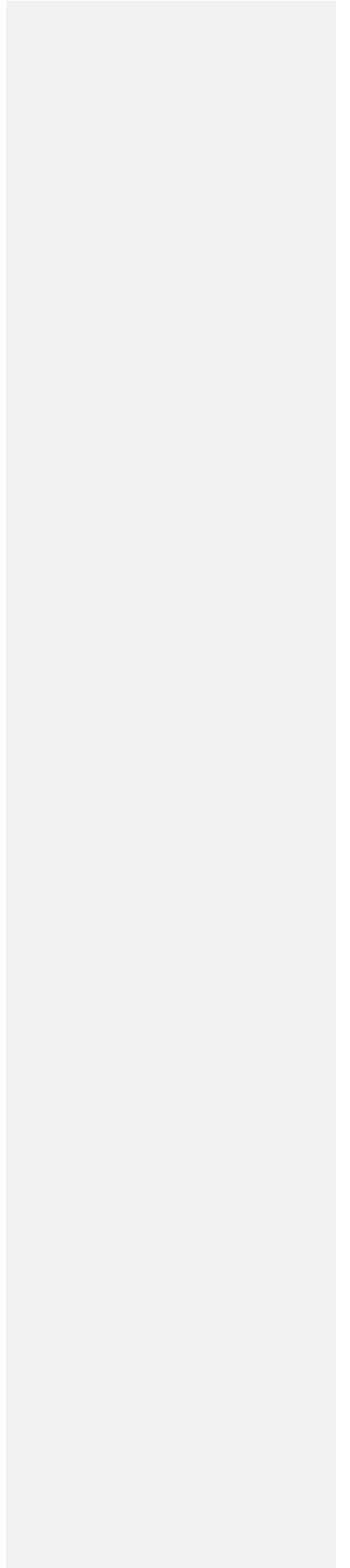
Key-words: 1. Daycare; 2. Children; 3. Epidemiology; 4. Enterobacteria; 5. Human enterovirus; 6. Diarrhea.

Formatado: Recuo: À esquerda: 0 cm

Formatado: Recuo: À esquerda: 0 cm

Formatado: Recuo: À esquerda: 0 cm

|



Continuação

Formatado: À esquerda, Recuo: À esquerda: 0 cm

Formatado: À direita

1. INTRODUÇÃO

Formatado: Recuo: À esquerda: 0 cm

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a diarreia continua sendo a segunda principal causa de morte entre crianças menores de cinco anos no mundo, seguida pela pneumonia com 17% dos casos.⁽¹⁾ Tal gravidade se dá em razão do processo de desnutrição infantil desencadeado pela ação negativa desse fenômeno sobre a digestão, a absorção e o metabolismo.⁽²⁾ As complicações mais frequentes da diarreia infantil decorrem da desidratação e do desequilíbrio hidroeletrolítico. A médio e longo prazos, as repetições dos episódios de diarreia podem levar à desnutrição crônica, com retardo do desenvolvimento ponderal e, até mesmo, perturbação do desenvolvimento cognitivo.⁽³⁾

A diarreia infecciosa aguda infantil é um dos maiores problemas de saúde enfrentado pelos países em desenvolvimento, porém de ocorrência universal, e que atinge pessoas de todas as classes sociais.⁽⁴⁾ A cada ano, cerca de 2,5 bilhões de casos de diarreia ocorrem entre crianças menores de cinco anos de idade, e as estimativas sugerem que a incidência global tem permanecido relativamente estável nas últimas duas décadas.^(1,5) Mais da metade desses casos estão na África e no Sul do Continente Asiático, onde episódios de diarreia mais frequentemente resultam em morte.⁽¹⁾

Apesar da redução substancial dos índices adversos relacionados à morbi-mortalidade por diarreia infantil nas décadas de 80 e 90 com o advento da terapia de reidratação oral, implantada desde 1980 pela WHO, os números continuam preocupantes.^(6,7,8,9) Mais de um bilhão de episódios de diarreia

ocorrem a cada ano, entre crianças menores de cinco anos de idade.^(5,10) De fato, tal afecção é considerada uma síndrome frequente, estando entre as principais causas de consultas médicas, internação hospitalar e de letalidade, principalmente nos países em desenvolvimento.⁽¹¹⁾

A relevância epidemiológica da doença diarreica infantil é contabilizada também pela diferença entre os países desenvolvidos, nos quais a frequência de quadros diarreicos por criança é de apenas 0,5 a 2 episódios por lactente/ano e aqueles em desenvolvimento onde pode atingir até mais de 10 episódios/ano.⁽¹²⁾ Ao reunir a Ásia (excluindo a China), a África e a América Latina é possível atingir um total anual de 4,5 a 6 milhões de crianças menores de cinco anos que morrem em consequência da diarreia. A ausência de água potável, o saneamento inadequado e/ou a má higiene são indicadores comuns dessas localidades e a OMS atribue 88% dos casos de diarreia no mundo aos mesmos.⁽¹⁾

No Brasil, apesar das limitações do sistema de informações, devido a diarreia não ser uma doença de notificação compulsória, a doença diarreica foi responsável por 17,3% de todos os óbitos infantis registrados no período de 1985-1987 tendo sido observada, contudo, acentuada queda no período de 2003-2005 (4,2%).⁽¹³⁾ Segundo dados disponíveis no Datasus (DATASUS, 2009), o Brasil apresenta altas taxas de internação e óbitos por diarreia em menores de cinco anos, correspondendo a uma média de 119.489,75 internações e 378,25 óbitos durante o período de 2000 a 2003, sendo registrada, nos últimos anos, diminuição progressiva dos registros de óbitos e internação por diarreia, principalmente em menores de 1 ano de idade.⁽¹⁴⁾

A prevalência da doença no Brasil varia grandemente em face da região considerada entre 5,9% a 15,4% nas regiões Sul e Nordeste, respectivamente.⁽¹⁵⁾ No Estado de São Paulo a diarreia foi responsável por 55 casos de óbitos infantis em 2009.⁽¹⁶⁾

Além dos problemas enumerados, como mencionado anteriormente, a situação se agrava na população pediátrica, sobretudo até os cinco anos de idade, em razão dos hábitos higiênicos precários, da ausência de imunidade a infecções e reinfecções e da dependência de cuidados alheios.⁽¹⁷⁾ A incidência de doença diarreica em crianças menores de 3 anos de idade e que frequentam creches é aumentada em 30 a 50%; sendo que o ingresso recente está associado a um risco ainda maior.⁽¹⁸⁾ Isso por que em lactentes e pré-escolares que frequentam creches, o contato interpessoal íntimo entre crianças muito pequenas, resulta na exposição de indivíduos suscetíveis aos micro-organismos patogênicos, geralmente disseminados por aquelas que são portadoras assintomáticas.⁽¹⁹⁾ Na maioria das vezes, o risco de um agente infeccioso ser introduzido em uma creche está diretamente relacionado com sua prevalência na população na qual a creche está inserida e com o número de indivíduos suscetíveis na mesma. Crianças pequenas frequentemente são portadoras assintomáticas de vários agentes causadores de doenças infecciosas e parasitárias, servindo como reservatórios comunitários. Aglomerados de crianças tornam-se, então, focos de multiplicação de casos de doenças transmissíveis e de disseminação das mesmas para a comunidade circundante.⁽²⁰⁾ Estas instituições apresentam fundamental importância no cuidado de pré-escolares desde que as mulheres começaram a aumentar sua

participação no mercado de trabalho e as crianças passaram a ficar, muitas vezes, de 6 a 8 horas, cinco dias por semana, nestas instituições.^(21,22) Portanto, uma criança é deixada aos cuidados de pessoas, que pode não ser tão vigilantes como a mãe e/ou seus responsáveis.⁽²³⁾

Diversos agentes podem envolver a etiologia das diarreias, como vírus, bactérias e parasitos. Os enteroparasitos têm sido amplamente estudados, no entanto, os agentes bacterianos são relativamente mais importantes em países em desenvolvimento, enquanto os agentes virais são mais relevantes em países industrializados. A importância desses agentes está relacionada com as condições de higiene e saneamento básico da população.⁽²⁴⁾

Os micro-organismos são transmitidos por contato direto, pessoa a pessoa, ou indireto, por fômites, ingestão de água ou alimentos contaminados. Vários fatores podem contribuir para infecções intestinais: a duração do aleitamento materno, a alimentação, a contaminação ambiental, a educação, o trabalho materno, o local de residência, a renda familiar, o peso do bebê ao nascer, o acesso à água tratada e o saneamento básico, as variações sazonais e, em especial, a idade do hospedeiro. Favorecem o aumento de incidência da diarreia por etiologia bacteriana os seguintes fatores: idade reduzida, deficiências nutricionais, práticas inadequadas de higiene física e alimentar, desmame precoce, aglomerações no domicílio e institucionais, ausência de saneamento básico nos locais de permanência, acesso a coleções hídricas contaminadas e período quente do ano (verão).^(12,25)

A grande diversidade de indicadores sociais, econômicos, climáticos e características geográficas do Brasil tem sido relatada em vários estudos como

fatores críticos que modulam a frequência dos diferentes enteropatógenos causadores de diarreia e seus agentes etiológicos.⁽²⁶⁻²⁸⁾

O perfil etiológico da diarreia da criança tem sofrido alterações em anos recentes, com a identificação de vários micro-organismos distintos.⁽²⁹⁻³²⁾ Além disso, outras alterações relevantes deste perfil decorreram da reavaliação do papel diarreiogênico de muitas cepas de *Escherichia coli*, antes consideradas não patogênicas. É amplamente reconhecida a importância da *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC) para a diarreia da criança, porém outras cinco categorias são reconhecidas como enteropatogênicas: *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC) e *E. coli* de adesão difusa (DAEC).^(33,34) Essas diferentes biovariedades desta enterobactéria, consideradas frequentes causadoras de diarreia em crianças, segundo alguns autores, foram ainda pouco estudadas em nosso país.⁽³⁵⁻³⁷⁾ No Brasil, os agentes bacterianos que mais comumente causam diarreia são: a EPEC, a ETEC, a *Shigella* spp., a *Salmonella* spp., o *Campylobacter* spp., e *Yersinia enterocolitica*.⁽³⁸⁻⁴⁰⁾

Os vírus são importantes agentes etiológicos da diarreia em criança. Do ponto de vista clínico, a doença diarreica causada por vírus dificilmente pode ser diferenciada da causada por bactérias, sendo um processo auto-limitado de diarreia e vômito, com duração aproximada de 1 a 7 dias.⁽⁴¹⁾ Atualmente, considera-se que a maioria das gastroenterites infantis seja causada por vírus pertencentes a quatro diferentes famílias: *Reoviridae* (rotavírus), *Caliciviridae* (norovírus e sapovírus), *Astroviridae* (astrovírus) e *Adenoviridae* (adenovírus).

Outros vírus como coronavírus, torovírus, picobirnavírus e vírus aichi também têm sido relacionados com gastroenterites em humanos.^(42,43)

Os enteropatógenos virais são reconhecidos como os mais importantes agentes etiológicos relacionados com quadros de gastroenterite aguda em comunidades e outras localidades, incluindo instituições semifechadas e hospitais.⁽⁴⁴⁾

Os astrovírus (HAstV) são considerados importantes enteropatógenos e estão associados a surtos diarreicos envolvendo crianças jovens e outros grupos etários em todo o mundo.⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾ A infecção pelo HAstV ocorre com maior frequência em crianças menores de três anos de idade, a diarreia é acometida em 72-100% dos casos, sendo geralmente autolimitada, com duração de dois a três dias. Cerca de 50% dos casos apresentam dor abdominal, 20-70% vômito, 20-25% febre e 30% algum grau de desidratação com até 5% de desidratação grave. Do total de crianças com gastroenterite aguda causadas por HAstV, 6% são hospitalizadas com o período de permanência no hospital de até seis dias.⁽⁴⁸⁾

O rotavírus (RV) é o principal agente etiológico causador de diarreia aguda em crianças, responsáveis por mais de 600.000 óbitos por ano,⁽²⁴⁾ além do significativo impacto econômico causado pela doença diarreica por RV.⁽⁴⁹⁾ No Brasil, as infecções por RV causavam aproximadamente 3,5 milhões de episódios de diarreia, 655.853 consultas ambulatoriais, 92.453 hospitalizações e 850 óbitos de crianças < 5 anos por ano antes da introdução da vacina contra o RV.⁽⁵⁰⁾

Os rotavírus (RV) têm sido descritos como os principais responsáveis pela diarreia em crianças menores de cinco anos, seguido pelos calicivírus humano (HCV) - norovírus (NV) e sapovírus (SV) -, astrovírus humanos e adenovírus entéricos (AdV). Recentemente, diversos estudos apontam os NV e os HAstV como importantes agente etiológicos deste agravo.⁽⁴¹⁾

Em 2006, uma vacina atenuada G1P[8] foi incluída no Programa Nacional de Imunização, prevenindo a gastroenterite grave por RV e induzindo uma redução significativa na frequência de detecção do RV em crianças com gastroenterite.⁽⁵¹⁾ A eficácia da vacina RIX4414 foi avaliada por Araujo e colaboradores, demonstrando 53,9-81,5% de proteção contra casos graves, e 81,2-93% de proteção contra hospitalização devido a gastroenterite causada por RV em crianças.⁽⁵²⁾

Recentemente, relatou-se uma alta prevalência de G2P[4] associada a essa vacinação no Brasil,⁽⁵³⁾ sugerindo que essa vacina monovalente possivelmente criou condições em que o genótipo G2P[4] poderia ter adquirido vantagem seletiva sobre genótipos P[8]. Morillo e colaboradores demonstraram que o genótipo G2P[4] foi a única cepa observada em 2007 durante uma vigilância de genótipos de RV em crianças < 5 anos com gastroenterite aguda provenientes de creches no Estado de São Paulo por um período de 5 anos.⁽⁵⁴⁾ Entretanto, investigações mais detalhadas sobre a proteção heterológica conferida pela vacina monovalente contra o RV são pontos centrais para entender seu comportamento imunológico.^(52,55)

Surtos por norovírus têm sido associados com enfermarias, escolas, navios cruzeiros, acampamentos, restaurantes e instalações militares.^(56,57) Entre os vírus, os norovírus (NV) são a principal causa de gastroenterite aguda não bacteriana em humanos em nível mundial, responsável por 80-90% dos surtos notificados.⁽⁵⁸⁾ Embora o NV tenha sido o primeiro vírus claramente associado à gastroenterite aguda, a impossibilidade de cultivá-lo subestimou a importância da infecção por NV em gastroenterite aguda, e dificultou a realização de estudos epidemiológicos. Dessa forma, a importância do NV como agente etiológico da gastroenterite aguda tanto em casos esporádicos como em surtos só pode ser estabelecida após o desenvolvimento de métodos moleculares para a sua detecção.^(59,60) O vírus é transmitido através de alimentos e água contaminados ou pessoa-a-pessoa pelo contato via fecal-oral. Esses vírus são altamente contagiosos e infecções podem ocorrer em casos esporádicos ou em grandes surtos de diarreia aguda em enfermarias de hospitais, escolas, universidades, acampamentos, cruzeiros, hotéis e restaurantes.⁽⁶¹⁾ As manifestações clínicas se caracterizam por náusea, dor abdominal, vômito, diarreia branda, autolimitada e não sanguinolenta. Porém, alguns pacientes podem apresentar formas graves, com sintomas ligados a náuseas e vômitos seguidos de diarreia abundante, que pode acarretar em desidratação e, eventualmente, morte.⁽⁶²⁾

Caracterizar o perfil etiológico da diarreia que acomete crianças nos primeiros anos de vida permite estabelecer políticas locais de vigilância, tratamento e profilaxia das doenças diarreicas. Neste sentido, tem sido estudadas as diarreias em diferentes regiões rurais e urbanas, classes

socioeconômicas, estações climáticas, faixas etárias e pacientes com características específicas.^(37,63)

1.1 JUSTIFICATIVA

A doença diarreica está claramente associada à pobreza e às condições ambientais e educacionais que com ela coexistem. É frequentemente encontrada em crianças, o que pode dificultar a qualidade de vida das mesmas, acarretando desnutrição e, em muitos casos, levando à morte estes pacientes pela desidratação. Contudo, até o momento, não existem estudos sistemáticos sobre a etiologia bacteriana e viral da diarreia nessa população já que a grande maioria está restrita à pesquisa de enteroparasitos.

Estudos prévios na Região do Noroeste Paulista com adultos soropositivos para o HIV-1 encontrou associação entre o Calicivírus e a *Giardia lamblia* como agentes etiológicos da diarreia,⁽⁶⁴⁾ enquanto que, em crianças soropositivas para o HIV-1 o *Cryptosporidium parvum*, foi o patógeno mais comumente encontrado, seguido por *Candida albicans*, *E. coli* enteropatogênica e astrovírus. No entanto, nenhuma associação com este distúrbio gastrointestinal foi verificada.⁽⁶⁵⁾ Ademais, estudo de caso-controle realizado com crianças menores de 5 anos de idade, atendidas no Ambulatório Pediátrico do Hospital de Base de São José do Rio Preto, verificou que a *Shigella* sp., *Salmonella* sp. e amostras diarreiogênicas de *E. coli* (EPEC, ETEC, EAaggEC, EIEC) foram as bactérias que mais contribuíram como causa de diarreia, durante todo o ano.⁽³⁷⁾

O fato da população infantil não apresentar o sistema imunológico completamente formado, confere maior suscetibilidade para o estabelecimento desta doença, além de favorecer a ocorrência de patógenos outros que não

aqueles clássicos em sua etiologia. Estudos que considerarem a epidemiologia dessa doença em crianças contribuirão para a criação de estratégias efetivas de prevenção, controle e tratamento, melhorando assim a condição de vida do grupo em estudo.

1.2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a associação de enteropatógenos bacterianos e virais com a diarreia em uma população infantil de uma creche pública do município São José do Rio Preto, região Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil.

Objetivos Específicos

Tendo por base a população acima mencionada, são objetivos específicos do presente trabalho:

- Avaliar a frequência de enterobactérias e vírus entéricos;
- Correlacionar a presença dos enteropatógenos às variáveis epidemiológicas pesquisadas;
- Avaliar a possível associação da manifestação diarreica com os microrganismos avaliados.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1 Desenho do Estudo e População Avaliada

O estudo foi uma avaliação prospectiva, de caso controle, realizada no período de Agosto de 2009 a Novembro de 2010, pela equipe do Centro de Investigação de Microrganismos (CIM) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo. Foram incluídas, no presente estudo, crianças que frequentaram diariamente e em período integral a creche pública, vinculada à prefeitura municipal de São José do Rio Preto, SP e localizada no distrito **III** da DRS XV. Além disso, foram incluídas aquelas que apresentaram manifestação clínica sugestiva de diarreia no período descrito. O mesmo número de crianças, saudáveis, pareadas por idade e sexo, da mesma instituição de ensino foram incluídas a título de constituir a população controle.

Os dados sobre as condições gerais de saúde e informações epidemiológicas da população estudada foram obtidos por meio de um instrumento aplicado pelo pesquisador em entrevista junto aos pais (Anexo 1). Neste constavam perguntas sobre as condições físicas, tais como a ocorrência de febre, dor abdominal, vômito, além da investigação de indicadores sociais e de higiene como fonte de água, esgoto, consumo de alimentos e co-habitação com qualquer espécie animal, entre outras.

2.2 Aspectos Éticos

Os pais ou responsáveis pelas crianças incluídas no presente estudo foram convidados à participação via informação detalhada em entrevista com

os pesquisadores envolvidos, com subsequente assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, sob o protocolo CEP nº 6332/2009.

2.3 Análise Laboratorial

Uma amostra fecal foi obtida de cada uma das crianças incluídas neste estudo. A mesma foi acondicionada em frasco coletor estéril e em meio de transporte Cary Blair que foram imediatamente enviadas ao CIM para análise bacteriológica. Uma alíquota de cada amostra foi congelada em frasco estéril em freezer a -70 graus Celsius e, posteriormente, encaminhada ao Setor de Virologia do Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Estado do Pará, a fim de realizar a análise viral.

2.4 Pesquisa de Enterobactérias

A partir do Cary Blair as amostras foram semeadas em meio Ágar MacConkey (DIFCO), Ágar SS (DIFCO), caldo Tetracionato, anterior à semeadura em Ágar Verde Brilhante (DIFCO) e Ágar Columbia (DIFCO) com carvão ativado. A triagem das colônias bacterianas foi feita isolando-se da placa de crescimento primário cinco colônias fermentadoras de lactose (Lac+ -

McConkey) e duas a três colônias não fermentadoras de lactose (Lac-, MacConkey, SS e Verde Brilhante), quando apresentavam-se morfológicamente diferentes.^(64,65)

As enterobactérias foram identificadas a partir das metodologias clássicas previamente descritas.⁽⁶⁶⁾ Resumidamente, cinco colônias de bactérias fermentadoras de lactose (lac+) e uma de cada tipo distinto, não fermentadora desse dissacarídeo (lac-), isoladas em placa McConkey, foram repicadas nos três meios de identificação (EPM, MILI e Citrato de Simmons). O meio EPM foi utilizado para verificação de produção de H₂S, urease, L-triptofano-desaminase e gás a partir da fermentação de glicose. O meio MILI indicou motilidade, produção de Indol e de lisina-descarboxilase. Uma colônia (lac-) de cada tipo isolada nas placas de SS e verde Brilhante foi repicada para os mesmos meios de identificação.

A técnica de aglutinação a partir de uma suspensão bacteriana, obtida do crescimento da superfície do meio EPM, foi utilizada para a identificação sorológica (PROBAC, Brasil) das enterobactérias e, em casos duvidosos, a partir do TSA (Tryptic Soy Agar), segundo técnica preconizada por Ewing (1986).⁽⁶⁷⁾

2.5 Pesquisa de Vírus Entéricos

Para realização de testes de detecção molecular dos vírus foi congelado e armazenado uma alíquota de cada amostra fecal, previamente diluída em água para a investigação de parasitos. Resumidamente, foi

extraído RNA viral de fita simples.^(68,69) A reação em cadeia da polimerase por ação da transcriptase reversa (RT-PCR) para HAstV foi realizada usando os pares de iniciadores Mon 269 e Mon 270 e as condições de amplificação descrito por Noel et al. (1995),⁽⁷⁰⁾ exceto para a reação de transcriptase reversa (RT), onde foi usado um iniciador randômico hexamer pd (N) 6-50 A260; (Amersham Biosciences, Freiburg, Alemanha) para obtenção do DNA complementar (cDNA). Os produtos obtidos por RT-PCR foram aplicados em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio e fotografados em aparelho Gel Doc 1000 (BioRad, Hercules, CA). Amostras que apresentaram fragmento específico de 449 bp, foram consideradas positivas para HAstVs. A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) foi realizada em tampão Tris-glicina, e o perfil do genômico do rotavírus foi definido após eletroforese do RNA fita dupla (dsRNA) extraído em géis verticais de bisacrilamida-acrilamida 5%, como descrito previamente.⁽⁷¹⁾

Para a detecção de Calicivírus humanos (HuCVs) foram aplicados métodos moleculares utilizando par de primers (p289/290) baseado na sequência de RNA polimerase.⁽⁷²⁾

Obtenção de amplificação do RNA viral

O ssRNA viral foi extraído de 300 µL de uma suspensão fecal a 10% utilizando sílica/tiocianato de guanidina, conforme descrito por Boom et al,⁽⁶⁹⁾ incluindo modificações introduzidas por Cardoso et al.⁽⁷³⁾ Na reação de transcriptase reversa foi usado um iniciador randômico [hexamer pd (N) 6-50 A260 units; Amersham Biosciences] para obtenção do cDNA. Foi realizada a reação de

PCR usando os pares de iniciadores Mon 269/270 (região ORF2) para os HstVs⁽⁷⁰⁾ e p289/290 (região da RNA polimerase) para os HuCVs.⁽⁷⁴⁾ Os produtos obtidos por RT-PCR foram aplicados em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio e fotografados em aparelho Gel Doc 1000 (BioRad). As amostras que apresentaram fragmentos específicos de 449 pb, 319 pb e 331 pb, foram consideradas positivas para HstVs, NoVs e SaVs, respectivamente. Amostras positivas para HstVs e HuCVs e água Milli-Q estéril foram incluídas em todas as reações como controles positivos e negativo, respectivamente. Algumas amostras que apresentaram baixa concentração de produto (bandas fracas) com os iniciadores para HuCVs também foram testadas com os iniciadores Mon 432/434 e Mon 431/433 (região da RNA polimerase), específicos para os NoVs dos genogrupos GI e GII, respectivamente.⁽⁷⁵⁾

Sequenciamento dos Amplicons de HstVs, HuCVs E NoVs obtidos por RT-PCR

Os produtos foram purificados com o "kit" de extração de gel QiaQuick® (QIAGEN), conforme orientação do fabricante, e quantificados em gel de agarose a 1% com o marcador de peso molecular "Low DNA Mass Ladder" (Invitrogen). As sequências de nucleotídeos foram determinadas por ciclo direto usando o "Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (Applied Biosystems) com os iniciadores Mon 269 e Mon 270 para HstVs, p289 e p209 para HuCVs e Mon 431/433 e Mon 432/434 para NoVs. Os fragmentos amplificados foram purificados por precipitação com isopropanol

(60 e 70%). Os produtos foram analisados no sequenciador automático "3130X/Genetic Analyzer" (AB Applied Biosystems/Hitachi).

2.6 Análise Estatística

Para determinar a significância estatística entre os grupos estudados foi utilizado o teste do Qui-quadrado (χ^2) e o Teste Exato de Fischer através do programa estatístico BIOSTAT versão 5.0. O nível de significância adotado foi de 5%.

3. RESULTADOS

Do total de 320 amostras previstas para análise, houve um retorno de 100 amostras fecais, sendo 50 no grupo controle e 50 alunos que apresentaram material fecal com aspecto compatível à clínica diarreica. Não houve diferença quanto ao gênero entre os dois grupos, com maior frequência do sexo feminino 52 (52,0%). A faixa etária variou de seis meses a sete anos de idade (média de 1,6 anos de idade).

A Tabela 1 sumariza indicadores sociais, de higiene e os hábitos alimentares da população de crianças avaliadas em uma creche da rede pública de ensino do município de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo. A maioria das crianças utilizava água tratada (88%) e apresentava rede de esgoto em suas residências (98%). Nenhuma associação significativa foi observada entre estas variáveis e a diarreia (grupos caso e controle) ou mesmo quanto ao consumo de alimentos crus e a presença de animais domésticos. Associação significativa foi observada quanto ao consumo de alimentos fora da residência e da creche e a ocorrência de diarreia ($p = 0,0053$).

Do total de amostras fecais estudadas, 99% resultaram no isolamento de bactérias. De um total de 246 bactérias, 129 pertenciam ao grupo diarréico e 117, ao grupo controle. Desse total, 44 crianças apresentavam uma bactéria isolada, 37 crianças apresentavam 2, 17 crianças apresentavam 3 e uma criança apresentava 4 bactérias. Foram encontrados 73 cepas *E. coli*, 19 cepas de *Enterobacter* (19,1%), uma cepa de *Alcaligenes* (1,01%) e *Proteus* (1,01%) na população estudada. Houve também 14 casos de colonização mista de *Enterobacter* e *E. coli* (14,1%). Foram isolados 3% de vírus das amostras fecais do grupo estudado, com duas cepas de Norovírus (2%) e uma de

Astrovírus (1%), ambos em crianças com manifestação clínica sugestiva de diarreia. A presença dos vírus detectados foi exclusiva entre as crianças que residem na área urbana ($p < 0,0001$).

Os indivíduos participantes foram classificados em faixas etárias de: <2 anos ($n=86$), 3 a 5 anos ($n= 11$) e 6 a 7 anos ($n= 3$). A ocorrência de bactérias segundo agrupamento da faixa etária está apresentada na tabela 2. A maior incidência foi encontrada nas crianças entre 3 a 5 anos de idade e a menor, na faixa etária acima de cinco anos de idade.

Tabela 1. Indicadores sociais, de higiene e os hábitos alimentares da população de crianças avaliada em uma creche da rede pública de ensino do município de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo.

Variáveis	Grupo Caso	Grupo Controle	Valor de P
	(n= 50)	(n= 50)	
Fonte de Água na residência			
Reservatório Público	44	44	-
Outras	6	6	
Animal Doméstico			
Sim	22	25	0,6886*
Não	28	25	
Rede de Esgoto na residência			
Sim	50	48	0,4751**
Não	0	2	
Consumo de alimentos crus			
Sim	35	30	0,4017*
Não	15	20	
Alimentação fora da residência e creche			
Sim	23	09	0,0053*
Não	27	41	

*Qui-Quadrado; ** Teste Exato de Fischer

Tabela 2 - Frequência de micro-organismos detectados nas fezes de 100 crianças de uma creche da rede pública de ensino do Noroeste paulista, de acordo com a faixa etária.

Bactérias e Vírus	Faixa Etária						P
	< 2 anos		3 - 5 anos		6-7 anos		
	n = 86	%	n = 11	%	N = 3	%	
<i>Acinetobacter</i>	1	1,17	-	-	-	-	0,2204
<i>EPEC*</i>	12	13,9	8	72,7	-	-	<0,0001
<i>EIEC**</i>	1	1,17	3	27,2	-	-	<0,0001
<i>E. coli O:157</i>	-	-	3	27,2	-	-	<0,0001
<i>Pseudomonas</i>	1	1,17	5	45,4	-	-	<0,0001
Astrovirus	1	1,17	-	-	-	-	0,2204
Norovirus	1	1,17	1	9,09	-	-	0,5381

*E. coli clássica poli A, poli B e poli C

Teste Exato de Fischer

**E. coli invasora poli A e invasora B

Na estratificação das amostras em grupos diarreicos e não diarreicos foi investigada a relação entre o aspecto fecal e a presença de enterobactérias ou vírus entéricos, entretanto, nenhuma significância estatística foi encontrada (Tabela3).

Tabela 3 - Associação entre a presença de bactérias e vírus segundo aspecto fecal.

Bactérias e Vírus	Diarréicas N= 50 (%)	Não Diarréicas N= 50 (%)	Valor de P*
<i>Acinetobacter</i>	-	1	1,0000
<i>EPEC</i>	12	8	0,4533
<i>EIEC</i>	3	1	0,6098
<i>E. coli O157</i>	1	2	1,0000
<i>Pseudomonas</i>	2	4	0,6737
Norovirus	2	0	0,4751
Astrovirus	1	0	1,0000

*Teste Exato de Fischer

4. DISCUSSÃO

Os agentes bacterianos que mais comumente causam diarreia, no Brasil, são *E. coli* (linhagens diarreiogênicas), *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* e a *Yersinia enterocolitica*.⁽³⁸⁻⁴⁰⁾

Os resultados obtidos mostraram a presença de EPEC, EIEC, *E. coli* O157 e *Pseudomonas* em ambos os grupos, no entanto, nenhuma associação com a diarreia foi observada. Curiosamente, resultados similares foram observados em estudo de caso-controle prévio com a população infantil HIV-1 positiva da região, onde foi observado a presença de EPEC e EIEC em ambos os grupos.⁽⁶⁵⁾ Entretanto, a diarreia esteve associada à presença dessas enterobactérias em uma população infantil atendidas no Ambulatório de Pediatria do Hospital de Base de São José do Rio Preto – SP.⁽³⁷⁾ Por outro lado, estudo realizado por Gonçalves e colaboradores⁽⁶⁴⁾ demonstraram em uma população adulta para HIV-1 positiva de São José do Rio Preto, que a presença de EPEC não esteve associada com o aspecto fecal. Este fato nos faz acreditar que perfis diferentes destas bactérias circulam na população e, portanto, as mesmas podem representar risco de diarreia nesta população. De fato, a literatura demonstra que a EPEC é um importante agente causador de diarreia nos grandes centros urbanos de países subdesenvolvidos, tanto no Brasil^(63,76,77,78) como em outros países.^(79,80) Esta ausência de associação com o aspecto fecal aqui observada pode estar relacionada com o tamanho amostral avaliado, bem como com a virulência dos isolados detectados.

As infecções intestinais provocadas por *E. coli* enteroinvasora (EIEC) são raras, sendo mais frequentes em crianças maiores de dois anos de idade e em adultos,⁽⁸¹⁾ fato observado em nosso estudo. Embora não muito frequente

esta bactéria é definitivamente patogênica, e seus fatores de virulência são praticamente idênticos aos de *Shigella*.⁽⁸¹⁾ Os resultados obtidos sublimam a necessidade de um estudo mais aprofundado de fatores de virulência, tais como adesão, invasão e toxinas, seguido pela genotipagem das bactérias.

Apenas uma cepa de *Acinetobacter* foi detectada no grupo não diarreico. Realmente, são escassos os dados na literatura que associam esta enterobactéria com gastroenterites. Estudo realizado na Venezuela⁽⁸²⁾ sugere que o *Acinetobacter* pode representar um mecanismo patogênico na população infantil. No entanto, esta bactéria tem sido mais associada à com bacteremia, infecções pulmonares e outras infecções nosocomial.⁽⁸³⁾

Com relação aos agentes virais, foram encontrados somente 3% no grupo diarreico, sendo 2% Norovírus e 1% Astrovírus. A taxa de detecção do NV tem variado de 6% na China à 23% no Japão, sendo o GII/4 o mais frequentemente detectado mundialmente.⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾ Em um estudo retrospectivo realizado em uma creche no Rio de Janeiro, com crianças menores de cinco anos de idade e apresentando quadro de gastroenterite aguda, a ocorrência variou de 23% a 67%. Além disso, evidenciou-se o NV(GII) como responsável por três dos quatro surtos estudados com a ocorrência variando de 23% a 67%.⁽⁸⁷⁾ Alguns estudos na Argentina, Brasil, Vietnã e Peru têm demonstrado que após os RV, os HAstV e NV se alternam como os mais importantes agentes etiológicos da gastroenterite infantil aguda.^(73,88-92)

De fato, os NV causam surtos de gastroenterite em locais fechados como restaurantes, clínicas, navios, militares, creches e hospitais afetam indivíduos de todos os grupos etários e variam de extensão atingindo pequenos

grupos ou resultando em epidemias com mais de 6000 pessoas infectadas.^(61,93) Apesar de não termos conseguido associar a presença destes vírus com a diarreia, sua presença se fez evidente na população estudada. Cabe salientar que a transmissão do NV é muito eficiente, com rápida dispersão durante surtos, principalmente devido à alta infecciosidade deste vírus já que um inoculo contendo de 10 a 100 vírions é suficiente para causar uma infecção. Pessoas infectadas podem transmitir o vírus após sua recuperação, pois continuam a eliminar partículas por até três semanas.^(94,95) A contaminação da água utilizada para consumo ou para atividades recreacionais pode servir como fonte primária de surto, uma vez que os NV são resistentes ao tratamento com cloro, podendo permanecer infecciosos por prolongados períodos neste ambiente.⁽⁹⁶⁾

No Brasil, alguns estudos demonstram que a ocorrência do HAstV varia de 3% a 11% em crianças de até cinco anos de idade com gastroenterite aguda.^(73,92) A ocorrência de 1% de HAstV observada no estudo encontra-se abaixo da faixa de detecção observado no país, bem como a verificada nos países desenvolvidos que varia de 2 a 11%, e de 2% a 26% naqueles em desenvolvimento.⁽⁹⁷⁻¹⁰⁰⁾ A incidência dos HAstVs nos quadros de gastroenterite aguda foi registrada a partir de diversos estudos conduzidos em países asiáticos e na Oceania (4% a 11%), África (2% a 9%), Continente Europeu (3% a 7%), América Latina (4% a 17%) e Estados Unidos (3% a 10%).⁽¹⁰¹⁾ Além disso, estudos demonstraram diferenças na taxa de detecção de HAstV em infecções esporádicas na comunidade e crianças hospitalizadas.^(100,102,103) O vírus tem sido associado com diarreia em indivíduos imunodeprimidos, diarreia

persistente e surtos diarreicos em escolas e hospitais.^(104,105) Fica, então, um alerta para esta comunidade, que pode estar diante de casos de portadores assintomáticos para estes dois enteropatógenos virais e, assim, desenvolver surtos de gastroenterite futuros. Cabe ressaltar, que a presença destes vírus apresentou associação significativa com a população residente em área urbana, fato que deve ser investigado com maior propriedade.

O rotavírus não foi detectado na amostra estudada. Esse vírus é amplamente conhecido pelos profissionais da saúde como agente causador de diarreia, com relação aos demais vírus. O fato de não ter sido detectado nenhum caso pode ser explicado pela alta cobertura vacinal (99%), segundo dados do painel de monitoramento de São José do Rio Preto de 2010.⁽¹⁰⁶⁾ De fato, os estudos sobre os agentes etiológicos associados à diarreia mostram que a importância relativa dos diferentes enteropatógenos varia grandemente dependendo da estação do ano, área de residência (urbana ou rural), classe sócioeconômica, localização geográfica e especialmente com a idade do hospedeiro.⁽¹⁰⁷⁻¹¹⁰⁾

As diferenças observadas com os nossos resultados podem ser devido ao fato da ampla diversidade das características geográficas, social, econômica e climática no Brasil, reportadas como fatores críticos na modulação da frequência dos diferentes enteropatógenos.⁽²⁶⁻²⁸⁾ Outro fator importante foi em relação ao pequeno número de amostras coletadas para o estudo, as quais não deram resultados significantes. Sem mencionar que a creche estudada é considerada modelo no município de São José do Rio Preto, pelo baixo índice

de patologias acometidas pelas crianças, alimentação de qualidade, ensino de qualidade e boas práticas de higiene e limpeza.

Se de um lado a diarreia é reconhecida como uma importante causa no quadro de morbi-mortalidade do país, do outro, a implantação de um sistema para sua vigilância encontra várias dificuldades. Primeiramente, sua incidência elevada impõe desafios concretos para seu registro; em segundo lugar, a inobservância da obrigatoriedade de notificação de surtos e a aceitação tanto de parte da população como de profissionais de saúde de que a ocorrência da diarreia é fato "normal" têm contribuído para o insucesso em seu controle e para a instalação de surtos inesperados de grandes proporções.⁽¹¹¹⁾ Associado a esta situação, os episódios de diarreia podem estar relacionados a outras doenças não infecciosas ou até mesmo por infecção de outros enteropatógenos, tais como parasitos, ou até mesmo por outros patógenos não investigados neste estudo.

Conclusão

5. CONCLUSÃO

- 1- As bactérias mais frequentes na população são 38 cepas de *E. coli*, sendo detectadas EPEC, EIEC, *E. coli* O157 e *Pseudomonas* em infecções simples e mistas.
- 2- Os enterovírus circulantes nas crianças da creche estudada são o Norovírus e o Astrovírus.
- 3- A presença de Norovírus e Astrovírus está associada com a população residente em área urbana.
- 4- O consumo de alimentos fora da creche e do domicílio foi indicativo de presença de enteropatógenos.
- 5- Os agentes bacterianos e virais detectados não estão associados aos casos de diarreia na população estudada.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO - World Health Organization 2009.
2. Guerrant RL, Bobak DA. Bacterial and protozoal gastroenteritis. *N Engl J Med* 1991;325:327-340.
3. Niehaus MD, Moore SR, Patrick PD, Derr L, Lorntz B, Lima AA, et al. Early childhood diarrhea is associated with diminished cognitive function 4 to 7 years later in children in a northeast Brazilian shantytown. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66(5):590-3.
4. Silva GAP, Lira PIC, Lima MC. Fatores de risco para doenças diarreicas no lactente. *Cad Saúde Pública*, RJ 2004;20(2):589-95.
5. Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The magnitude of global burden of diarrhoeal disease from studies published 1992-2000. *Bulletin of the World Health Organization* 2003;81:197-204.
6. Bhutta ZA. Persistent diarrhea in developing countries. *[Annales] Nestle* 2006; 64:39-48.
7. Bittencourt SA, Leal MC, Santos MO. Hospitalizações por diarreia infecciosa no estado de Rio de Janeiro. *Cad Saúde Pública* 2002;18(3):747-54.

8. Lima AAM, Moore SR, Barboza MS, Soares AM, Schleupner MA, Newman RD, et al. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. *J Infect Dis* 2000;181:1643-51.
9. World Health Organization, Diarrheal Diseases Control Programme. Impact of routine use of ORT in hospitals in 19 countries. *WHO Weekly Epidemiol Rec* 1984;63:49-52.
10. O'Ryan M, Prado V, Pickering LK. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. *Semin Pediatr Infect Dis* 2005;16:125-136.
11. Souza EC, Martinez MB, Taddei CR, Mukai L, Gilio AE, Racz ML, et al. Perfil etiológico das diarreias agudas de crianças atendidas em São Paulo. *J Pediatr* 2002;78(1):31-38.
12. Guerrant RL, Hughes JM, Lima NL, Crane J. Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special setting, and etiologies. *Rev Infect Dis* 1990;12(S):41S-50S.
13. DATASUS. Ministério da Saúde (BR). Informações de saúde. 2008; <http://www.datasus.gov.br>.

14. DATASUS. Ministério da Saúde (BR). Informações de saúde. 2009; <http://www.datasus.gov.br>.
15. Benicio MHD'A, César CLG, Gouveia MC. Perfil de morbidade e padrão de utilização de serviços de saúde das crianças brasileiras menores de cinco anos 1989. *In*: Monteiro MFC, Cervini R, organizadores. Perfil estatístico de crianças e mães no Brasil. Aspectos de saúde e nutrição de crianças no Brasil 1989. Rio de Janeiro: IBGE, Unicef; 1992. p. 79-96.
16. DATASUS. Ministério da Saúde (BR). Informações de saúde. 2011; <http://www.datasus.gov.br>.
17. Márquez AS, Márquez AS, Hasenack BS, Trapp EH, Guilherme RL. Prevalência de enteroparasitoses em crianças de um bairro de baixa renda de Londrina-Paraná. *Ciencia Biol Saúde* 2002;4:55-59.
18. Poit ML. Estudo epidemiológico de doença diarréica aguda em creches na região do grande ABC paulista [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1999.
19. Pickering LK, Bartlett AV, Woodward WE. Acute infectious diarrhea among children in day care: epidemiology and control. *Rev Infect Dis* 1986;8:539-47.

20. Overturf GD. Endemic giardiasis in the United States—role of the day-care center. *Clin Infect Dis* 1994;18:764-5.
21. Gurgel RQ, Cardoso GS, Silva AM, Santos LN, Oliveira RC. Creche: ambiente expositor ou protetor nas infestações por parasitas intestinais em Aracaju, SE. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38(3):267-9.
22. Carvalho TB, Carvalho LR, Mascarini LM. Occurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (São Paulo State, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis* and *Enterobius vermicularis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006;48(5):269-73.
23. Chirdan OO, Akosu JT, Adah SO. Intestinal parasites in children attending day care centers in Jos, Central Nigeria. *Niger J Med* 2010;19(2):219-22.
24. Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006;12:304-6.
25. Victora CG, Fuchs SC. Breast-feeding, nutritional status, and other prognostic factors for dehydration among young children with diarrhoea in Brazil. *Bull Wld Hlth Organ* 1992;70:467-75.
26. Cimerman S, Castañeda CG, Iuliano WA, Palacios R. Perfil das enteroparasitoses diagnosticadas em pacientes com infecção pelo vírus HIV na

era da terapia antiretroviral potente em um centro de referência em São Paulo, Brasil. *Parasit. Latinoamer* 2002;57:111-19.

27. Cardoso LV, Marques FR, Cavasisni CE, Almeida MC, Nair BA, Gongóra DVN, et al. Correlation of intestinal parasitic pathogens in HIV-seropositive adult with and without diarrhea in Northeast region of São Paulo State, Brazil. *Rev Panamer Infectol* 2004;6:8-11.

28. Rossit ARB, Gonçalves ACM, Franco C, Machado RLD. Etiological agents of diarrhea in patients infected by the human immunodeficiency vírus-1: A review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2009;51(2):59-65.

29. Johnson RH. Yersinia infections. *Curr Sci* 1992;5:654-8.

30. Timenetsky MCST, Kisielius JJ, Grisi SJFE, Escobar AMU, Ueda M, Tanaka I. Rotavírus, adenovírus, astrovírus, calicivírus e “small round virus particles” em fezes de crianças com e sem diarréia aguda, no período de 1987 a 1988, na Grande São Paulo. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1993;35:275-80.

31. Harsi CM, Rolim DP, Gomes AS, Gilio AE, Stewien KE, Baldacci ER, et al. Adenovirus genome types isolated from stools of children with gastroenteritis in São Paulo, Brazil. *J Med Virol* 1995;45:127-34.

32. Levine MM, Edelman R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of serotypes associated with infant diarrhea. *Epidemiology and Pathogenesis. Epidemiol Rev* 1984;8:31-61.
33. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Ver* 1998;11:142-201.
34. Scaletsky ICA, Pedroso MZ, Oliva CAG, Carvalho RLB, Morais MB, Fagundes-Neto U. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells that is associated with infantile diarrhea. *Infect Immun* 1999;67:3410-5.
35. Guerrant RL, Hughes JM, Lima NL, Crane J. Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special setting, and etiologies. *Rev Infect Dis* 1990;12(S):41S-50S.
36. Kitagawa SMS, Toledo MRF, Trabulsi LR, Ramos SRTS, Murahovich J, Fagundes-Neto U, et al. Etiologia da diarréia infecciosa endêmica da criança de baixo nível sócio-econômico em São Paulo. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35:1013-22.
37. Almeida MTG, Silva RM, Donaire LM, Moreira LE, Martinez MB. Enteropatógenos associados com diarréia aguda em crianças. *J Pediatr (Rio J)* 1998;74:291-8.

38. Gomes TAT, Rassi V, Macdonald KL, Ramos SRTS, Trabulsi LR, Vieira MAM, et al. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brasil. *J. Infect. Dis* 1991;164:331-37.
39. Almeida IAZC, Rodrigues ECA, Marques DF, Duarte VLS, Guimarães EQ. Frequência de isolamento de enterobactérias patogênicas na região de São José do Rio Preto - SP [Anais]. Reunião Anual do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo; 1997. p. 175.
40. Martinez MB, Almeida MTG, Silva RM, Donaire LM, Moreira LE. Enteropatógenos associados com diarreia aguda em crianças. *J. Pediat* 1998;74(4):291-98.
41. Wilhelmi I, Roman E, Sánchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:247-262.
42. Glass RI, Bresee J, Jiang B, Gentsch J, Ando T, Fankhauser RL et al. Gastroenteritis viruses: an overview. *Novartis Found Symp* 2001;238:5-19.
43. Yamashita T, Ito M, Tsuzuki H, Sakae K. Identification of Aichi virus infection by measurement of immunoglobulin responses in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 2001;39:4178-80.

44. Vernacchio L, Vezina RM, Mitchell AA, Lesko SM, Plaut AG, Acheson DW. Diarrhea in American and young children in the community setting: incidence, clinical presentation and microbiology. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:2-7.
45. Matsui SM, Greenberg HB. *Astroviruses*. Fields Virology, Lippincott-Williams & Wilkins. Philadelphia, 2001.
46. Mitchell DK. Astrovirus gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:1067-69.
47. Simpson R, Aliyu S, Iturriza-Gómara M, Desselberger U, Gray J. Infantile viral gastroenteritis: on the way to closing the diagnostic gap. *J Med Virol* 2003;70:258-62.
48. Walter JE, Mitchell DK. Astrovirus infection in children. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16:247-253.
49. Afonso A, Antunes H. Infecção por rotavírus: implicações e custos. *Acta Pediatr Port* 2007;38:138-43.
50. Sartori AM, Valentim J, de Soárez PC, Novaes HM. Rotavirus morbidity and mortality in children in Brazil. *Rev Panam Salud Publica* 2008;23:92-100.
51. Gurgel RQ, Correia JB, Cuevas LE. Effect of rotavirus vaccination on circulating virus strains. *Lancet*. 2008;371:301-2.

52. Araujo EC, Clemens SA, Oliveira CS, Justino MC, Rubio P, Gabbay YB, et al. Safety, immunogenicity, and protective efficacy of two doses of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in healthy infants. *J Pediatr (Rio J)* 2007;83:217-24.

53. Nakagomi T, Cuervas LE, Gurgel RG, Elrokhsi SH, Belkhir YA, Abugalia M, et al. Apparent extinction of non-G2 rotavirus strains from circulation in Recife, Brazil, after the introduction of rotavirus vaccine. *Arch Virol* 2008;153:591-3.

54. Morillo SG, Luchs A, Cilli A, Costa FF, Carmona Rde C, Timenetsky Mdo C. Characterization of rotavirus strains from day care centers: pre- and post-rotavirus vaccine era. *J Pediatr (Rio J)* 2010;86:155-8.

55. Bernstein DI. RIX4414 (Rotarix): a live attenuated human rotavirus vaccine. *J Pediatr (Rio J)* 2007;83:193-5.

56. CDC – Center for Disease Control and Prevention. Norovirus Activity – United States; 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003;52:41-45.

57. CDC – Center for Disease Control and Prevention. Outbreak of acute gastroenteritis associated with Norwal R – like viruses among British military personnel – Afghanistan. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002;S1:477-79.

58. Kirkwood CD, Bishop RF. Molecular detection of human calicivirus in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, during 1999. *J Clin Microbiol* 2001;39:2722-24.
59. Morillo SG, Cilli A, Carmona RC, Timenetsky, MC. Identification and molecular characterization of norovirus in São Paulo State, Brazil. *Braz J Microbiol* 2008;39:619-22.
60. Morillo SG, Luchs A, Cilli A, Ribeiro CD, Calux SJ, Carmona RC, et al. Norovirus 3rd Generation kit: an improvement for rapid diagnosis of sporadic gastroenteritis cases and valuable for outbreak detection. *J Virol Methods* 2011;173:13-6.
61. Fankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T, Glass RI. Molecular Epidemiology of "Norwalk - like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 1998;178:1571-8.
62. Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of no cultivatable gastroenteritis viruses, the human Caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:15-37.
63. Kitagawa SMS, Toledo MRF, Trabulsi LR, Ramos SRTS, Murahovisch J, Fagundes NU, et al. Etiologia da diarreia infecciosa endêmica, da criança de baixo nível sócio-econômico em São Paulo. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35:1013-22.

64. Gonçalves ACM, Gabbay YB, Mascarenhas JD, Yassaka MB, Moran LC, Fraga VD, et al. Calicivirus and Giardia lamblia are associated with diarrhea in human immunodeficiency virus-seropositive patients from southeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2009;81: 463-6.
65. Rossit ARB, Almeida MTG, Nogueira CAM, Oliveira JGC, Barbosa DMUB, Moscardini AC, et al. - Bacterial, yeast, parasitic, and viral enteropathogens in HIV-infected children from São Paulo State, Southeastern Brazil. *Diag. Microbiol. infect. Dis* 2007;57: 59-66.
66. Konemam EW, Allen SD, Janda WM, et al. *Diagnóstico microbiológico. Texto e Atlas Colorido*. 5. ed. São Paulo: Medsi; 2001. p.551-88
67. Ewing WH. *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*. 4th Edition. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York; 1986.
68. Cardoso D, Fiaccadori FS, Souza MBLD, Martins RMB, Leite JPG. Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiania, Goias, Brazil. *Med Sci Monit* 2002;8(9):CR624-8.
69. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Dillen PME, Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microb* 1990;28:495-503.

70. Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, Glass RI, Monroe SS. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol* 1995;33:797-801.
71. Pereira HG, Azeredo RS, Leite JPG, Candeias JAN, Rácz ML, Linhares AC, et al. Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. *J Hyg (Lond)* 1983;90:117-25.
72. Jiang X, Huang PW, Zhong WM, Farkas T, Cubitt DW, Matson DO. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods* 1999;83:145-54.
73. Cardoso DDP, Fiaccadori FS, Souza MBLD, Martins RM, Leite JPG. Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiania, Goiás, Brazil. *Med Sci Monit* 2002;8(9):CR624-8.
74. Jiang X, Graham DY, Wang K, Estes MK. Norwalk Virus genome cloning and characterization. *Science* 1990;250,1580-83.
75. Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD, Bresee JS, Parashar UD, et al. Epidemiological and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 2002;186(1):1-7.

76. Gomes TA, Rassi V, MacDonald KL, Ramos SR, Trabulsi LR, Vieira MA et al. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. *J Infect Dis* 1983;148:986-97.
77. Toledo MRF, Alvariza MCB, Murahovchi J, Ramos SRTS, Trabulsi LR. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. *Infect Immun* 1983;39:586-9.
78. Trabulsi LR, Manissadjan A, Penha HAO, Liberatore R, Duallibe L, Camargo B, et al. Diarréias infantis por colibacilos enteropatogênicos. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1961;3:267-70.
79. Trabulsi LR, Toledo MRF, Ceballos BSO, Candeias JAN. Epidemiology of diarrheal diseases in South America. In: Tzipori S. ed. *Infectious diarrhea in the young*. New York: Elsevier Science; 1985. p. 121-5.
80. Levine MM, Edelman R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of serotypes associated with infant diarrhea. *Epidemiology and Pathogenesis*. *Epidemiol Rev* 1984;8:31-61.
81. Focaccia RV. *Tratado de Infectologia*. Rio de Janeiro: Atheneu; 2005. p. 984-989.

82. Polanco N, Manzi L. Toxigenic effect of *Acinetobacter baumannii* isolated from children with acute diarrhoea. *Invest Clin* 2008;49(1):59-67.
83. Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes Environ*. 2011;26(2):101-12.
84. Bon F, Ambert-Balay K, Giraudon H, Kaplon J, Le Guyader S, Pommepuy M, et al. Molecular epidemiology of caliciviruses detected in sporadic and outbreak cases of gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004. *J Clin Microbiol* 2005;43(9):4659-64.
85. Okada M, Ogawa T, Kaiho I, Shinozaki K. Genetic analysis of noroviruses in Chiba Prefecture, Japan, between 1999 and 2004. *J Clin Microbiol* 2005;43(9):4391-401.
86. Liu C, Grillner L, Jonsson K, Linde A, Shen K, Lindell AT et al. Identification of viral agents associated with diarrhea in Young children during a winter season in Beijing, China. *J Clin Virol* 2006;35(1):69-72.
87. Gallimore CI, Barreiros MAB, Brown DWG, Nascimento JP, Leite JPG. Noroviruses associated with acute gastroenteritis in a children's day care facility in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:321-26.

88. Bereciartu A, Bok K, Gomez J. Identification of viral agents gastroenteritis among children in Bueno Aires, Argentina. *J Clin Virol* 2002;25(2):197-203.
89. Espul C, Martinez N, Noel JS, Cuello H, Abrile C, Grucci S, et al. Prevalence and characterization of astroviruses in Argentina children with acute gastroenteritis. *J Med Virol* 2004;72(1):75-82.
90. Hansman GS, Doan LT, Kgyuen TA, Okitsu S, Katayama K, Ogawa S, et al.. Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Arch Virol* 2004;149:1673-88.
91. Parashar UD, Li JF, Cama R, DeZalia M, Monroe SS, Taylor DN, et al. Human caliciviruses as a cause of severe gastroenteritis in Peruvian children. *J Infect Dis* 2004;190(6):1088-92.
92. Gabbay YB, Luz CRNE, Costa IV, Cavalcante-Pepino EL, Sousa MS, Oliveira KK, et al. Prevalence and genetic diversity of astroviruses in children with and without diarrhea in São Luís, Maranhão, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100:709-14.
93. Moreno-Espinosa S, Farkas T, Jiang X. Human caliciviruses and pediatric gastroenteritis. *Semin Pediatr Infect Dis* 2004;15:237-45.

94. Rockx B, Wit M, Vennema H, Vinjé J, Bruin E, Van Duynhoven, et al. Natural history of human Calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2002;35:246-253.
95. Schaub SA, Oshiro RK. Public health concerns about caliciviruses as waterborne contaminants. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl2):S374-S380.
96. Parachar UD, Monroe SS. "Norwalk-like viruses" as a cause of foodborne disease outbreaks. *Ver Med Virol* 2001;11(4):243-52.
97. Chikhi-Brachet R, et al. Virus diversity in a winter epidemic of acute diarrhea in France. *J. Clin. Microbiol* 2002;40:4266-72.
98. Cunliffe NA, Dove W, Gondwe JS, Thindwa BD, Greensill J, Holmes JL, et al. Detection and characterisation of human astroviruses in children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *J Med Virol* 2002;67(4):563-6.
99. Dalton RM, Roman ER, Negredo AA, Wilhelmi ID, Glass RI, Sánchez-Fauquier A. Astrovirus acute gastroenteritis among children in Madrid, Spain. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:1038-41.
100. Ratcliff RM, Doherty JC, Higgins GD. Sensitive detection of RNA viruses associated with gastroenteritis by a hanging-drop single-tube nested reverse transcription-PCR method. *J Clin Microbiol* 2002;40(11):4091-9.

101. Santos RAT, Cardoso DDP. Astrovírus (Revisão). *Revista de Patologia Tropical* 2005;34(3):161-74.
102. Gaggero A, O’Ryan M, Noel JS, Glass RI, Monroe SS, Mamani N, et al. Prevalence of astrovirus infection among Chilean children with acute gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1998;36:3691-93.
103. Jakab F, Meleg E, Bányai K, Meleg B, Tímár L, Péterfai J, Szücs G. One-year survey of astrovirus infection in children with gastroenteritis in a large hospital in Hungary: occurrence and genetic analysis of astroviruses. *J Med Virol* 2004;74:71-77.
104. Glass RI, Noel JS, Mitchell DK, Herrmann JE, Blacklow NR, Pickering LK, et al. The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review. *Arch Virol* 1996;12:287-300.
105. Unicomb LE, Banu NN, Azim T, Islam A, Bardhan PK, Faruque ASG, et al. Astrovirus infection in association with acute, persistent and nosocomial diarrhea in Bangladesh. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17:611-14.
106. Painel de Monitoramento de São José do Rio Preto 2010. URL: [acessado 29 ago 2011] (<http://www.riopreto.sp.gov.br>).

107. Schnack FJ, Fontana LM, Barbosa PR, Silva SM, Baillargeon CMM, Barichelo T, et al. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants (<5 years old) in a population sample in Greater Metropolitan Criciúma, Santa Catarina State, Brazil. *Cad Saúde Publica* 2003;19(4):1205–08.

108. Bresee JS, Hummelman E, Nelson EA, Glass RI. Rotavirus in Asia: the value of surveillance for informing decisions about the introduction of new vaccines. *J Infect Dis* 2005;192 Suppl 1:S1-5.


109. Belloto MVT, Junior JES, Macedo EA, Ponce A, Galisteu KJ, Castro E, et al. Enteroparasitoses numa população de escolares da rede pública de ensino do Município de Mirassol, São Paulo, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude* 2011;2(1):37-44.

110. Cimerman S, Cimerman B, Lewi DS. Avaliação da relação entre parasitoses intestinais e fatores de risco para o HIV em pacientes com AIDS. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999;32(2):181-5.

111. Alves CFM. Bactérias enteropatogênicas envolvidas em doenças transmitidas por alimento e diarreias agudas em Minas Gerais no período de 2006 a 2008 [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2009.

7. APÊNDICES

Apêndice 1 – Parecer favorável do CEP



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

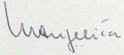
Parecer n.º 446/2009

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo CEP n.º 6332/2009 sob a responsabilidade de **Andréa Regina Baptista Rossit**, com o título "Etiologia da diarreia infantil no Noroeste Paulista" está de acordo com a Resolução do CNS 196/96 e foi **aprovado por esse CEP**.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) **deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo**, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. **Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.**

São José do Rio Preto, 14 de dezembro de 2009.


Dr.ª Maria Angélica Benes Teixeira Lemos
Secretária do CEP/FAMERP

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 - 15090-000 - São José do Rio Preto - SP - Brasil
Tel. (17) 3201-5700 - Fax (17) 3229-1777 - www.famerp.br

Apêndice 2 – Termo de Participação e Consentimento

FACULDADE REGIONAL DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
FAMERP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos convidando seu filho (a) a participar de uma pesquisa chamada "Prevalência de Parasitos Intestinais em Crianças de uma Creche Pública na Cidade de São José do Rio Preto-SP". Esse projeto, coordenado pelo pesquisador Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado, pretende estudar os germes causadores da diarreia em crianças. Se você concordar, profissionais do Centro de Investigação de Microorganismos (CIM) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-SP, coletarão parte das fezes de seu filho (a) em um frasco coletor. Depois disso, faremos uma avaliação em laboratório do material colhido. Essa coleta não trará desconforto, ou alteração no quadro clínico da criança.

Portanto, trata-se de um estudo que não coloca em risco o participante, e poderá trazer benefícios futuros na prevenção de diarreias em crianças.

Queremos deixar claro que o nome do seu filho (a) nunca será divulgado, nem a origem das informações que você nos fornecer. Se durante a pesquisa você desejar, por qualquer motivo que seu filho (a) não participe mais, poderá fazê-lo, sem que isto traga quaisquer prejuízos para a continuidade do seu tratamento. A qualquer momento você poderá tirar quaisquer dúvidas que possam surgir, entrando em contato com o coordenador do mesmo, Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado, no telefone 017- 3201-5736, na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. Você, nem seu filho (a) receberão qualquer pagamento por participação, como também não terão nenhuma despesa com essa pesquisa. O material por você cedido destina-se apenas a análise científica e não pode ser comercializado ou fornecido como resultado de análise clínica.

Caso tenha dúvidas sobre esse acordo ou alguma questão que não tenha sido esclarecida, você ainda poderá entrar em contato com a Comissão de Ética da FAMERP (0xx17 – 3201-5700 R. 5813).

Após ter recebido com clareza todas as informações contidas neste Termo, concordo com a participação do meu filho (a) como sujeito da pesquisa.

Nome do Participante da pesquisa

Nome do responsável Legal

Assinatura do Responsável Legal

São José do Rio Preto, ____/____/____.

PS. - Este Termo foi elaborado em duas vias, sendo uma entregue para o responsável legal do participante e a outra ficando em poder do pesquisador.

Pesquisadora Responsável

Prof. Dr Ricardo Luiz Dantas Machado

FAMERP - Centro de Investigação de Microrganismos

FONE: (0xx17) 3201-5736

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 - Vila São Pedro – CEP 15090-000

"Prevalência de Parasitos Intestinais em Crianças de uma Creche Pública na Cidade de São José do Rio Preto-SP".

Apêndice 3 – Ficha Epidemiológica Individual

"Prevalência de Parasitos Intestinais em Crianças de uma Creche Pública na Cidade de São José do Rio Preto-SP".

Ficha Epidemiológica

Nome: _____

Sexo: () F () M Idade: _____

Endereço: _____ nº: _____

Bairro: _____

Nº do Prontuário: _____ Telefone para
contato: _____

Nº da amostra: _____ Data da

Coleta: ____/____/____

Amostra : () Diarréica () Não Diarréica

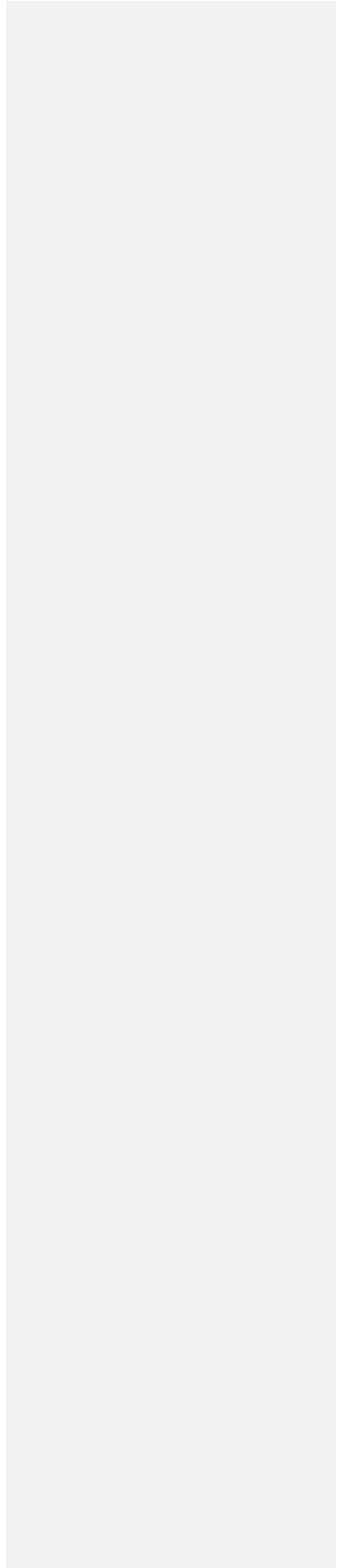
	SIM	NÃO	NÃO SEI	OBSERVAÇÃO
Mora em área rural?				
Frequenta creche?				
Viajou recentemente? Para onde?				
A água é tratada?				
Tem caixa d'água em sua casa?				
O esgoto é tratado?				
Convive com animais? Quais?				
Consome alimentos crus? Quais?				
Comeu em local diferente na última semana?				
Esteve internado antes por diarréia?				
Fez uso de antibiótico nos últimos 30 dias? Qual?				

Consumo da água para beber é de:

() poço () caixa d'água () filtrada () fervida () mineral

ASPECTOS CLÍNICOS

	SIM	NÃO	NÃO SEI	OBSERVAÇÃO
<i>Teve febre na última semana?</i>				
<i>Teve diarreia na última semana? Quantas vezes por dia?</i>				
<i>Observou presença de sangue nas fezes na última semana?</i>				
<i>Apresentou dor abdominal na última semana?</i>				
<i>Apresentou vômito na última semana?</i>				



Apêndice 3 – Artigo publicado

Am. J. Trop. Med. Hyg., 81(3), 2009, pp. 463–466
Copyright © 2009 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

Short Report: Calicivirus and *Giardia lamblia* are Associated with Diarrhea in Human Immunodeficiency Virus-Seropositive Patients from Southeast Brazil

Ana Carolina M. Gonçalves, Yvone B. Gabbay, Joana D'are Mascarenhas, Marcela B. Yassaka, Luciana C. Moran, Valéria D. Fraga, Edna Castro, Célia Franco, Ricardo Luiz D. Machado, and Andréa Regina B. Rossit*

University Center of Rio Preto (UNIRP), São José do Rio Preto, São Paulo; Virology Section, Evandro Chagas Institute, Ananindeua, Pará; Center for Microorganism Investigations, Department of Dermatology, Parasitic and Infectious Diseases, Medicine School in São José do Rio Preto (FAMERP), São Paulo; Infectious and Parasitic Diseases Service of Hospital de Base, Regional Medicine School in São José do Rio Preto (FUNFARME), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

Abstract. To study enteropathogens, 100 fecal samples were collected from a Brazilian human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive population, with or without diarrhea. *Giardia lamblia* and calicivirus were significantly associated with diarrhea as were severe immunosuppression and the presence of at least one enteropathogen. No sample was positive for rotavirus and only one asymptomatic individual carried the astrovirus. We concluded that there is a great diversity of pathogens and opportunistic infections in the studied population, with a high prevalence of mixed colonization/infection. Our findings pave the way for future molecular studies related to the expression of virulence factors and to the possibility of pathogen–pathogen interactions, especially between *G. lamblia* and calicivirus. These findings are relevant to the improvement of therapies and controlling diarrhea in the HIV-seropositive population.

INTRODUCTION

In Latin America one-third of all human immunodeficiency virus (HIV)-positive individuals reside in Brazil, a country that mirrors the international trend in the increase in prevalence of this infection. Sixty percent of all cases are concentrated in Southeastern Brazil, an area which also leads in the absolute number of deaths by the disease¹ and in percentage (90%) of people living 5 years after diagnosis.² Among the clinical manifestations consequent to immunosuppression by HIV, diarrhea is of concern because of the considerable reduction in immunologic response in the intestinal mucosa, making local unspecific defense difficult and, thus, accentuating its severity.^{3,4} Moreover, traditionally non-pathogenic microorganisms and opportunistic infections have played an important role in the etiology of this disease.⁵

The aim of this work was to conduct a case-controlled study to evaluate the potential role of bacterial, yeast, parasitic, and viral enteropathogens in an adult HIV-infected group from Southeastern Brazil and also to study the correlation of these microorganisms with clinical and sociodemographic characteristics.

MATERIAL AND METHODS

Patient enrollment and sample collection. The study was conducted from April 2006 to June 2007 by the staff of the Center for Microorganism Investigations (CIM), Southeastern Brazil. Sample collection and clinical evaluation was performed by the physicians of the regional center of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) treatment of Hospital de Base (HB), catering for a large population. Viral analysis was conducted at Evandro Chagas Institute (Virology Section), North Brazil. Patients were enrolled during hospitalization, after outpatient clinic evaluation at HB because of HIV. One fecal sample was collected from “cases” (clinical signs of

diarrhea—three or more daily episodes of unformed stools) and from “controls” (without any gastrointestinal symptoms for more than 30 days before hospitalization). They were recruited from all individuals with the presence of anti-HIV antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot, in any HIV risk category.⁶ These were excluded if they were pregnant, less than 18 years of age, signs of non-infectious diarrhea (drug-associated diarrhea), or mental disorders. Clinical data including drug therapy, previous hospitalizations, viral load (VERSANT HIV-1 RNA 3.0 Assay bDNA, Siemens, Bayswater Victoria, Australia), and immune status (TriTEST CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP, Becton Dickinson, CA) were obtained from medical records according to a protocol approved by the Research Ethics Board of the Medicine School in São José do Rio Preto. Epidemiologic data were collected by a standard interviewer-administered questionnaire (Table 1).

Laboratory analysis. Stool samples were transported in Cary–Blair transport media for bacterial and yeast analysis. Two clean containers were used for fecal collection and stored at -70°C for parasites and viruses studies. All specimens were immediately sent and examined at CIM according to standard bacteriologic and mycologic procedures.^{7,8} Enteric protozoan were studied by immunoenzymatic assays.⁷ To detect viruses, molecular methods were applied as recommended, with modifications.^{9–13}

Statistical analysis. To obtain independence among proportions, we applied the χ^2 test or the Fisher's exact test and for odds ratio (OR) we considered a 95% confidence interval (CI) (Epi Info, version 6.0, CDC, Atlanta, GA). The relationship between the studied variables was assessed using the Wilcoxon rank sum test. The adopted significance level for statistical inference was 5%.

RESULTS

Forty diarrheic and 60 non-diarrheic HIV-seropositive/AIDS patients were included. As summarized in Table 1, approximately half of them were men and the difference between mean ages and genders did not show significant differences, indicating a well-matched population. The sociodemographic

*Address correspondence to Andréa Regina B. Rossit, Center for Microorganism Investigation, Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, 15090-000, São José do Rio Preto, SP-Brazil. E-mail: andrea@famerp.br

TABLE 1
Sociodemographic and clinical characteristics of 100 HIV-seropositive/
AIDS patients in respect to the presence (cases; N = 40) or absence
(controls; N = 60) of clinical signs of diarrhea*

	Cases (N = 40)		Controls (N = 60)		Significance P†
		%		%	
Age mean‡	37.9		40.3		
Gender‡					
Female	19	47.5	29	48.3	
Male	21	52.5	31	51.6	
Rural Area					
Yes	11	27.5	14	23.3	
Water Source§					
Treated	30	75	53	88.3	
Sewerage system§					
Yes	37	92.5	56	93.3	
Water consumption					
Public reservoir or water well¶	27	67.5	47	78.4	
OthersL	13	32.5	13	21.6	
Cohabiting with animals					
Yes	30	75.0	39	65.0	
Raw food consumption§					
Yes	38	95.0	58	96.7	
Under antiretroviral therapy					
Yes	31	77.5	45	75	
Under antibacterial therapy					
Yes	36	90	49	81.7	
Under antifungal therapy					
Yes	20	50.0	22	35.0	
Previous hospitalization					
Yes	20	50	19	31.6	
Viral load					
≥ 100,000 HIV-1/mL	24	60	47	78.3	
< 100,000 HIV-1/mL	16	40	13	21.7	
Immunosuppression**					
Severe	33	82.5	31	51.7	0.0055
None or moderate	07	17.5	29	48.3	
Enteropathogens					
Yes	18	45	11	18.4	0.008

*HIV = human immunodeficiency virus; AIDS = acquired immunodeficiency syndrome.
†Comparisons are shown only for differences approaching statistical significance.
‡Estimate of the difference between mean ages (-2.89 ≤ 2.40 ≤ 7.69, CI 99%) and genders
(P = 0.89; χ^2 Test).
§Fisher's exact test.
¶Provided by the city administration or taken from a water well.
L Mineral, bottled or not (boiled or not).
**Mean TCD₅₀ cell count in the case group was 143.67 ± 177.11 cells/mm³ (ranging from 2 to 638 cells/mm³), whereas the same parameter in the control group was 294.67 ± 324.16 (ranging from 4 to 1455 cells/mm³).

and clinical characteristics were not associated to diarrhea, except for severe immunosuppression and the isolation of at least one enteropathogen (P = 0.0055 and 0.008, respectively). The cases, all presenting non-severe diarrhea, were more commonly infected and/or colonized by two or more enteropathogens (8/40) compared with controls (1/60; P = 0.0026; Fisher's exact test). The simultaneous presence of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Salmonella Gallinarum*, and *Shigella flexneri* was detected in one diarrheic patient. The clinical signs studied, such as abdominal pain, vomiting, and fever, and the presence of mucous and/or blood in stools, were more frequently observed in the case group (P < 0.05).

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) was the commonest bacteria (22.5%) and 12.5% of them produced extended-spectrum beta-lactamase (ESBL), as well one enteroinvasive *E. coli* (EIEC) strain. One-third of all *E. coli* were multiresistant. *Candida albicans* was isolated in more than half of the patients, whereas the remaining were "non-albicans" species. No patient carried rotavirus, only one the astrovirus and the calicivirus, detected in 10% of the cases, was associated to diarrhea (P = 0.0233; Fisher's exact test). The following parasites were detected: *Cryptosporidium parvum* (9%), *G. lamblia*

(5%), and *E. histolytica* (2%). Protozoan carriers were at stronger risk of diarrhea, however *G. lamblia* was the only parasite significantly associated (P = 0.0087; Fisher's exact test). No significant associations were observed between the presences of blood or mucous in stools, fever, abdominal pain, and vomiting with infection by *G. lamblia* or calicivirus (Table 2).

DISCUSSION

Sociodemographic features in our study population were equivalent to those described in the Brazilian AIDS epidemic.² Environmental exposure does not seem to play a role as a risk factor for diarrhea in the studied population. However, severe immunosuppression was associated with this manifestation, as was previously verified in other HIV-positive populations, including infants.^{4,7,14-17}

Within the 100 stool samples, 137 microorganisms were detected with *G. lamblia* and calicivirus significantly associated with diarrhea. Enterobacteria were isolated in 25% and 11.7% of diarrheic and non-diarrheic individuals, respectively, repeating the percentage found in diarrheic HIV-seropositive children from the same region.⁷ In different HIV-positive adult populations results varied from failure to detect any enterobacteria,¹⁸ low positivity¹⁹ to high positivity rates.^{14,20} Two of the isolated EPEC serotypes 0111:H- and 026:H11 were pre-

TABLE 2
Absolute and relative incidences of the different enteropathogens detected in stools of the 100 HIV-seropositive/AIDS patients in respect to the presence (cases; N = 40) or absence (controls; N = 60) of clinical signs of diarrhea*

Enteropathogen	Cases (N = 40)		Controls (N = 60)		Significance P†
		%		%	
Bacteria					
EPEC	9	22.5	3	5	0.0453
<i>Salmonella</i> spp.‡	2	5	1	1.7	
<i>Shigella</i> spp.	-	-	2	3.4	
<i>Shigella boydii</i>	-	-	1	1.7	
<i>Shigella flexneri polivalente</i>	1	2.5	-	-	
Fungus					
<i>Candida albicans</i>	23	57.5	30	50	
<i>C. parapsilosis</i> §	1	2.5	8	13.4	
<i>C. tropicalis</i>	4	10	7	11.7	
<i>C. krusei</i>	4	10	2	3.4	
<i>C. dubliniensis</i>	2	5	1	1.7	
<i>C. glabrata</i>	3	7.5	7	11.7	
<i>C. guillemondii</i>	1	2.5	1	1.7	
<i>C. inconspicua</i>	2	4.7	3	5	
<i>Geotrichum</i> sp.	-	-	2	3.4	
<i>Geotrichum klebahnii</i>	-	-	2	3.4	
<i>Trichosporon asahii</i>	-	-	1	1.7	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	1	1.7	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	1	1.7	
Unidentified mold§	3	7.5	-	-	
Virus					
Astrovirus	-	-	1	1.7	
Calicivirus§	4	10	-	-	0.0233
Rotavirus	-	-	-	-	
Parasites¶					
<i>Entamoeba histolytica</i>	1	2.5	1	1.7	
<i>Cryptosporidium parvum</i> §	6	15	3	5	0.089
<i>Giardia lamblia</i> §	5	12.5	-	-	0.0087

*HIV = human immunodeficiency virus; AIDS = acquired immunodeficiency syndrome; EPEC = enteropathogenic *Escherichia coli*.
†Comparisons by analysis of variance or Fisher's Exact Test are shown only for differences approaching statistical significance.
‡One strain of *S. Gallinarum* was detected in each group.
§Fisher's exact test.
¶Protozoan carriers were at stronger risk of diarrhea (OR, 5.3, P = 0.010, 95% CI 1.55-18.15).

viously reported as prevalent among diarrheic children²¹ and cattle feces²² in São Paulo state. Ciprofloxacin ESBL producing²³ or quinolone-resistant²⁴ EPEC O102 serogroup strains were isolated before from hospitalized adults. Interestingly, the O102:H30 EPEC isolated in our study proved to be an ESBL quinolone-resistant strain. Even though serogrouping itself (O antigen only) must not be taken as an EPEC diagnostic method,²⁵ the results obtained highlight the need for further study on virulence factors, such as those encoded by the *Stx* and *eae* genes, to define their relevance. Another limitation we acknowledge is the absence of molecular methodology for EAggEC detection, previously recognized as an important enteropathogen in HIV-seropositive patients.¹⁴ Higher frequencies of *Shigella* spp. isolation were reported in HIV-seropositive Africans,¹⁴ Indians,²⁵ and Peruvians²⁶ compared with our results, whereas the frequencies of *Salmonella* spp. were found to be similar. In Brazil, these two species were not important in an infantile HIV-seropositive diarrheic population.⁷

Undoubtedly, the major endogenous reservoir of *Candida* spp. is the gastrointestinal tract,²⁶ source of microbial translocation and fungemia,^{27,28} however there is a controversy about its role as a diarrhea-causing enteropathogen.^{29,30} As for *C. albicans*, the isolation in stools of HIV patients from different countries^{7,14,18,31-33} yielded prevalence rates of 2.86% to 39.1%. Our results are the highest reported levels (53%).

Our present data on rotavirus and astrovirus reinforce the previously reported possibility of low circulation of both viruses in the studied region.⁷ This is the first report of calicivirus as a causative agent of diarrhea in HIV-seropositive adults. In Brazil, norovirus was detected in 60% of a non-HIV population during an outbreak of diarrhea in the southwestern region (Rio de Janeiro State)³⁴ and in 8.6% of the infant population from the West Central region of the country.³⁵ In fact, *Sapovirus* and *Norovirus* have already been detected in hospitalized and non-hospitalized children, both in outbreaks of diarrhea and isolated cases, with an occurrence compared with rotavirus.^{36,37} In HIV-seropositive adults, calicivirus was detected in a frequency of 7% in North Americans,³⁸ whereas in Venezuelans it ranged from null³⁹ to a 9.4% isolation frequency.⁴⁰

Cryptosporidium parvum revealed a high prevalence in asymptomatic HIV-seropositive/AIDS patients in the same Brazilian region 5 years ago, although not associated with diarrhea.⁴⁴ Similar to the other Brazilian studies, here *E. histolytica* was not associated to diarrhea.^{7,42,43} *Giardia lamblia* positive association to diarrhea in our study,⁴¹ corroborates data from São Paulo city (450 km apart from the study area).⁴⁵ In Brazilian distinct regions, a large difference in its frequency has been observed with several reports of significant associations with diarrhea in HIV-positive patients.^{37,41-43} A wide variation, ranging from 3% to 14%, was also detected in other countries, making comparisons difficult.^{40,44,45} Our results are comparable to the lowest national rates (4%), repeating those obtained 4 years before in the same population.⁴¹ The mechanism by which *G. lamblia* causes diarrhea and low intestinal absorption remains controversial, but one possible explanation is the involvement of multiple factors such as the age of cysts, the host immune status, and the parasite genetic variability.⁴⁶ Another possibility could be concurrent gut infections with calicivirus because in our study three patients shared this combination.

There is a great diversity of pathogens and opportunistic agents in HIV individuals, with a high prevalence of mixed

colonization/infection, which is a concern because they act as reservoirs. These data are relevant in the improvement of therapies and controlling diarrhea in the HIV-seropositive population and highlight the need for study on pathogen-host interactions.

Received November 9, 2008. Accepted for publication May 23, 2009.

Acknowledgments: We thank Irineu Luiz Maia for his help on discussing important issues on the clinical aspects of the HIV population and Elizabete Santos and Alexandre Linhares from the Evandro Chagas Institute for institutional support of viral analysis.

Financial support: This work was supported by grants from: the Medicine School in São José do Rio Preto (BAP-FAMERP), FAPESP, and the Post Graduate Support Program (PROAP-CAPES). Marcela B. Yassaka was supported by a scholarship from the National Council for Research and Development – PIBIC/CNPq-FAMERP.

Authors' addresses: Ana Carolina Musa Gonçalves, University Center of Rio Preto (UNIRP), Rua Yvete Gabriel Atique, no 45, Boa Vista, 15025-400-São José do Rio Preto, SP-Brazil, Tel/Fax: +55 17 32113000, E-mail: acmusa23@yahoo.com.br. Yvone Benchmol Gabbay and Joana D'Arc Mascarenhas, Virology Section, Evandro Chagas Institute, BR-316 Km 07 s/n, Ananindeua, PA-Brazil, Tel/Fax: +55 91 32142015/32142016, E-mail: yvonegabbay@iec.pa.gov.br and joanamascarenhas@iec.pa.gov.br. Luciana Conceição Moran, Valéria Daltibari Fraga, Marcela Braga Yassaka, and Ricardo Luiz Dantas Machado, Center for Microorganism Investigation, Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, 15090-000, São José do Rio Preto, SP-Brazil, Tel/Fax: +55 17 32015736, E-mails: lucianamorana@famerp.br, valeriafraga@famerp.br, ma_yassaka@yahoo.com.br, and ricardomachado@famerp.br. Célia Franco and Edna Castro, Infectious and Parasitic Diseases Service of Hospital de Base, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5544, Vila São Pedro, 15090-000, São José do Rio Preto, SP-Brazil, Tel/Fax: +55 17 32015006, E-mails: cfranco@famerp.br and ednacastrohb@hotmail.com. Andréa Regina B. Rossit, Center for Microorganism Investigation, Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, 15090-000, São José do Rio Preto, SP-Brazil, Tel/Fax: +55 17 32015909, E-mail: andrea@famerp.br.

Reprint requests: Andréa Regina B. Rossit, Center for Microorganism Investigation, Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, 15090-000, São José do Rio Preto, SP-Brazil, Tel/Fax: +55 17 32015909, E-mail: andrea@famerp.br.

REFERENCES

- UNAIDS. 2007. *AIDS Epidemic Update 2007 – Latin America Regional Summary*. Available at: <http://www.unaids.org>. Accessed July 15, 2008.
- Brasília, Ministry of Health, 2007. Brazil, Ministry of Health, Health Surveillance Department, National DST/AIDS Program. *Bulletin Epidemiological of Sexually Transmitted Disease Program/AIDS*. Available at: <http://www.aids.gov.br>. Accessed July 18, 2008.
- Motta MEFA, Silva GAP. 2002. Diarréia por parasitas. *Rev Bras Saúde Matern Infant* 2: 117–127.
- Brink AK, Mahé C, Watera C, Lugada E, Gilks C, Whitworth J, French N. 2002. Diarrhea, CD4 counts and enteric infections in a community-based cohort of HIV adults in Uganda. *J Infect* 45: 99–106.
- Cimerman S, Cimerman B, Lewi DS. 1999. Prevalence of intestinal parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. *Int J Infect Dis* 3: 203–206.
- Castro KG, Ward JW, Slutsker L, Buehler JW, Jaffe HW, Berkelman RL. 1992. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep* 41: 1–19.
- Rossit AR, Almeida MT, Nogueira CA, Oliveira JG, Barbosa DM, Moscardini AC, Mascarenhas JD, Gabbay JB, Marques FR, Cardoso LV, Cavasini CE, Machado RL. 2007. Bacterial, yeast, parasitic, and viral enteropathogens in HIV-infected children from São Paulo State, Southeastern Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57: 59–66.

8. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol* 45: 493-496.
9. Boom R, Sol CI, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28: 495-503.
10. das Dóres de Paula Cardoso D, Fiaccadori FS, Borges de Lima Dias e Souza M, Bringel Martins RM, Gagliardi Leite JP. 2002. Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiânia, Goiás, Brazil. *Med Sci Monit* 8: CR624-CR628.
11. Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, Glass RI, Monroe SS. 1995. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol* 33: 797-801.
12. Jiang X, Huang PW, Zhong WM, Farkas T, Cubitt DW, Matson DO. 1999. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods* 83: 145-154.
13. Pereira HG, Azeredo RS, Leite Barth OM, Sutmoller F, de Farias V, Vidal MN. 1983. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 78: 483-490.
14. Gassama A, Sow PS, Fall F, Camara P, Philippe H, Guéye-N'diaye A, Seng R, Samb B, M'Boup S, Germani Y, Aidara-Kane A. 2001. Ordinary and opportunistic enteropathogens associated with diarrhea in Senegalese adults in relation to human immunodeficiency virus serostatus. *Int J Infect Dis* 5: 192-198.
15. Galli L, de Martino M, Tovo PA, Gabiano C, Zappa M, Giaquinto C, Tulisso S, Vierucci A, Guerra M, Marchisio P. 1995. Onset of clinical signs in children with HIV-1 perinatal infection. *Ital Reg HIV Infect Child* 9: 455-461.
16. Kakai R, Bwayo JJ, Wamola IA, Ndinya-Achola JO, Plummer FA. 1995. Effect of human immunodeficiency virus on local immunity in children with diarrhea. *East Afr Med J* 72: 699-702.
17. Onyemelukwe GC, Musa BO. 2002. CD4+ and CD8+ lymphocytes and clinical features of HIV seropositive Nigerians on presentation. *Afr J Med Sci* 31: 229-233.
18. Attili SV, Gulati AK, Singh VP, Varma DV, Rai M, Sundar S. 2006. Diarrhea, CD4 counts and enteric infections in a hospital-based cohort of HIV-infected patients around Varanasi, India. *BMC Infect Dis* 6: 39.
19. Prasad KN, Nag VL, Dhole TN, Ayyagari A. 2000. Identification of enteropathogens in HIV-positive patients with diarrhea in Northern India. *J Health Popul Nutr* 18: 23-26.
20. Cárcamo C, Hooton T, Wener MH, Weiss NS, Gilman R, Arevalo J, Carrasco J, Seas C, Caballero M, Holmes KK. 2005. Etiologies and manifestations of persistent diarrhea in adults with HIV-1 infection: a case-control study in Lima, Peru. *J Infect Dis* 191: 11-19.
21. Campos LC, Franzolin MR, Trabulsi LR. 2004. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional entero *E. coli* O serogroups: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 545-552.
22. Aidar-Ugrinovich L, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Leomil L, Dahbi G, Onuma DL, Silveira WD, Pestana de Castro AF. 2007. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. *Int J Food Microbiol* 115: 297-306.
23. Wolk M, Valinsky L, Sompolinsky D, Sechter I, Schmidt H, Tetry S, Agmon V. 2004. Endemic occurrence of infections by multi-drug-resistant *Escherichia coli* of four unique serotypes in the elderly population of Israel. *FEMS Microbiol Lett* 239: 249-254.
24. Jones GL, Warren RE, Skidmore SJ, Davies VA, Gibreel T, Upton M. 2008. Prevalence and distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Escherichia coli* lacking extended-spectrum β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 62: 1245-1251.
25. Kownhar H, Shankar EM, Rajan R, Vengatesan A, Rao UA. 2007. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and enteric bacterial pathogens among hospitalized HIV infected versus non-HIV infected patients with diarrhoea in Southern India. *Scand J Infect Dis* 39: 862-866.
26. Pfaller MA. 1994. Epidemiology and control of fungal infections. *Clin Infect Dis* 19: S8-S13.
27. Colombo AL, Branchini ML, Geiger D, Schmidt AL, Pignatari AC, Fischman O. 1996. Gastrointestinal translocation as a possible source of candidemia in an AIDS patient. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 38: 197-200.
28. Muñoz P, Sánchez-Somolinos M, Alcalá L, Rodríguez-Crèixems M, Peláez T, Bouza E. 2005. *Candida krusei* fungaemia: antifungal susceptibility and clinical presentation of an uncommon entity during 15 years in a single general hospital. *J Antimicrob Chemother* 55: 188-193.
29. Krause R, Reisinger EC. 2005. *Candida* and antibiotic-associated diarrhea. *Clin Microbiol Infect* 11: 1-2.
30. Kaltenbach G, Heitz D. 2004. Antibiotic-associated diarrhea in the elderly. *Rev Med Interne* 25: 46-53.
31. Same-Ekobo A, Lohoue J, Mbassi A. 1997. A clinical and biological study of parasitic and fungal diarrhea in immunosuppressed patients in an urban and suburban area of Yaoundé. *Sante* 7: 349-354.
32. Anand L, Dhanachand C, Brajachand N. 1998. Prevalence and epidemiologic characteristics of opportunistic and non-opportunistic intestinal parasitic infections in HIV positive patients in Manipur. *J Commun Dis* 30: 19-22.
33. Therizol-Ferly PM, Tagliante-Saracino J, Kone M, Konan A, Ouhon J, Assoumou A, Aka K, Assale G. 1989. Chronic diarrhea and parasitosis in adults suspected of AIDS in the Ivory Coast. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 82: 690-693.
34. Ferreira MS, Xavier MP, Fumian TM, Victoria M, Oliveira SA, Pena LH, Leite JP, Miagostovich MP. 2008. Acute gastroenteritis cases associated with noroviruses infection in the State of Rio de Janeiro. *J Med Virol* 80: 338-344.
35. Borges AM, Teixeira JM, Costa PS, Giugliano LG, Fiaccadori FS, Franco RC, Brito WM, Leite JP, Cardoso DD. 2006. Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 721-724.
36. Monica B, Ramani S, Banerjee I, Primrose B, Iturriza-Gomara M, Gallimore CI, Brown DW, M F, Moses PD, Gray JJ, Kang G. 2007. Human caliciviruses in symptomatic and asymptomatic infections in children in Vellore, South India. *J Med Virol* 79: 544-551.
37. Dove W, Cunliffe NA, Gondwe JS, Broadhead RL, Molyneux ME, Nakagomi O, Hart CA. 2005. Detection and characterization of human caliciviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *J Med Virol* 77: 522-527.
38. Grohmann GS, Glass RI, Pereira HG, Monroe SS, Hightower AW, Weber R, Bryan RT. 1993. Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients. Enteric Opportunistic Infections Working Group. *N Engl J Med* 329: 14-20.
39. González GG, Pujol FH, Liprandi F, Deibis L, Ludert JE. 1998. Prevalence of enteric viruses in human immunodeficiency virus seropositive patients in Venezuela. *J Med Virol* 55: 288-292.
40. Rodríguez-Guillen L, Vizzi E, Alcalá AC, Pujol FH, Liprandi F, Ludert JE. 2005. Calicivirus infection in human immunodeficiency virus seropositive children and adults. *J Clin Virol* 33: 104-109.
41. Cardoso LV, Marques FR, Cavasini CE, Almeida MC, Bassi NA, Gongora DV, Maia IL, Rossit AR, Machado RL. 2004. Correlation of intestinal parasitic pathogens in HIV-seropositive adult with and without diarrhea in Northeast region of São Paulo State, Brazil. *Rev Panam Infect* 6: 8-11.
42. Moura H, Fernandes O, Viola JP, Silva SP, Passos RH, Lima DB. 1989. Enteric parasites and HIV infection: occurrence in AIDS patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 527-533.
43. Feitosa G, Bandeira AC, Sampaio DP, Badaró R, Brites C. 2001. High prevalence of giardiasis and strongyloidiasis among HIV-infected patients in Bahia, Brazil. *Braz J Infect Dis* 5: 339-344.
44. Dwivedi KK, Prasad G, Saini S, Mahajan S, Lal S, Baveja UK. 2007. Enteric opportunistic parasites among HIV infected individuals: associated risk factors and immune status. *Jpn J Infect Dis* 60: 76-81.
45. Fontanet AL, Sahu T, Rinke de Wit T, Messele T, Masho W, Woldemichael T, Yeneneh H, Coutinho RA. 2000. Epidemiology of infections with intestinal parasites and human immunodeficiency virus (HIV) among sugar-estate residents in Ethiopia. *Ann Trop Med Parasitol* 94: 269-278.
46. Caccio SM, Ryan U. 2008. Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol* 160: 75-80.