

ESCHERICHIA COLI ENTEROTOXIGÊNICAS E ROTAVÍRUS DETECTADOS EM CRIANÇAS COM GASTROENTERITE AGUDA EM BELÉM, PARÁ*

Edvaldo Carlos Brito Loureiro

Instituto Evandro Chagas FSESP
Caixa Postal 621
66000 Belém PA, Brasil

Marlene Braide Serafim

Deptº de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biologia UNICAMP
13100 Campinas SP, Brasil

Alexandre da Costa Linhares

Instituto Evandro Chagas FSESP

& Antonio Fernando Pestana de Castro

Deptº de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biologia UNICAMP

Resumo

Procurou-se pesquisar, em Belém do Pará, a presença de *Escherichia coli* enterotoxigênica e outros enteropatógenos, incluindo agentes virais, nas fezes de 44 crianças de 0 a 5 anos de idade, com quadro diarréico agudo. A presença de bactérias enteropatogênicas foi investigada pela coprocultura e a pesquisa de rotavírus através das técnicas de ELISA e contra-imunoeletrosmoforescência. O isolamento de enterovírus foi feito em cultura de células (Vero e HEp 2) e camundongo recém-nascido. Helmintos e protozoários intestinais foram procurados pelo método direto. Trinta e três (75%) dos casos foram positivos para um ou mais enteropatógenos, sendo 30,3% de etiologia bacteriana, 39,4% de origem viral e 30,3% de infecção mista. A procura de enterotoxina LT e ST em 153 cepas de *E. coli* isoladas dos pacientes, foi feita, pelos testes de imuno-hemólise passiva (PIH) e camundongo recém-nascido (Teste de Dean), respectivamente. Cepas enterotoxigênicas de *E. coli*, em número de 17 foram isoladas de sete dos 44 pacientes estudados. Em nenhuma amostra ocorreu produção simultânea de duas enterotoxinas.

Summary

Enterotoxigenic Escherichia coli isolated from children with acute gastroenteritis, Belém, Pará

Fourty-four children, up to 5 years of age, with acute

*Trabalho realizado com auxílio parcial do CNPq e FINEP.

diarrhea were examined for the presence of enterotoxigenic *E. coli* and other enteropathogens including viral agents. Stool cultures were performed for bacterial isolations; detection of rotavirus antigen was made by ELISA and counter-immunoelectrosmophoresis. Specimens were also inoculated into Vero, HEp 2 cell lines, as well as in baby mice for the isolation of enteroviruses. Helminths and protozoans were searched by direct examination. Thirty-three (75%) specimens were positive for one or more than one enteropathogen; 30,3% were bacterial isolates, 39,4% were of viral etiology and 30,3% were mixed infections. LT and ST enterotoxin were assayed in 153 strains of *E. coli* through Passive Immune Hemolysis and the Dean test in baby mice, respectively. Seventeen strains of enterotoxigenic *E. coli* were isolated from 7 out of 44 children suffering from diarrhea. No strain produced both enterotoxins simultaneously.

Introdução

As diarreias têm sido relatadas como importantes causas de mortalidade infantil nos países em desenvolvimento (15). Até recentemente, entretanto, a etiologia dessas síndromes era determinada aproximadamente, em apenas 20% dos casos (23).

Nos últimos 10 anos, intensas investigações levaram a identificação de 3 grupos bem definidos de colibacilos enteropatogênicos encontrados em casos de diarreia aguda. A *Escherichia coli* enteropatogênica clássica tem sido responsável por frequentes surtos de diarreia infantil, sendo a sua identificação realizada através de provas de soro-aglutinação com antisoros específicos, desconhecendo-se, até o presente, quais os possíveis mecanismos de enteropatogenicidade envolvidos na etiopatogenia das diarreias causadas por estes microrganismos (21). Atualmente, se tem dado grande importância aos colibacilos enterotoxigênicos como causa de diarreia, não só no homem como nos animais. Estas bactérias produzem, simultaneamente ou em separado, pelo menos dois tipos de enterotoxinas ditas termolábil (LT) e termoestável (ST), tendo sido relatadas em São Paulo (8, 16, 18), Florianópolis (10), Manaus (9) e mais recentemente em Recife (13). Finalmente, existe o grupo de colibacilos invasores os quais atuam por mecanismo semelhante ao de *Shigella*.

O presente trabalho teve como finalidade principal estudar, em Belém do Pará, o papel desempenhado por *E. coli* enterotoxigênica e os rotavírus como causa de diarreia em crianças de até 5 anos de idade, procurando-se deste modo a obtenção de dados que aumentem o número de casos de diarreia identificadas quanto à sua natureza etiológica.

Material e Métodos

Foram examinadas 44 crianças portadoras de quadro diarreico agudo, na faixa etária de 0 a 5 anos, atendidas em clínicas particulares de Belém e no Hospital da Santa Casa de Misericórdia do Pará.

A coleta de espécimes fecais foi anterior à administração de qualquer antibiótico ou quimioterápico. Os espécimes foram enviados em frascos apropriados, para o Instituto Evandro Chagas, onde foram realizados os exames bacteriológico, parasitológico e virológico. Em um tempo nunca superior a 2 horas após a coleta, os espécimes foram processados na seção de bacteriologia, de acordo com os métodos propostos por Edwards & Ewing (3). Além da *E. coli* enterotoxigênica, foram ainda pesquisadas as seguintes bactérias enteropatogênicas: *Salmonella*, *Arizona*, *Shigella*, *Yersinia enterocolitica* e sorotipos enteropatogênicos clássicos de *E. coli*.

Cento e cinquenta e três cepas de *Escherichia coli* foram isoladas dos 44 casos de diarreia aguda. Após identificação bioquímica e sorológica, foram estocadas em BHI ("Brain Heart Infusion" - Difco) com 15% de glicerol estéril e mantidas a -20°C até

a realização dos testes para verificação da capacidade de produzir as enterotoxinas ST e LT. Para obtenção das enterotoxinas ST e LT, cada uma das 153 amostras de *E. coli* foi semeada em frascos Erlenmeyer contendo meio de Evans (4), estabelecendo sempre uma proporcionalidade de 1% em relação à quantidade de meio e o volume do frasco.

As culturas foram incubadas em estufa com agitação (150-200rpm) a 37°C por 18-24 horas. Para o preparo da enterotoxina LT foi utilizado a extração pela polimixina B, segundo técnica descrita por Evans & col. (5), sendo as culturas então centrifugadas a 4000rpm por 45 minutos e, após, retirados cuidadosamente os 3/4 superiores dos sobrenadantes. Estes foram examinados pelo teste de imuno-hemólise passiva (PIH) conforme descrito por Evans & col. (6) e modificado por Serafim & col. (17) e Castro & col. (1). Os valores com absorvância abaixo de 0,16 (<30µg de hemoglobina liberada), foram considerados negativos no teste do PIH e os valores acima de 30µg de hemoglobina liberada foram considerados positivos (1, 17).

A produção da enterotoxina ST foi realizada em cultura estacionária, obedecendo-se a mesma proporcionalidade entre volume de meio de Evans e volume dos frascos Erlenmeyers, sendo estes incubados a 37°C por 24 horas. Após a centrifugação das culturas, os sobrenadantes foram coletados conforme descrito para o preparo de LT. O ensaio para detecção da enterotoxina ST foi feito através da inoculação intra-gástrica em camundongos recém-nascidos, de 3 dias de idade, em número de 4 por amostra de *E. coli*, com 0,1ml do extrato bacteriano contendo azul de Evans a 2%, segundo método recomendado por Dean & col. (2). Após 4 horas, os animais foram sacrificados e as amostras que apresentaram a relação peso dos intestinos/peso das crianças (PI/PC) superiores a 0,085 foram considerados positivos; ou seja, produtoras da enterotoxina ST.

A identificação dos sorogrupos clássicos de *E. coli* foram pesquisadas utilizando antisoros OK polivalentes (Difco Laboratories) e, se positivos, com os antisoros específicos, de mesma procedência.

A pesquisa de rotavírus nos espécimes de fezes foi feita pelos métodos de ELISA e contra-imunoeletrosmoforese, seguindo-se metodologia já descrita anteriormente (20, 22).

A detecção de enterovírus foi processada através da inoculação de fezes em cultura de células Vero e HEp 2 e camundongo recém-nascido (inoculação intra-cerebral). As culturas celulares e os animais inoculados foram observados durante duas semanas na procura de efeito citopático e sinais de doença, respectivamente. A identificação dos enterovírus isolados foi feita utilizando mistura de antisoro (Lim. Beniesch Melnick) e antisoros específicos para echovírus e coxsackievírus fornecidos pelo "National Institute of Health" (N.I.H.), Bethesda, Maryland, USA.

A fim de excluir a possibilidade de helmintos e protozoários intestinais estarem envolvidos na etiologia das diarreias, a pesquisa destes agentes foi feita em todos os espécimes fecais através do exame parasitológico direto.

Resultados

Do total de 44 crianças com gastroenterite aguda detectaram-se enteropatógenos em 33 (75%) dos casos, dos quais 30,3% foram enterobactérias patogênicas, 39,4% rotavírus e enterovírus e 30,3% com etiologia mista (Tabela 1). Através da coprocultura isolaram-se 12% de colibacilos pertencentes aos sorogrupos enteropatogênicos clássicos de *E. coli*, 6% de *Salmonella*, 3% de *Shigella* e 9% de *E. coli* enterotoxigênica. Três pacientes com *Shigella* apresentaram um ou mais enteropatógenos, simultaneamente: *E. coli* clássica em um, *Giardia lamblia* em outro e em um terceiro *E. coli* enterotoxigênica e enterovírus. Três pacientes com *E. coli* enterotoxigênica e três com rotavírus apresentaram infecção mista com enterovírus; um caso de *E. coli* clássica estava associado com rotavírus. Entre as espécies de *Shigella*, *Sh. flexneri* foi a mais frequente, seguida de *Sh. sonnei*. Em relação aos sorogrupos enteropetogênicos clássicos de *E. coli*, 0111 e 0124 foram os mais frequentes, seguidos dos sorogrupos 055 e 086. *S. typhimurium* e *S. belem* estiveram presentes com um isolamento de cada. Não foram pesquisados *E. coli* enteroinvasora e *Campylobacter jejuni*

e não foi isolada nenhuma amostra dos gêneros *Arizona* e *Yersinia*, apesar de já se ter detectado em oportunidade anterior (12) uma amostra de *Y. enterocolitica* (biotipo 1 e sorotipo 0:8) das fezes de uma criança com gastroenterite aguda em Belém do Pará.

Enterovírus foram isolados em 9 (20%) das 44 crianças com diarreia aguda; cinco foram identificados como echovírus (echo 1, echo 4, echo 14, echo 19 e echo 20) e os 4 restantes ainda não foram identificados até o momento.

O exame parasitológico das fezes, revelou a presença de *Giardia lamblia* em apenas um caso, o qual também albergava outro enteropatógeno.

Das 153 cepas de *E. coli* isoladas dos 44 casos de diarreia aguda e examinadas quanto à produção das enterotoxinas ST e LT, 13 amostras, isoladas de 4 pacientes, apresentaram a relação PI/PC superiores a 0,085 e foram consideradas positivas para ST (Tabela 2). Por outro lado, 4 amostras isoladas de 3 casos, foram capazes de produzir enterotoxina do tipo LT. Fato importante a considerar, foi que, nenhuma das amostras de *E. coli* foi capaz de produzir, simultaneamente, as enterotoxinas ST e LT.

Tabela 1 - Distribuição de enteropatógenos isolados das fezes de crianças com gastroenterite aguda em Belém do Pará

Etiologia	Casos de diarreia	
	Nº	%
Bacteriana	10	30,3
<i>E. coli</i> enteropatógena clássica	4	
enterotoxigênica	3	
<i>Sh. flexneri</i>	1	
<i>S. belém</i>	1	
<i>S. typhimurium</i>	1	
Viral	13	39,4
Rotavírus	11	
Enterovírus	2	
Mista	10	30,3
<i>Sh. flexneri</i> + <i>E. coli</i> clássica	1	
<i>Sh. flexneri</i> + <i>E. coli</i> enterotoxigênica + enterovírus	1	
<i>Sh. sonnei</i> + <i>G. lamblia</i>	1	
<i>E. coli</i> enterotoxigênica + enterovírus	3	
<i>E. coli</i> clássica + rotavírus	1	
rotavírus + enterovírus	3	
Total	33	100

Discussão

As diarreias continuam sendo a maior causa de mortalidade infantil nos países em desenvolvimento. Na África, Ásia e América Latina, são registrados, anualmente, mais de 500 milhões de casos em crianças menores de 5 anos de idade e cerca de 5 milhões de óbitos (7). Rotavírus e *E. coli* enterotoxigênica têm sido, juntos, incriminados como responsáveis por mais de 50% dos casos de diarreia em crianças abaixo de 5 anos de idade (24). Em nosso estudo verificamos que esses dois agentes causais de gastroenterite, estiveram presentes em 32% das situações além de 8 casos de infecção mista (Tabela 1).

O fato de que as cepas de *E. coli* enterotoxigênicas não terem sido capazes de produzir simultaneamente as enterotoxinas ST e LT, sugere ser frequente a produção isolada de enterotoxinas nas amostras de origem humana, em nosso meio. Serafim & col. (16), em S. Paulo, isolaram 3 amostras de *E. coli* de pacientes com diarreia, que produziam somente enterotoxina ST. Magalhães & col. (13), no Recife, detectaram *E. coli* enterotoxigênica em sete (12%) crianças com diarreia. Entre as amostras isoladas 4 produziram somente enterotoxina ST, uma apenas enterotoxina LT e 2 produziram ambas enterotoxinas (ST e LT). Guigliano & col. (9), em Manaus, reportaram a ocorrência de *E. coli* enterotoxigênica em crianças sem sintomatologia gastrointestinal, quando estudaram 360 cepas de *E. coli* isoladas de 72 lactentes de um bairro de baixa renda da cidade de Manaus, sendo que em um dos casos as cepas isoladas fo-

ram capazes de produzir ambas enterotoxinas e, no outro, somente a enterotoxina ST₁ (Tabela 2).

Atualmente a importância do encontro de amostras enterotoxigênicas de colibacilos que produzem exclusivamente a enterotoxina LT tem sido contestada por alguns autores (21), uma vez que estas amostras têm sido isoladas com frequências semelhantes de indivíduos normais e com diarreia. Por outro lado, tem se sugerido que o encontro de amostras ST⁺, principalmente se houver produção simultânea de LT, tem maior significação pois não ocorrem com frequência em indivíduos normais, sendo isoladas comumente de casos de diarreia (21).

Este aspecto de produção isolada de enterotoxinas, tem se repetido inclusive quando se investiga animais com diarreia. Simões (19) trabalhou com 700 amostras de *E. coli* isoladas de suínos com diarreia e 14 (2%) demonstraram produzir enterotoxina LT quando examinadas pelo ensaio de células da linhagem Y-1. Dentre 500 amostras das 700 isoladas, observou a existência de 23 (4,6%) colibacilos capazes de produzir a enterotoxina ST.

A associação entre dois ou mais agentes enteropatogênicos bem como a alta frequência com que se detectou rotavírus e em menor quantidade enterovírus sugerem, no concerne a Belém do Pará, que a etiologia das diarreias infantis nesta localidade, é bastante ampla, necessitando-se, pois, de infraestrutura diversificada capaz de incluir no diagnóstico etiológico, além das enterobactérias estudadas no presente trabalho, agentes virais tais como rotavírus e enterovírus. Salienta-se que a pesquisa de *Campylobacter jejuni*, não tendo sido realizada, poderia com grande probabilidade figurar entre os agentes pesquisados, uma vez que esta faixa etária parece ser mais sensível à infecção por esta bactéria (Loureiro, E.C.B. & Lins, Z.C. - Observações sobre o isolamento de *Campylobacter jejuni* de crianças com gastroenterite aguda em Belém do Pará. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. No prelo).

Os rotavírus isolados em 11 situações, assumem reconhecida importância (12) na etiologia das diarreias agudas. Já os enterovírus, detectados em 2 espécimes fecais, têm patogenicidade questionável, conforme alguns autores (14). Entre os agentes virais capazes de produzir gastroenterite aguda ainda figuram os "parvovirus-like" (11), cujo diagnóstico laboratorial requer métodos especializados como a imuno-microscopia eletrônica e a hemaglutinação por imuno-aderência, não disponíveis em nossa investigação.

Por outro lado, queremos colocar em evidência que o encontro de amostras enterotoxigênicas de colibacilos em fezes de crianças com gastroenterite aguda em Belém do Pará, constitui-se na primeira detecção desta natureza na região Amazônica do Brasil.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Dra. Zéa Constante Lins pelo apoio recebido, aos Srs. Wanderley J. Ferraro e Raimundo Nonato Q. da Fonseca pela cooperação técnica, ao corpo médico e enfermeiras do Hospital da Santa Casa do Pará e ao Dr. Augusto Serruya pela colaboração no envio dos espécimes para exame e ao Dr. Ricardo Ishak pela revisão do manuscrito.

Tabela 2 - Frequência das amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênicas isoladas das fezes de crianças com gastroenterite aguda

Produção de enterotoxina	Teste utilizado	Nº de amostras examinadas	Nº amostras positivas (%)
LT	Imuno-hemólise passiva	153	04 (2,6)
ST	Camundongo recém-nascido	153	13 (8,5)

Referências Bibliográficas

1. Castro, A.F.P.; Serafim, M.B.; Gomes, J.A. & Gatti, M.S. - Improvements in the passive immune hemolysis test for assaying enterotoxigenic *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol., 12:714-717, 1980.
2. Dean, A.G.; Ching, Y.; Williams, R.G. & Harden, L.B. - Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. J. Infect. Dis., 125:407-411, 1972.
3. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of Enterobacteriaceae. 3.ed. Minneapolis, Minnesota, Burgess Publishing, 1972.
4. Evans, D.J.; Evans D.G. & Gorbach, S.L. - Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. Infect. Immun., 8:725-730, 1973.
5. Evans, D.J.; Evans, D.G. & Gorbach, S.L. - Polymyxin B: induced release of low-molecular-weight, heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*. Infect. Immun., 10:1010-1017, 1974.
6. Evans, D.J. & Evans, D.G. - Direct serological assay for the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*, using passive immune hemolysis. Infect. Immun., 16:604-609, 1977.
7. Fundação Serviços de Saúde Pública - Doenças diarreicas e reidratação. Boletim Epidemiológico, 13:53-57, 60, 1981. (Adaptação de "tratamento clínico da diarreia aguda". Grupo de trabalho científico da OMS, Doc. WHO/DDC/79.3. Original em inglês).
8. Giugliano, L.G.; Meneguetti, M.A.M. & Trabulsi, L.R. - Produção de enterotoxina LT por amostras de *Escherichia coli*. Rev. Microbiol. (S.Paulo), 9:11-17, 1978.

Giugliano, L.G.; Nakagima, G.S.; Giugliano, R. & Shrimpton, R. - *Escherichia coli* enterotoxigênica isolada de lactentes em Manaus, Amazonas, Brasil. Rev. Microbiol. (S.Paulo), 9:198-201, 1978.
10. Guerrant, R.L.; Moore, R.A.; Kirschenfeld, P.M. & Sande, M.A. - Role of toxigenic and invasive bacteria in acute diarrhea of childhood. N. Engl. J. Med., 293:567-573, 1975.
11. Kapikian, A.Z.; Wyatt, R.G.; Dolin, R.; Thornhill, T.S.; Kalica, A.R. & Chazock, R.M. - Visualization by immune electron microscopy of a 27nm particle associated with acute infection non-bacterial gastroenteritis. J. Virol., 10:1075-1081, 1972.
12. Linhares, A.C.; Loureiro, E.C.B.; Gabbay, I.B.; Monção, H.C.; Araújo, V.L.C.; Lins, Z.C.; Pinheiro, F.P. & Neto, H.F. - Pesquisas de agentes virais, bacterianos e parasitários associados a diarreia infantil em Belém do Pará (Nota prévia). Hiléia Médica (Belém), 2:59, 1980.
13. Magalhães, M.; Andrade, M. & Carvalho, A.E. - Pathogenic *Escherichia coli* associated with infantile diarrhea. Rev. Microbiol. (S.Paulo), 12:38-41, 1981.
14. Ramos, A.M. & Olarte, J. - Diarrhoeal diseases of children. Am. J. Dis. Child, 107:218-231, 1964.

15. Sack, B.R. - Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. Ann. Rev. Microbiol., 29:333-353, 1975.
16. Serafim, M.B.; Castro, A.F.P.; Rangel, H.A. & Neto, L.P. - Isolation of heat-stable enterotoxin-producing strains of *Escherichia coli* isolated from cases of diarrhea in Campinas, SP, Brasil. Rev. Inst. Med. Trop. (S.Paulo), 19:144-147, 1977.
17. Serafim, M.B.; Castro, A.F.P.; Reis, M.H.L. & Trabulsi, L.R. - Passive immune hemolysis for detection of heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli* isolated from different sources. Infect. Immun., 24:606-610, 1979.
18. Simões, M.; Serafim, M.B.; Rodrigues, A.C.; Giorgi, W.; Netto, L.P. & Castro, A.F.P. - Amostras de *Escherichia coli*, de origem animal, produtoras de enterotoxina termoestável (ST) isoladas de casos de diarréia em São Paulo, SP. Rev. Microbiol. (S.Paulo), 8:143-144, 1977.
19. Simões, M. - Fatores de virulência e sensibilidade a drogas em colibacilos isolados de suínos com diarréia. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1979. (Tese de Mestrado).
20. Spence, L.; Fauvel, M.; Bouchard, S.; Pubuik, L. & Saunders, J.R. - Test for reovirus-like agent. Lancet, ii:322, 1975.
21. Trabulsi, L.R. - Microbiologia das infecções intestinais. Rio de Janeiro, Atheneu, 135p. Vol. 1 (Atualização em microbiologia clínica) 1981.
22. Voller, A.; Bartlett, A. & Bidwell, D. - Enzyme immunoassays with special reference to ELISA Technique. J. Clin. Path., 31:507-520, 1978.
23. WHO Scientific Working Group - *Escherichia coli* diarrhoea. Bull. Wld. Hlth. Org., 58:23-36, 1980.
24. World Health Organization - Diarrhoeal diseases in the Americas. Wkly. Epidem. Rec., 55:330-334, 1980.