

## INVESTIGAÇÕES LABORATORIAIS SOBRE A ENTERITE INFANTIL POR *E. coli* G. E. I.

AUGUSTO DE E. TAUNAY (\*)

HÉLIO MARTINS (\*\*)

JÚLIO TOPOROWSKI (\*\*\*)

L. A. DE TOLEDO (\*\*\*\*)

ETHEL S. PEIXOTO (\*\*\*\*\*)

A opinião de Czerny e sua Escola de que as diarréias infantis teriam os erros dietéticos como causa principal levou os pediatras das primeiras décadas dêste século a se orientarem nesse sentido por muitos anos. Todavia, as investigações mais recentes de HORMAECHÉ e col. (1936), BRAY (1945), KAUFFMANN (1954) e de muitos outros pesquisadores serviram para demonstrar de maneira clara e irretorquível que a etiologia infecciosa deve ser considerada em primeiro lugar quando nos encontramos face aos processos diarréicos do recém-nascido e do infante.

Ao planejar a presente investigação, tivemos em mira principalmente verificar a participação etiológica dos germes do grupo *coli* na gênese das infecções entéricas agudas da infância, incidentalmente assinalando a eventual ocorrência das enterobactérias dos gêneros *Shigella* e *Salmonella* e isto porque a importância etiopatogênica destas já está sobejamente comprovada.

No tocante ao grupo *coli*, a soma das pesquisas empreendidas nos últimos dez anos em vários países autoriza afirmar a existência de certos tipos de colibacilos (grupo G-E-I. = gastroenterite infantil) certamente patogênicos para crianças e mesmo para adultos (FERGURSON e col., 1952; KOYA e col., 1954), neste caso quando

---

(\*) (\*\*) Médicos do Instituto Adolfo Lutz.

(\*\*\*) (\*\*\*\*) Médicos do Serviço de Pediatria da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

(\*\*\*\*\*) Técnico de Laboratório do Instituto Adolfo Lutz.

ingeridos em grande número. Assim, a diarréia epidêmica do recém-nascido, que tem sido o terror dos hospitais infantis, em muitos casos só teve sua etiologia esclarecida depois do emprêgo de técnicas apropriadas capazes de identificar aquêles tipos especiais de colibacilos patogênicos. Por outro lado, além de nas fezes de crianças e adultos com distúrbios intestinais, o achado de tais enterobactérias tem sido assinalado com freqüência no ambiente hospitalar [ROGERS (1951)] bem como nos objetos de uso das crianças (Editorial J. A. M. A., 1954), nas mãos e na rinofaringe de enfermeiras, assim demonstrando a facilidade com que se podem infectar as crianças de tenra idade, justamente as mais sensíveis à enterite provocada pelo *coli* G. E. I.

No quadro I estão reproduzidos os tipos mais importantes de *E. coli* G. E. I. até hoje descritos, sua constituição antigênica, a sinonímia, os nomes dos autores que primeiro os assinalaram e o ano correspondente.

QUADRO I

| Antígenos  |     |                        | Sinônimos  | Autores                                   | Ano                  |
|------------|-----|------------------------|--|---|----------------------|
| O          | K   | H                      |  |   |                      |
| 111 .....  | B4  | 2, 12, 21<br>ou imóvel | <i>B. coli neapolitanum</i><br><i>B. coli tipo A</i><br>Tipo D 433 | Bray<br>Giles e Sangster<br>Taylor e col. | 1945<br>1948<br>1949 |
| 55 .....   | B5  | 2, 6, 7<br>ou imóvel   | <i>B. coli tipo B</i>  | Giles e col.                              | 1949                 |
| 26 .....   | B6  | 11 ou imóvel           | <i>E. coli</i> 0 26  | Orskov                                    | 1951                 |
| 112a, 112c | B11 |                        | <i>Sh. guanabara</i>   | Assis                                     | 1948                 |
| 86 .....   | B7  | 8, 9, 10, 11           | Tipo E 990   | Charter e Taylor                          | 1952                 |
| 125 .....  | B15 | 19                     | Canioni Vincent  | Charter e Taylor                          | 1952                 |
| 126 .....  | B16 | 2                      | E. 611   | Charter e Taylor                          | 1952                 |
| 127 .....  | B8  |                        | <i>E. coli</i> 0 127 B8  | Ewing e col.                              | 1955                 |

De todos os tipos de *E. coli* acima catalogados, apenas os pertencentes aos grupos somáticos 111, 55, 26 e 86 têm sido assinalados pela generalidade dos pesquisadores em países diferentes [Clement e col. (1953); Buttiaux e col. (1951); Le Minor e col. (1954); Spillmann e col. (1954); Shanks (1952); Modica e col. (1952); Graber e col. (1954); Wright e col. (1953); Gronroos

(1954 e 1957); Belnap (1956)], de tal modo que os podemos considerar como os mais importantes do ponto de vista da freqüência.

Também em nosso meio, TAUNAY e col. (1956) relataram o achado desses germes, com freqüência bastante alta, em casos de enterites agudas de recém-nascidos internados em hospital, motivo por que julgamos de grande interêsse empreender a presente investigação no sentido de verificar sua incidência no ambiente hospitalar e extra-hospitalar.

A par da verificação que realizamos sôbre a incidência de colibacilos patogênicos, damos conta de uma série de investigações visando a comparar técnicas de colheita de material para coproculturas e métodos bacteriológicos diversos.

Fizemos também provas de sensibilidade "in vitro" dos referidos germes a antibióticos, verificamos a presença de anticorpos específicos no sôro, pesquisamos portadores de germes (homens) e realizamos tentativas de infecção experimental em cobaios e camundongos.

## I — TÉCNICAS DE COLHEITA DAS FEZES PARA COPROCULTURA

Até hoje não existe acôrdo perfeito sôbre se há ou não vantagem em examinar fezes passadas naturalmente ou colhidas diretamente na ampola retal (o chamado método do "swab" retal). Entre os pesquisadores nacionais, são partidários do segundo processo ASSIS (1935), TAUNAY (1951) e MAROJA (1956). Entretanto, mais recentemente TAUNAY e col. (1956), comparando métodos de colheita de material em adultos portadores de enterocolites crônicas, obtiveram melhores resultados quando examinaram fezes passadas naturalmente.

THOMAS (1954) indica várias falhas do "swab" retal e HARDY (1955) (um dos preconizadores do método por nós empregado), estudando a incidência de salmonelas em fezes de porcos, acentua que a colheita pelo "swab" feita logo após a morte do animal — com o esfíncter relaxado — permite o dôbro de isolamentos positivos, em confronto com a colheita no animal vivo. Dos mesmos animais, conseguiu resultados ainda melhores cultivando fezes obtidas no ceco.

Nos casos objeto do presente estudo (processos intestinais agudos) é natural que o número de germes das fezes seja muito grande, motivo por que resolvemos adotar o método do "swab"

preconizado por HARDY e WATT (1944), em virtude de sua simplicidade e da grande facilidade que oferece por permitir realizar a qualquer tempo a colheita do material para coprocultura. Necessário se fazia compará-lo com o exame das fezes passadas normalmente para nos certificar de que o método podia ser aplicado com segurança. Com essa finalidade, examinamos um grupo de 40 crianças da Clínica Pediátrica do Hospital das Clínicas de São Paulo, de idade variável entre 1 mês e 5 anos, tôdas padecentes de enterites agudas, de quem semeamos fezes colhidas naturalmente e pelo método do "swab", sendo que para a maioria delas o exame foi feito mais de uma vez. Ao todo realizamos 74 coproculturas para cada tipo de colheita (total 148). Tanto o "swab" como as fezes colhidas naturalmente foram semeados nos mesmos terrenos de cultivo (ágar S. S., meio de Holt-Harris-Teague e ágar-sangue) e dêles foi isolado igual número de colônias. Os resultados estão esquematizados no quadro II.

QUADRO II

| ENTEROBACTERIA<br>ISOLADA   | " S W A B " |      |        | FEZES COLHIDAS<br>NATURALMENTE |      |        |
|-----------------------------|-------------|------|--------|--------------------------------|------|--------|
|                             | Pos.        | Neg. | % Pos. | Pos.                           | Neg. | % Pos. |
| <i>E. coli</i> G.E.I.       | 15          | 59   | 21,4   | 18                             | 56   | 24,3   |
| Grupo <i>Shigella</i>       | 10          | 64   | 13,5   | 10                             | 64   | 13,5   |
| Grupo <i>Salmonella</i> (*) | 1           | 73   | 1,3    | 1                              | 73   | 1,3    |

(\*) Das fezes semeadas em meio de selenito, isolamos mais 4 salmonelas após enriquecimento de 5 dias em estufa a 37° C.

Por aí se vê que as diferenças de positividade observadas para os germes do grupo *coli* G.E. I. não são significantes no sentido de indicar como melhor tal ou qual método de colheita, ficando unicamente comprovada a necessidade de empregar um meio de enriquecimento para salmonelas.

## II — MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS

O emprêgo de meios de cultura seletivos para o isolamento de enterobactérias patogênicas tem sido de tal modo estudado que julgamos fastidioso insistir no assunto. Todavia, o problema merece debatido no caso particular do colibacilo e isto porque a maioria

dos meios empregues para a coprocultura contém em sua composição substâncias impeditivas para bactérias do grupo *coli*, o que obviamente nos obrigou a utilizar também terrenos de cultivo isentos das referidas substâncias (ágar-sangue). Por outro lado, os bacilos *coli* do grupo G. E. I. não possuem qualquer característica morfológica que os permita diferenciar dos outros tipos de *E. coli* e até hoje não se conhece qualquer método descrito para tal fim.

Recentemente GERBEAUX (1955) descreveu meio líquido destinado a promover o enriquecimento de *E. coli* G. E. I. em detrimento da flora habitual. Resolvemos, por isso, controlar a utilidade do citado meio de enriquecimento e, ao mesmo tempo, comparar alguns dos terrenos de cultivo habitualmente empregues na seleção de enterobactérias. Para êsse fim, fizemos 59 coproculturas (correspondentes a 31 crianças do grupo precedentemente estudado) com fezes colhidas pelo método do "swab" e semeadas ao mesmo tempo nos seguintes meios de cultura: ágar S.S., Holt-Harris-Teague, ágar-sangue e meio de Gerbeaux. Após 24 horas de incubação em estufa, o crescimento do meio de Gerbeaux era semeado em placas de Holt-Harris-Teague e ágar-sangue.

Para controlar a possibilidade de o meio de enriquecimento ser prejudicado pela passagem prévia do estilete pelas placas (S. S. e H. H. T.), colhemos fezes que foram emulsionadas em solução tamponada de glicerina-cloreto de sódio e meio de Gerbeaux e daí semeadas nos mesmos terrenos de cultivo, usando sempre a mesma técnica e isolando de tôdas as placas igual número de colônias. No quadro III estão esquematizados os resultados obtidos.

Analisando agora, globalmente, os quadros II e III, podemos concluir que a colheita das fezes pelo método "swab" pode ser empregue com segurança, restrição feita para a pesquisa de salmonelas.

Com relação aos meios de cultura, nossas verificações permitem concluir: 1) não há qualquer vantagem em usar o meio de enriquecimento de Gerbeaux para *E. coli* G. E. I.; 2) melhores resultados são obtidos mediante a associação de ágar S.S. e meio de Holt-Harris-Teague; 3) terrenos de cultura altamente seletivos (como o ágar S.S.) não devem ser utilizados isoladamente quando também se pretende o isolamento de *E. coli* G. E. I.

Diante desses resultados, estabelecemos a seguinte técnica, que foi usada para tôdas as crianças cujas fezes examinamos bacteriológicamente na presente pesquisa.

QUADRO III

| Enterobactéria isolada       | "SWAB" DIRETO      |      |       |        |      |       |             |      |       | "SWAB" ENRIQUECIDO EM MEIO DE GERBEAUX |      |       |             |      |       |
|------------------------------|--------------------|------|-------|--------|------|-------|-------------|------|-------|--|------|-------|-------------|------|-------|
|                              | ÁGAR S.S.          |      |       | H.H.T. |      |       | ÁGAR-SANGUE |      |       | H.H.T.                                 |      |       | ÁGAR-SANGUE |      |       |
|                              | Pos.               | Neg. | %pos. | Pos.   | Neg. | %pos. | Pos.        | Neg. | %pos. | Pos.                                   | Neg. | %pos. | Pos.        | Neg. | %pos. |
| <i>E. coli</i> G. E. I. .... | 5                  | 54   | 8,4   | 12     | 47   | 20,3  | 9           | 50   | 15,2  | 7                                      | 52   | 12,1  | 6           | 53   | 10,1  |
| <i>Shigella</i> sp. ....     | 7                  | 52   | 12,1  | 3      | 56   | 5,0   | 0           | 59   | 0,0   | 0                                      | 59   | 0,0   | 0           | 59   | 0,0   |
| <i>Salmonella</i> sp. ....   | 0                  | 59   | 0,0   | 1      | 58   | 1,5   | 0           | 59   | 0,0   | 0                                      | 59   | 0,0   | 0           | 59   | 0,0   |
| Enterobactéria isolada       | FEZES EM GLICERINA |      |       |        |      |       |             |      |       | FEZES ENRIQUECIDAS EM MEIO DE GERBEAUX |      |       |             |      |       |
|                              | ÁGAR S.S.          |      |       | H.H.T. |      |       | ÁGAR-SANGUE |      |       | H.H.T.                                 |      |       | ÁGAR-SANGUE |      |       |
|                              | Pos.               | Neg. | %pos. | Pos.   | Neg. | %pos. | Pos.        | Neg. | %pos. | Pos.                                   | Neg. | %pos. | Pos.        | Neg. | %pos. |
| <i>E. coli</i> G. E. I. .... | 5                  | 54   | 8,4   | 9      | 50   | 15,2  | 8           | 51   | 13,5  | 10                                     | 49   | 16,9  | 10          | 49   | 16,9  |
| <i>Shigella</i> sp. ....     | 7                  | 52   | 12,1  | 3      | 56   | 5,3   | 0           | 59   | 0,0   | 0                                      | 59   | 0,0   | 0           | 59   | 0,0   |
| <i>Salmonella</i> sp. ....   | 1                  | 58   | 1,5   | 0      | 59   | 0,0   | 0           | 59   | 0,0   | 0                                      | 59   | 0,0   | 0           | 59   | 0,0   |

1) — Colheita do material pelo método do "swab" retal, segundo a técnica de HARDY e WATT (1944).

2) — Semeadura em placas de ágar S. S. e de Holt-Harris-Teague.

3) — Semeadura das fezes que restam na cânula (assim como do restante que impregna o algodão do estilete) em meio de selenito, cujo crescimento, após incubação de 5 dias, será transplantado para meios de ágar S. S. e verde brilhante de Christensen-Jurgens-Kauffmann. Isolar uma média de 15 colônias, “pescando” as fermentadoras e as não fermentadoras da lactose. Tôdas as colônias são isoladas em meio de tríplice açúcar modificado (RUGAI) que, além da viragem clássica, nos informa quanto à capacidade do germe na produção de hidrogênio sulfurado e no desdobramento da uréia.

Quando a viragem do tríplice nos indica tratar-se de *Salmonella sp.* ou *Shigella sp.*, procedemos à identificação e tipagem de acôrdo com as normas preconizadas por TAUNAY (1951) e NOVAES e col. (1950). Nos tubos com viragem típica de bacilo do grupo coliforme, empregamos métodos que, por serem pouco usados, merecem descritos detalhadamente.

*Identificação pròpriamente dita* — A todos os tubos de tríplice açúcar modificado onde há produção de ácido e gás na base e no ápice: 1) juntar aproximadamente 0,5 cm<sup>3</sup> de solução fisiológica estéril; 2) colocar dentro do tubo uma pequena porção de algodão hidrófilo; 3) com pipeta estirada, suspender o crescimento microbiano da parte inclinada do tubo, raspando a superfície do ágar com o algodão; 4) emulsionar os germes do algodão na solução fisiológica; 5) aspirar a suspensão através do algodão; 6) colocar sôbre os quadrados de uma placa de vidro tipo Huddleson tantas gotas dessa emulsão quantos forem os soros usados; 7) depositar sôbre cada gôta da emulsão 1 gôta de sôro prèviamente titulado; 8) misturar bem e proceder à leitura.

Quando positiva, a aglutinação é quase instantânea e dificilmente verificamos reações cruzadas entre os vários soros (quando estas ocorreram, as verificações sucessivas mostraram não se tratar de bacilo *coli* G. E. I.). Em todos os tubos em que há aglutinação, procedemos ao reisolamento do germe em placas de Holt-Harris-Teague a partir do restante das emulsões bacterianas existentes nos tubos de tríplice açúcar. Novamente procedemos à aglutinação em lâmina, tomando o cuidado de evitar qualquer contaminação da cultura.

Tal maneira de proceder só tem o inconveniente de obrigar o reisolamento do germe; todavia, nem uma só vez deixamos de recuperar nas placas de Holt-Harris-Teague a bactéria identificada na primeira aglutinação, apesar de usarmos uma só pipeta estirada

para aspirar tôdas as emulsões, assim demonstrando não haver possível contaminação que nos indicasse a necessidade de mudar de técnica. Esta, por sua simplicidade e rapidez, permite examinar dezenas de tubos em tempo muito limitado e nisto consiste sua primordial vantagem.

Procede-se finalmente à identificação sorológica empregando dois antígenos, um de germes vivos e outro de bactérias mortas pelo aquecimento a 100° C durante 1 hora. As provas de aglutinação são feitas em tubo em diluições sucessivas correspondentes aos títulos dos soros, permanecendo as reações em estufa a 37° C para leitura após 24 horas. Na maioria dos casos ainda se faz uma prova de confirmação: aglutinações com sôro O usando como antígeno emulsões autoclavadas a 120° C por meia hora. Procede-se ulteriormente à identificação dos antígenos flagelares.

As reações positivas eram confirmadas mediante aglutinações em tubo até o título do mesmo sôro que fôra positivo em lâmina. Sômente os germes que superavam tôdas essas provas eram considerados pertencentes ao grupo G. E. I.

Procedemos ulteriormente à identificação dos antígenos flagelares e como não dispomos de uma coleção completa de amostras padrões de *E. coli*, só pudemos preparar 4 soros flagelares (H 2 — H 12 — H 11 — H 6), que foram usados para complementar a identificação, uma vez que o germe pôde ser identificado pelos seus antígenos O-K, havendo interêsse em diferenciá-los pelo antígeno H sômente quando se procede a investigações epidemiológicas.

A razão de assim proceder decorre do fato de que os bacilos do grupo *coli* podem possuir três tipos de antígenos: 1) somático O, específico do grupo, caracterizado por sua termo-resistência e não ser degradado pelo álcool; 2) as formas móveis possuem também um antígeno flagelar H, termolábil, resistente ao formol e sempre monofásico; 3) além dêsses, podem apresentar um terceiro, que é, por assim dizer, o antígeno de envoltório, denominado K. A denominação antígeno K não é sinônimo de antígeno capsular: designa antígenos de superfície e capsulares que podem estar presentes em *E. coli*.

O antígeno K pode ser: L — antígeno de superfície; A — que deve ser considerado como o verdadeiro antígeno capsular; B — antígeno de envoltório que, como o antígeno L, é termolábil, diferenciando-se dêste por não perder a capacidade de remover aglutininas pelo aquecimento a 100° C. De todos os antígenos K,



é justamente o antígeno B o que tem maior interêsse na identificação de *E. coli* G. E. I.

Até agora não foi possível preparar soros B puros, porque se o calor inibe a aglutinabilidade desse antígeno, não o destrói a ponto de impedir que sature as aglutininas de um sôro OB. O fato de não conhecermos germes desses grupos possuindo antígenos (O) somáticos iguais e B diferentes impede que se utilize a absorção de aglutininas.

Estabelecidos êsses pontos, podemos preparar soros a partir de germes vivos, portanto contendo antígenos OB capazes de aglutinar em lâmina as culturas correspondentes. Nas aglutinações feitas em tubo, com incubação em estufa, usando germes vivos como antígeno, obtemos baixos títulos aglutinantes, havendo formação de conglomerados granuloses. Se êsses antígenos forem aquecidos a 100° C por uma hora, com a inativação do antígeno B veremos aparecer a aglutinação O, esta em títulos elevados (1/5.000 ou mais), enquanto a aglutinação B não ultrapassa em geral de 1/3 o título aglutinante O.

Preparamos soros OB imunizando coelhos, por via venosa, com culturas vivas de germes semeados em ágar comum. Fizemos cinco inoculações em dias alternados atingindo cêrca de 5 bilhões de germes, sangrando os animais 5 dias após a última inoculação. Obtivemos com facilidade soros com títulos aglutinantes OB de 1/30 (em lâmina) e O, de 1/6.400 (em tubos).

Soros O foram obtidos a partir de culturas de 24 horas em ágar comum, cujas emulsões eram mortas em autoclave a 120° C por 2 horas. O esquema de inoculação foi o mesmo e os títulos obtidos em geral estavam em tórno de 1/2.000.

Na preparação de soros H, tivemos muitas dificuldades. As culturas utilizadas para preparo de tais soros, inicialmente imóveis, obrigaram-nos a grande trabalho para induzir-lhes movimento. Para isso, usamos a técnica preconizada por CRAIGIE (1931), alterando unicamente o meio de cultura, a que adicionamos 0,5 por mil de glicose e indicador de azul de bromotimol. O emprêgo desse ágar semi-sólido modificado facilita a verificação da motilidade do germe, que pode ser acompanhada pela viragem do meio de cultura. Consideramos a cultura satisfatòriamente móvel quando capaz de passar do ágar do tubo central para a superfície superior em 24 horas. Daí fizemos transplantes para tubos de caldo comum que, depois de incubados por 24 horas em estufa, eram formolados a 0,4%.

As culturas assim obtidas serviram para o preparo de soros aglutinantes e foram também usadas como antígeno nas reações de aglutinação. No caso de aglutinações com antígeno H, as reações foram feitas em banho-maria a 52° C por 2 horas, quando se procedia à leitura. Não conseguimos títulos aglutinantes flagelares superiores a 1/2.000, apesar de havermos obtido culturas muito móveis, motilidade essa verificada nos tubos de Craigie e em gôta pendente.

Finalmente, tôdas as culturas foram examinadas do ponto de vista biomorfológico, tendo sido testadas bioquimicamente as amostras de *E. coli* G. E. I., cujos resultados se acham resumidos no quadro IV.

QUADRO IV

| BIOQUÍMICA             | Grupo 0 111 |      | Grupo 0 86 |      | Grupo 0 55 |      |
|------------------------|-------------|------|------------|------|------------|------|
|                        | Pos.        | Neg. | Pos.       | Neg. | Pos.       | Neg. |
| Dextrose .....         | 98          | 0    | 8          | 0    | 3          | 0    |
| Lactose .....          | 98          | 0    | 8          | 0    | 3          | 0    |
| Sacarose .....         | 98          | 0    | 6          | 2    | 3          | 0    |
| Inosita .....          | 98          | 0    | 8          | 0    | 3          | 0    |
| H <sub>2</sub> S ..... | 0           | 98   | 0          | 8    | 0          | 3    |
| Uréia .....            | 0           | 98   | 0          | 8    | 0          | 3    |
| Citrato .....          | 1           | 97   | 0          | 8    | 0          | 3    |
| V.P. ....              | 0           | 98   | 0          | 8    | 0          | 3    |
| V.M. ....              | 98          | 0    | 8          | 0    | 3          | 0    |

Pela análise do quadro IV, verifica-se que tôdas as amostras estudadas se enquadram perfeitamente na espécie *E. coli*, uma só delas se tendo mostrado capaz de utilizar o citrato como fonte de carbono.

## RESULTADOS

Os resultados que serão apresentados referem-se a três grupos de crianças portadoras de gastroenterite aguda.

1.º grupo — Quarenta crianças de idade variável entre 1 mês e 5 anos que serviram para comparar os métodos de trabalho utilizados, internadas na Clínica Pediátrica do Hospital das Clínicas de São Paulo (\*). O exame foi realizado quando da internação e os resultados acham-se esquematizados no quadro V.

(\*) Os A. A. agradecem ao dr. Azarias de Andrade Carvalho pelas facilidades concedidas na obtenção do material.

QUADRO V

| Enterobactérias patogênicas (*)                   | Negativos      | Positivos       |
|---|----------------|-----------------|
| <i>E. coli</i> 0 111:B4 .....                     |                | 7(26,9%)        |
| <i>E. coli</i> 0 86:B7 .....                      |                | 2( 7,6%)        |
| <i>S. newport</i> + <i>E. coli</i> 0 111:B4 ..... |                | 1( 3,8%)        |
| <i>Sh. flexneri</i> .....                         |                | 5(19,2%)        |
| <i>Sh. sonnei</i> .....                           |                | 4(15,3%)        |
| <i>Sh. dysenteriae</i> 2 .....                    |                | 1( 3,8%)        |
| <i>Salmonella</i> sp. ....                        |                | 5(19,2%)        |
| <i>Sh. flexneri</i> + <i>S. montevideo</i> .....  |                | 1( 3,8%)        |
| <b>TOTAL .....</b>                                | <b>14(35%)</b> | <b>26(65 %)</b> |

(\*) Soros *E. coli* G.E.I. usados na identificação: 0 111, 0 55, 0,26, 0,86.

2.º grupo — O segundo grupo compreende 90 crianças, na sua quase totalidade menores de 2 anos, internadas no Serviço de Hidratação da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, apresentando distúrbio nutritivo agudo. Acusavam desidratação de maior ou menor gravidade, necessitando tôdas elas de re-hidratação endovenosa. A diarréia, às vêzes precedida por vômitos mais ou menos intensos, foi sintoma constante. As deposições, em número variável (em média mais de 10 por dia), eram muco-sanguinolentas em 15% dos casos. Por ocasião da hospitalização, cêrca de 80% dessas crianças apresentavam temperatura elevada.

Na sua grande maioria, as crianças provinham de bairros periféricos da cidade onde as condições econômico-sociais deixam muito a desejar: alimentação deficiente, água de poço na quase totalidade das casas, falta de esgôto, condições de higiene e habitação péssimas. Nestas condições, elevado número de crianças, além do distúrbio nutritivo agudo que motivou sua internação de urgência, apresentava grau variável de desnutrição (cêrca de 65%). Na sua quase totalidade, os lactentes eram alimentados artificialmente em condições de técnica e higiene precárias. Deve-se salientar que essas crianças não receberam qualquer tratamento medicamentoso anteriormente a seu atendimento e internação.

Para êste grupo foram usados na identificação dos bacilos *coli* os seguintes soros *E. coli* G. E. I.: 0 111, 0 55, 0 25, 0 86, 0 25, 0 127. Paralelamente se fez uma verificação de estafilococos com prova de coagulase positiva. Os resultados do 2.º grupo estão resumidos no quadro VI.

## QUADRO VI

| Enterobactérias patogênicas                      | Positivos  | Negativos  |
|--|------------|------------|
| <i>E. coli</i> 0 111 .....                       | 15 (16,6%) |            |
| <i>E. coli</i> 0 55 .....                        | 2 ( 2,2%)  |            |
| <i>E. coli</i> 0 111 + 0 26 .....                | 1 ( 1,1%)  |            |
| <i>E. coli</i> 0 55 + <i>Salmonella</i> sp. .... | 1 ( 1,1%)  |            |
| <i>E. coli</i> 0 111 + <i>Sh. flexneri</i> ..... | 1 ( 1,1%)  |            |
| <i>E. coli</i> 0 111 + <i>Sh. sonnei</i> .....   | 2 ( 2,2%)  |            |
| <i>Sh. flexneri</i> .....                        | 5 ( 5,5%)  |            |
| <i>Sh. sonnei</i> .....                          | 1 ( 1,1%)  |            |
| <i>Sh. alkalescens</i> .....                     | 1 ( 1,1%)  |            |
| <i>Salmonella</i> sp. ....                       | 4 ( 4,4%)  |            |
| TOTAL .....                                      | 33 (36,4%) | 57 (63,4%) |

Isolamos estafilococos coagulase-positivos em 45,5% dos casos, porcentagem que também assinalamos em fezes normais.

3.<sup>o</sup> grupo — 159 prematuros ou recém-nascidos com menos de 30 dias, sendo 138 portadores de gastroenterite aguda e 21 normais, todos da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas de São Paulo. (\*) Tratava-se de crianças que ainda não haviam deixado o hospital após o nascimento, de outras que aí vieram ter por moléstia diarréica, em consequência de outra afecção ou ainda devido a internação da mãe. Os resultados estão sintetizados no quadro VII. A verificação de *E. coli* foi feita para os grupos 0 111, 0 55, 0 86 e 0 26.

## QUADRO VII

| Crianças                                    | Números | Positivas <i>E. coli</i> G.E.I. |              | Negativas <i>E. coli</i> G.E.I. |              |
|---|---------|---------------------------------|--------------|---------------------------------|--------------|
|   |         | Êxito letal                     | Sobreviveram | Êxito letal                     | Sobreviveram |
| Internadas por moléstia diarréica .         | 17      | 3                               | 2            | 6                               | 6            |
| Internadas por moléstia não diarréica ..... | 55      | 17                              | 16           | 8                               | 14           |
| Nascidas no hospital                        | 66      | 15                              | 18           | 3                               | 30           |
| Grupo testemunho                            | 21      | 0                               | 2            | 1                               | 18           |
| TOTAL ....                                  | 159     | 35 (+)                          | 38           | 18                              | 68           |

(+) Das 35 amostras isoladas, 31 correspondiam ao grupo 0 111 e 4 ao grupo 0 86.

(\*) Os A. A. agradecem ao dr. W. Henrique Cardim pelas facilidades concedidas na obtenção do material.

Os quadros V, VI e VII mostram muito claramente a incidência elevada de *E. coli* G. E. I. em qualquer dos grupos examinados, nitidamente superior à de qualquer outra enterobactéria patogênica. Demonstram também a necessidade de se procurar evidenciar êsse tipo de germe quando se pesquisam bactérias enteropatogênicas. Os dados do quadro VII sugerem ser o germe encontrado pelo menos uma concausa do elevado êxito letal verificado. Nos 71 recém-nascidos nos quais se isolou *E. coli* G. E. I. houve 35 óbitos, ou seja quase 50%, contrastando nitidamente com o grupo de 67 crianças com diarréia e exame negativo, onde o êxito letal foi somente 17 ou seja 25,3%.

Que os colibacilos isolados não podem ser considerados como comensais habituais do intestino assim o demonstra a sua baixa incidência no grupo normal (9,5%), contrastando nitidamente com a cifra dos portadores de diarréia (50,7%), notando-se que o grupo normal habitava o mesmo ambiente.

#### PESQUISA DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS NO SÔRO

A presença de anticorpos sanguíneos específicos contra *E. coli* 0 111 tem sido constatada por vários autores, em geral em títulos baixos e número relativamente pequeno de crianças portadoras de infecção entérica. ADAMSON e col. (1951) e NETER e col. (1955) demonstraram que anticorpos correspondentes a *E. coli* não passam do organismo materno para o fetal e que, quando presentes na criança, sugerem infecção pós-natal. NETER e col. (1953) também verificaram aumento da taxa de anticorpos específicos em voluntários, após ingestão de *E. coli* 0 55.

Nessas condições, a demonstração de anticorpos sanguíneos específicos contra o colibacilo G. E. I. vem comprovar a importância etiopatológica do germe em questão e provavelmente os títulos baixos em que têm sido assinalados devem correr por conta da localização quase exclusivamente intestinal do processo bacteriano, sem invasão sistêmica, fenômeno também observado na disenteria bacilar.

Os métodos usados para a pesquisa de anticorpos específicos contra as enterobactérias quase sempre se baseiam na aglutinação bacteriana em presença do sôro do paciente e na reação de hemaglutinação. Como a primeira se tem mostrado muito pouco sensível, NETER e col. (1952) sugeriram a hemaglutinação com fundamento no fato de o antígeno somático de *E. coli* ser rapidamente adsorvido por hemácias e serem estas — assim modificadas — aglutináveis especificamente pelos anticorpos homólogos.

Tendo em vista os poucos resultados propiciados por essas duas provas na pesquisa de anticorpos específicos contra *E. coli* 0 111 : B 4, que é o mais freqüente, decidimos ensaiar novo método constituído por reação de microfloculação do tipo da prova V. D. R. L. para sífilis, na qual a cardiolípina é substituída pelo antígeno bacteriano de *E. coli*. Reação desse tipo já fôra experimentada por HUNTER e col. (1956) na pesquisa de anticorpos contra *Brucella* com resultados equivalentes aos da aglutinação bacteriana e apresentando a vantagem de se trabalhar sempre com antígeno bem estandardizado. Na presente investigação, os resultados da pesquisa de anticorpos pela nova prova de microfloculação são confrontados aos da hemaglutinação e da aglutinação simples.

## MATERIAL E MÉTODOS

Tôda vez que foi possível, obtivemos sangue dos recém-nascidos e dos infantes cujas fezes nos serviram para comparar métodos de colheita e técnicas bacteriológicas. Como assinalado anteriormente, o grupo infetado com *E. coli* 0 111 : B 4 representa a maioria das nossas coproculturas positivas; por isso, limitamos nossas pesquisas a êsse tipo de anticorpo. Examinamos soros de 37 infantes (cuja idade variou de 2 meses a 5 anos) e 41 recém-nascidos (até um mês de idade). Os soros foram conservados a  $-60^{\circ}$  C até a ocasião de serem testados.

### I — AGLUTINAÇÃO BACTERIANA

*Técnica* — Soros diluídos de 1/10 até 1/40; antígeno bacteriano obtido de cultura de *E. coli* 0 111 : B 4 (24 horas em estufa) semeada em ágar comum e suspensa em solução fisiológica e depois fervida em banho-maria por 30 minutos. Concentração usada para o antígeno equivalente ao tubo 3 da escala de Mac Farland. Incubação e leitura tipo reação de Widal.

### II — HEMAGLUTINAÇÃO

*Antígeno* — Culturas de *E. coli* 0 111 : B 4 semeadas em frascos de Roux com ágar comum e incubadas 24 horas a  $37^{\circ}$  C. O crescimento bacteriano foi suspenso em solução salina e depois autoclavado a  $120^{\circ}$  C por 15 minutos, então centrifugado a 4.000 rotações até que o líquido sobrenadante ficasse límpido e de côr ligeiramente amarelada; uma vez separado do depósito, estava pronto para servir como antígeno.

*Hemácias* — Usamos hemácias humanas tipo O Rh — negativo, obtidas do mesmo doador e conservadas na geladeira em solução B. R. K. Antes de sensibilizadas pelo antígeno, foram lavadas uma vez com solução salina simples.

*Sensibilização* — Mistura antígeno + hemácias (1,5%) uma hora em banho-maria a 37° C, agitando freqüentemente. Centrifugação e lavagem consecutiva das hemácias em salina, finalmente suspendendo-as em solução fisiológica na proporção de 1,5%. A reação pròpriamente dita consistiu em fazer diluições seriadas do sôro de 1/5 até 1/320 em volumes de 0,5 cm<sup>3</sup>, aos quais juntamos 0,5 cm<sup>3</sup> da suspensão de hemácias prèviamente sensibilizadas, duplicando assim as diluições. Incubação de 1 hora em banho-maria a 37° C com leitura imediata e repetida no dia seguinte, após 18 horas em geladeira.

Só foram consideradas positivas as reações que apresentavam hemácias bem aglutinadas depois de agitadas, grumos êstes que só se desfazem após forte agitação. Além dos testemunhos das hemácias, fizemos também um contrôle com sôro de coelho prèviamente imunizado com *E. coli* 0 111 : B 4, para comprovar a adsorção do antígeno por parte das hemácias.

### III — REAÇÃO DE MICROFLOCULAÇÃO COM ANTÍGENO LECITINO-COLESTEROLIZADO

*Reativos utilizados:* 1) solução alcoólica de colesterol a 1%; 2) solução alcoólica de lecitina “ex-beef” a 1% (“Sylvana Chemical Company”); 3) solução tampão de Eagle; 4) água destilada de pH 6 aproximado; 5) antígeno bacteriano: o mesmo utilizado na reação de hemaglutinação.

*Preparo do antígeno* — Num frasco com capacidade de 5 cm de fundo chato, juntar: 1) 0,85 cm<sup>3</sup> de água destilada pH 6 aproximado; 2) gotejar, com pipeta, 1 cm<sup>3</sup> da solução de colesterol a 1%, agitando constantemente; 3) adicionar a quantidade de lecitina prèviamente determinada (ver: titulação do antígeno), agitando fortemente durante 1 minuto; 4) juntar a quantidade de antígeno bacteriano prèviamente determinada (ver: titulação do antígeno) e agitar fortemente por 30 segundos; 5) acrescentar 2,5 cm<sup>3</sup> da solução tamponada de Eagle e agitar mais 30 segundos.

*Titulação do antígeno* — Na titulação do antígeno, variam sòmente as quantidades dêste e da lecitina. Procedese pelo modo descrito acima, ensaiando volumes de 0,05, 0,10, 0,15, e 0,20 cm<sup>3</sup> de lecitina frente a quantidades de 0,15, 0,20, 0,25, 0,30 e 0,40 cm<sup>3</sup>

de antígeno. Este foi titulado na presença de soros de coelhos previamente imunizados com *E. coli* 0 111 : B 4. Utilizamos 4 diferentes soros (obtidos mediante inoculação de germes vivos, mortos pelo calor e autoclavados) em diluições que variaram de 1/5 a 1/20 e determinamos como ótimos os volumes de 0,10 cm<sup>3</sup> de lecitina e de 0,30 cm<sup>3</sup> de antígeno.

O antígeno bacteriano foi também testado face a três diferentes anti-soros 0 55 : B5, 0 86 : B7 e 0 26 : B6 com resultado completamente negativo, o que atesta a sua especificidade.

Tanto na titulação do antígeno, como para a execução da reação, procede-se do mesmo modo: 1) em placas de vidro escavadas ou com anéis de parafina, colocar 0,05 cm<sup>3</sup> do sôro em exame; 2) sôbre êste, com agulha calibre 18, deixar cair uma gôta de antígeno; 3) misturar em agitador mecânico (180 rotações por minuto) durante 5 minutos; 4) leitura microscópica, considerando positivas as reações em que há nítida formação de flocos.

A dificuldade em obter sôro para realizar as três reações (aglutinação, hemaglutinação e microfloculação) limitou nosso estudo a um grupo de 37 infantes e 12 recém-nascidos. Dêste último grupo, e mais 29 casos, conseguimos sangue ainda suficiente para a reação de microfloculação.

Por outro lado, em 17 crianças realizamos sangrias sucessivas no decorrer da infecção, o que nos permitiu verificar a época do aparecimento dos anticorpos e relacioná-la com os resultados da coprocultura, também repetida nas mesmas ocasiões.

Tomados englobadamente, os resultados da pesquisa de anticorpos com as três reações estão reproduzidos no quadro VIII.

QUADRO VIII

| Idade                      | Número de casos | Hemaglutinação |      | Aglutinação bacteriana |      | Microfloculação |      |
|----------------------------|-----------------|----------------|------|------------------------|------|-----------------|------|
|                            |                 | Pos.           | Neg. | Pos.                   | Neg. | Pos.            | Neg. |
| Recém-nascidos             | 12 (+)          | 0              | 12   | 0                      | 12   | 2               | 10   |
| Crianças com mais de 1 mês | 37              | 10             | 27   | 0                      | 37   | 18              | 19   |

(+) Além destes, 29 soros foram testados somente pela reação de microfloculação, com resultados negativos na sua totalidade.



A análise dos dados do quadro VIII nos levou à seguinte conclusão inicial: 1) a aglutinação bacteriana não se mostrou sensível; 2) existe nítida diferença entre os resultados da microfloculação e da hemaglutinação com relação aos grupos de crianças de menor e maior idade.

Quanto ao valor da hemaglutinação e da microfloculação, melhor será compreendido quando analisarmos seus resultados comparativamente caso por caso e de acôrdo com a ordem crescente de idade das crianças. Tais dados estão reproduzidos no quadro IX.

QUADRO IX

| N.º | Nome     | Data da colheita do soro | Idade   | Hemaglutinação | Microfloculação | Coprocultura   |
|-----|----------|--------------------------|---------|----------------|-----------------|--|
| 1   | C.A.A.   | 25- 7-56                 | 2 meses | —              | —               | negativa   |
| 2   | D.M.S.   | 28- 4-56                 | 2 meses | —              | —               | <i>E. coli</i> 0 111: B4   |
|     |          | 11- 5-56                 | 2 meses | —              | —               | negativa   |
| 3   | G.S.L.   | 7- 6-56                  | 2 meses | —              | —               | negativa   |
|     |          | 13- 6-56                 | 2 meses | —              | —               | negativa   |
| 4   | J.R.     | 7- 5-56                  | 2 meses | —              | —               | negativa   |
| 5   | J.G.F.   | 24- 8-55                 | 2 meses | —              | —               | <i>Sh. flexneri</i>  |
|     |          | 26- 8-55                 | 2 meses | —              | —               | negativa   |
| 6   | L.A.M.   | 26- 7-56                 | 2 meses | —              | —               | <i>Sh. dysenteriae</i> 2   |
| 7   | M.L.S.   | 5-12-55                  | 2 meses | —              | —               | negativa   |
| 8   | N.W. Jr. | 1- 8-56                  | 2 meses | —              | —               | negativa   |
| 9   | V.M.     | 10- 4-56                 | 2 meses | —              | —               | negativa   |
| 10  | W.M.F.   | 7- 6-56                  | 2 meses | —              | —               | negativa   |
| 11  | A.F.R.   | 3- 5-56                  | 3 meses | —              | —               | <i>E. coli</i> 0 111: B4<br>+ <i>Sh. flexneri</i> 6<br>+ <i>S. newport</i> |
|     |          | 24- 4-56                 | 3 meses | —              | —               | negativa   |
| 12  | C.M.O.   | 11- 7-56                 | 3 meses | —              | —               | <i>S. derby</i>  |
|     |          | 16- 7-56                 | 3 meses | —              | —               | <i>S. derby</i>  |
| 13  | F.A.O.   | 24- 7-56                 | 3 meses | —              | —               | <i>E. coli</i> 0 111: B4   |
| 14  | L.G.     | 12- 7-56                 | 3 meses | —              | +               | <i>E. coli</i> 0 86  |
| 15  | M.A.S.   | 25- 7-56                 | 3 meses | —              | —               | negativa   |
| 16  | N.P.A.   | 27- 1-56                 | 3 meses | —              | +               | negativa   |
| 17  | S.F.     | 12- 9-55                 | 3 meses | —              | —               | <i>Sh. sonnei</i>  |
|     |          | 26- 9-55                 | 3 meses | —              | —               | negativa   |
| 18  | W.S.     | 23- 2-56                 | 3 meses | —              | —               | negativa   |
|     |          | 17- 3-56                 | 3 meses | —              | +               | <i>E. coli</i> 0 111: B4   |
| 19  | A.B.S.   | 4- 7-56                  | 4 meses | —              | —               | negativa   |
|     |          | 10- 7-56                 | 4 meses | —              | —               | negativa   |
| 20  | A.R.S.   | 5- 7-56                  | 4 meses | —              | —               | <i>E. coli</i> 0 111: B4   |
|     |          | 10- 7-56                 | 4 meses | —              | +               | <i>E. coli</i> 0 111: B4   |
|     |          | 18- 7-56                 | 4 meses | —              | +               | negativa   |
| 21  | D.C.S.   | 20- 3-56                 | 4 meses | —              | —               | <i>E. coli</i> 0 111: B4   |
| 22  | J.P.     | 7- 6-56                  | 4 meses | —              | +               | <i>Sh. sonnei</i>  |
|     |          | 12- 6-56                 | 4 meses | —              | +               | negativa   |
| 23  | J.A.S.   | 17- 5-56                 | 4 meses | —              | —               | negativa   |
| 24  | P.V.D.   | 8-10-56                  | 5 meses | 1/40           | +               | negativa   |
| 25  | S.A.P.   | 19-10-55                 | 5 meses | 1/10           | +               | <i>E. coli</i> 0 111: B4   |
| 26  | L.R.C.   | 3- 2-56                  | 8 meses | —              | —               | <i>Sh. flexneri</i>  |
| 27  | O.T.     | 15- 5-56                 | 8 meses | 1/80           | +               | <i>Sh. flexneri</i>  |
|     |          | 18- 5-56                 | 8 meses | —              | +               | <i>Sh. flexneri</i>  |
|     |          | 28- 5-56                 | 8 meses | —              | +               | negativa   |

(Continua)

QUADRO IX — (Continuação)

| N.º | Nome   | Data da colheita do soro | Idade    | Hemaglutinação | Microfloculação | Coprocultura             |
|-----|--------|--------------------------|----------|----------------|-----------------|--------------------------|
| 28  | W.A.N. | 22- 6-56                 | 8 meses  | —              | —               | <i>S. derby</i>          |
|     |        | 26- 6-56                 | 8 meses  | —              | —               | negativa                 |
|     |        | 2- 7-56                  | 8 meses  | —              | —               | <i>E. coli</i> 0 111: B4 |
|     |        | 23- 7-56                 | 8 meses  | 1/10           | +               | negativa                 |
| 29  | C.A.L. | 4- 7-56                  | 10 meses | 1/20           | +               | <i>Sh. flexneri</i>      |
| 30  | M.A.F. | 25- 7-56                 | 12 meses | 1/40           | +               | negativa                 |
| 31  | Z.M.N. | 7-11-55                  | 12 meses | —              | +               | <i>Sh. flexneri</i>      |
| 32  | A.S.T. | 15- 5-56                 | 13 meses | —              | —               | negativa                 |
| 33  | M.M.P. | 3- 4-56                  | 15 meses | 1/40           | —               | <i>S. montevideo</i>     |
|     |        | 18- 4-56                 | 15 meses | —              | —               | <i>E. coli</i> 0 86      |
| 34  | C.G.M. | 23- 5-56                 | 18 meses | 1/40           | +               | negativa                 |
|     |        | 26- 5-56                 | 18 meses | 1/40           | +               | <i>E. coli</i> 0 111: B4 |
| 35  | D.M.S. | 21- 6-56                 | 19 meses | —              | —               | negativa                 |
|     |        | 26- 6-56                 | 19 meses | 1/80           | +               | negativa                 |
| 36  | O.M.G. | 13- 4-56                 | 2 anos   | —              | +               | <i>S. paratyphi</i> B    |
|     |        | 23- 4-56                 | 2 anos   | —              | —               | <i>S. paratyphi</i> B    |
| 37  | A.M.O. | 17- 4-56                 | 5 anos   | —              | +               | <i>Sh. sonnei</i>        |
|     |        | 2- 5-56                  | 5 anos   | 1/80           | +               | <i>Sh. sonnei</i>        |
|     |        | 18- 5-56                 | 5 anos   | —              | +               | <i>Sh. sonnei</i>        |

Ao analisar os dados do quadro IX, novamente chama atenção o fato de as reações positivas serem muito mais freqüentes acima dos três meses de idade. No grupo etário de 2 meses (dez casos), a pesquisa de anticorpos específicos no soro foi sempre negativa, apesar de uma dessas crianças (D.M.S.) apresentar o germe nas fezes. Dos três aos quatro meses, começa a aparecer maior número de resultados positivos, entretanto só na reação de microfloculação (casos 14, 16, 18, 20 e 22). Como *E. coli* 0 111 : B4 foi isolado das fezes nos casos 11, 13, 18, 20 e 21, só duas vezes houve concordância entre coprocultura e pesquisas de anticorpos, notando-se que as provas sorológicas só se mostraram positivas após a segunda sangria.

No grupo etário de 5 a 12 meses (7 casos), tanto hemaglutinação como microfloculação foram positivas em 6 crianças, sendo que em 2 delas (n.ºs 25 e 28) a coprocultura comprovou a presença de *E. coli* 0 111 : B4.

A reação de microfloculação se mostrou constante porque em tôdas as vezes que foi positiva, continuou a sê-lo nas sangrias subseqüentes, o que não aconteceu com a hemaglutinação (caso 27). Aqui também verificamos o mesmo fato anteriormente descrito, isto é, o das reações negativas nas primeiras sangrias que se mostram positivas com o decorrer do tempo (caso 28).

De 1 a 5 anos (5 casos), as duas reações concordaram em três casos e somente numa criança (n.º 34) o germe foi encontrado

nas fezes. Novamente as reações de microfloculação deram resultados mais constantes (ver caso 37).

Do total de 41 recém-nascidos estudados, em 16 o germe foi isolado das fezes. Neste grupo, a pesquisa de anticorpos específicos foi positiva duas vezes (microfloculação), justamente em crianças que apresentaram *E. coli* 0 111 : B4 nas fezes.

Acreditamos que a pesquisa de anticorpos sanguíneos correspondentes ao antígeno *coli* 0 111 : B4 poderia ser feita em melhores condições de sensibilidade e de reprodutibilidade com antígeno bacteriano lecitinado e colesterolizado, de acôrdo com a técnica que indicamos na presente investigação.

Utilizando sangue das crianças pertencentes ao segundo grupo de nossa investigação, praticamos reações de microfloculação, desta vez utilizando como antígenos todos os tipos de *E. coli* G. E. I. que possuíamos. Determinamos primeiramente as concentrações ótimas de antígeno e de lecitina para cada grupo e as testamos frente a soros aglutinantes obtidos em coelho e que correspondiam aos vários tipos de *E. coli* G. E. I., para verificar se existiam reações cruzadas. Constatamos que a prova funcionava muito bem, era aparentemente muito específica e praticamente não se produziam reações de grupo.

Das 90 crianças observadas, obtivemos sangue de 48 com que praticamos a reação de microfloculação utilizando vários antígenos *E. coli* G. E. I. No quadro X estão reproduzidos os resultados obtidos.

QUADRO X

|           | <i>E. coli</i><br>0 25 | <i>E. coli</i><br>0 26 | <i>E. coli</i><br>0 55 | <i>E. coli</i><br>0 86 | <i>E. coli</i><br>0 111 |
|-----------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| Positivos | 16                     | 12                     | 12                     | 19                     | 13                      |
| Negativos | 32                     | 36                     | 36                     | 29                     | 35                      |

Tomando em consideração somente os casos positivos para *E. coli* 0 111, verificamos que das 13 vezes em que a reação foi positiva, o germe foi encontrado nas fezes em 9 casos e desses somente 6 tinham anticorpos sanguíneos. As reações positivas para outros tipos de *E. coli* G. E. I. são difíceis de interpretar uma vez que esses germes praticamente não foram encontrados durante a nossa investigação. Diferença tão marcante entre soros aglutinantes artificiais e soros naturais deve estar ligada ao fato de aquêles apresentarem altos títulos aglutinantes, ao contrário do que se passa na infecção intestinal em que os anticorpos sanguíneos apa-

recem em títulos baixos. Diante desses resultados, nenhum dos métodos por nós utilizados se afigura de valia como rotina diagnóstica.

#### VERIFICAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE *E. coli* O 111 : B4 AOS ANTIBIÓTICOS

Vários são os métodos propostos para a verificação *in vitro* da sensibilidade de uma bactéria a determinado antibiótico ou quimioterápico. Baseiam-se todos na inibição do crescimento bacteriano em presença de determinada quantidade da substância bactericida ou bacteriostática.

Desde que se demonstrou existir certo paralelismo entre as provas de verificação da sensibilidade do germe e os resultados obtidos na clínica, o emprêgo daquelas vem sendo quase obrigatório, conquanto ainda não exista uniformidade de opiniões sôbre o tipo de teste a ser utilizado.

Dos métodos preconizados para a realização de tais provas, dois são os mais empregados: o das diluições sucessivas e o dos discos de papel de filtro. O primeiro, factível em condições técnicas melhor controláveis, deveria dar resultados mais exatos porquanto permite determinar exatamente as concentrações de antibiótico ou quimioterápico capazes de inibir o crescimento bacteriano, possibilitando ainda verificar o valor das associações medicamentosas. A grande desvantagem dêste método consiste na dificuldade de sua execução: cada antibiótico tem de ser usado separadamente em soluções-padrões que se alteram, o que obriga o pesquisador ao preparo constante de novos solutos padronizados. Ademais, requer grande bateria de tubos, tanto maior quanto mais numerosas forem as substâncias em prova. Para sua execução são necessárias várias pipetagens e abundante vidraria estéril, o que o torna quase inexequível quando se desejam testar vários antibióticos a um só tempo — mesmo nos laboratórios bem aparelhados.

Ao contrário, o método dos discos não apresenta qualquer desses inconvenientes: trabalha-se com discos de papel de filtro impregnados com quantidades determinadas de tais ou quais antibióticos, que aí se conservam perfeitamente por longos períodos, quando mantidos em geladeira. Permite, em uma única placa de Petri, testar oito antibióticos e o trabalho técnico se limita a colocar os discos impregnados sôbre a superfície do meio de cultura previamente semeado com a bactéria em prova. Deve-se ter presente que o tipo de ágar, a espessura do meio de cultivo e o volume do

*inoculum* podem alterar os resultados (DEBEER e col. 1945), particularmente quando se desejam leituras quantitativas exatas. Se, entretanto, nos contentarmos com informações qualitativas sem a preocupação de leituras quantitativas baseadas na medida das áreas de inibição, seus resultados são perfeitamente satisfatórios para uso clínico, mesmo que pequenas variações de técnica sejam feitas (ERICSSON e col. 1954). Convirá lembrar que a prova dos discos indica tão somente a atividade bacteriostática do antibiótico. Antes de optar por um dos métodos, fêz-se uma comparação entre êles usando como antibiótico de prova a tetraciclina.

As técnicas usadas foram as seguintes.

#### I — MÉTODO DAS DILUIÇÕES SUCESSIVAS

1) Solução-padrão de tetraciclina em água, contendo 400 mcg. por centímetro cúbico.

2) Série de 10 tubos com 0,5 cm<sup>3</sup> de caldo comum com exceção do primeiro.

3) Colocar 0,5 cm<sup>3</sup> da solução de tetraciclina nos 1.º e 2.º tubos; misturar bem e, a partir do 2.º tubo, passar 0,5 cm<sup>3</sup> para o 3.º e assim sucessivamente até o 9.º, desprezando o último 0,5 cm<sup>3</sup>.

4) Juntar a cada tubo 0,5 cm<sup>3</sup> de uma diluição a 1/1.000 da cultura do germe em caldo com 18 a 24 horas de incubação; agitar bem.

5) Incubar a 37º C de um dia para outro, considerando como concentração inibitória mínima a do último tubo que, examinado microscòpicamente, não mostrar turvação, servindo o tubo que não leva tetraciclina como testemunho do crescimento bacteriano.

#### II — MÉTODO DOS DISCOS

1) *Discos usados* — Discos antibióticos que nos foram fornecidos pelo Instituto Hormoquímico e Biológico S. A. e alguns de tetraciclina cedidos pelo Laboratório Lederle. Os de sulfadiazina foram por nós preparados. Continham as seguintes concentrações de antibióticos: clorotetraciclina, 60 mcg.; oxitetraciclina, 60 mcg.; cloranfenicol, 60 mcg.; estreptomina, 100 mcg.; neomicina, 60 mcg.; polimixina, 30 unidades; sulfadiazina, 2 mg.

2) *Meio de cultura* — Como sempre testamos a sulfadiazina na mesma placa, optamos pelo meio de cultura descrito por CHABBERT e col. (1953), isento de peptona para evitar a inativação daquele sulfonamídico. Como única modificação, substituímos o sangue hemolisado de cavalo pelo de coelho. As placas usadas mediam 8 cm e continham 15 cm<sup>3</sup> do meio. O ágar empregado nem sempre foi da mesma procedência.

3) *Inoculum* — Culturas de 24 horas em caldo comum.

4) *Execução das provas* — Depositam-se 3 gotas do caldo cultivado em pontos diferentes da placa, espalhando-as sobre toda a superfície do meio com um bastão em L. Depois de meia hora em temperatura ambiente, os discos são colocados sobre a superfície do meio, separados entre si por intervalo suficiente. Incubação em estufa a 37° C por 24 horas. Em nossas provas, usamos uma só concentração para cada antibiótico, uma vez que julgamos suficiente verificar se o germe seria ou não sensível.

5) *Interpretação dos resultados* — Consideramos o germe sensível a determinado antibiótico quando, em torno do disco correspondente, se forma halo bem nítido (sempre superior a 3 mm) sem o aparecimento de nenhuma colônia na zona de inibição; quando observada uma ou outra colônia dentro da área de inibição, procede-se à sua identificação para saber se se trata do germe em prova. Neste caso, mesmo o aparecimento de raras colônias na zona de inibição obriga a considerar o germe como resistente, porque tais colônias acusam a presença de mutantes com resistência ao antibiótico.

## COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS

QUADRO XI

| MÉTODO DAS DILUIÇÕES |                             | MÉTODOS DOS DISCOS |                      |                    |                      |
|----------------------|-----------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| Tetraciclina         |                             | Clorotetraciclina  |                      | Oxitetraciclina    |                      |
| Concentração no meio | Número de amostras inibidas | Amostras sensíveis | Amostras resistentes | Amostras sensíveis | Amostras resistentes |
| 100 mcg              | 54                          | 0                  | 54                   | 0                  | 54                   |
| 50 mcg               | 1                           | 0                  | 1                    | 0                  | 1                    |
| 25 mcg               | 2                           | 2                  | 0                    | 2                  | 0                    |
| 12,5 mcg             | 3                           | 3                  | 0                    | 3                  | 0                    |
| 6,25 mcg             | 1                           | 0                  | 1                    | 0                  | 1                    |
| 3,12 mcg             | 1                           | 1                  | 0                    | 1                  | 0                    |
| 1,56 mcg             | 6                           | 5                  | 1                    | 5                  | 1                    |
| 0,78 mcg             | 11                          | 11                 | 0                    | 11                 | 0                    |

Analisando o quadro XI verificamos que, de modo geral, os dois métodos são comparáveis. Notamos que as provas em tubo discordaram dos resultados dos discos por duas vêzes: nas concentrações de 6,25 mcg e de 1,56 mcg. Entretanto, nestes dois casos havia na zona de inibição da placa certo número de colônias bem isoladas que, uma vez "pescadas" e repetida a prova de sensibilidade por diluição, se mostraram resistentes até concentrações respectivamente de 50 mcg e 12,5 mcg, o que indica claramente que na população bacteriana havia mutantes resistentes não reveladas pelo método das diluições.

Outra causa de êrro que pode ser imputada ao método dos discos é a de indicar como sensíveis os germes inibidos pelas concentrações de 12,5 a 25 mcg, níveis terapêuticos muito altos para serem atingidos. Em nosso caso particular não é de maior interesse, porquanto as concentrações de droga no intestino atingem êsses níveis nos esquemas terapêuticos habituais. Apesar disso, resolvemos repetir as provas nessas amostras, desta vez usando três discos com concentrações de 10, 30 e 60 mcg (quadro XII). Para a amostra ser considerada sensível deve ser inibida pelas três concentrações do antibiótico; se só o fôr pela última, deverá ser rotulada como pouco sensível.

QUADRO XII

| Número de amostras | Concentração inibidora | Discos I.H.B. |        |        | Discos Lederle |        |        |
|--------------------|------------------------|---------------|--------|--------|----------------|--------|--------|
|                    |                        | 10 mcg        | 30 mcg | 60 mcg | 10 mcg         | 30 mcg | 60 mcg |
| 2                  | 25 mcg                 | Res.          | Res.   | Sens.  | Res.           | Res.   | Sens.  |
| 3                  | 12,5 mcg               | Res.          | Res.   | Sens.  | Res.           | Res.   | Sens.  |

Os resultados obtidos nos indicam que a prova do disco também para êsses casos nos daria resultados satisfatórios, uma vez que as cinco amostras inibidas nas concentrações de 12,5 e 25 mcg seriam rotuladas como pouco sensíveis.

Ao fazer estas comparações, tivemos por finalidade única controlar a prova dos discos. Sabemos que o contrôle não foi perfeito, uma vez que foi feito só para um antibiótico, mas serviu para demonstrar que os dois métodos são equivalentes.

Com a maioria das amostras de *E. coli* G. E. I. por nós isoladas, procedemos à verificação da sensibilidade a alguns antibióticos e quimioterápicos usando o método do disco, que nos deu informação qualitativa bastante satisfatória. Para estas provas só usamos amostras *E. coli* 0 111 : B4 porquanto os outros tipos de *E. coli* só foram encontrados raramente e quase sempre associados a outra bactéria patogênica. A técnica usada foi idêntica à anteriormente descrita e os resultados acham-se resumidos no quadro XIII.

QUADRO XIII

| ANTIBIÓTICO OU QUIMIOTERÁPICO | 70 amostras de recém-nascidos que apresentaram diarreia durante a permanência no hospital |             | 27 amostras de crianças internadas para tratamento (exame no ato da internação) |             |
|-------------------------------|---|-------------|---|-------------|
|                               | Sensíveis   | Resistentes | Sensíveis   | Resistentes |
| Cloranfenicol .....           | 29 (41,4%)  | 41 (58,6%)  | 25 (92,6%)  | 2 ( 7,4%)   |
| Oxitetraciclina .....         | 19 (27,1%)  | 51 (72,9%)  | 23 (85,1%)  | 4 (14,9%)   |
| Clorotetraciclina .....       | 19 (27,1%)  | 51 (72,9%)  | 24 (88,8%)  | 3 (11,2%)   |
| Estreptomicina .....          | 1 ( 1,4%)   | 69 (99,6%)  | 2 ( 7,4%)   | 25 (92,6%)  |
| Neomicina .....               | 69 (98,6%)  | 1 ( 1,4%)   | 27(100,0%)  | 0 ( 0,0%)   |
| Polimixina .....              | 70(100,0%)  | 0 ( 0,0%)   | 27(100,0%)  | 0 ( 0,0%)   |
| Sulfadiazina .....            | 2 ( 2,8%)   | 68 (97,2%)  | 0 ( 0,0%)   | 27(100,0%)  |

O grande número de amostras resistente aos derivados da tetraciclina e ao cloranfenicol assinalado no grupo em que a infecção estava ligada ao ambiente hospitalar (em nítido contraste com o outro grupo: infecção extra hospitalar) sugere que no hospital a bactéria adquire resistência a êsses antibióticos, tornando ainda mais complexo o problema da infecção hospitalar e indicando a necessidade de se realizarem tais determinações de forma sistemática com as substâncias antibióticas comumente empregues em determinado nosocômio.

Os resultados obtidos com a sulfadiazina possivelmente não exprimem a situação real, uma vez que as provas *in vitro* com sulfonamidas são prejudicadas por grande número de fatores que geram causas de êrro.



## DISSEMINAÇÃO DA INFECÇÃO

Não pode haver mais dúvidas de que alguns tipos sorológicos de *E. coli* possuem a capacidade de provocar enterites agudas, sendo a êste respeito semelhantes aos bacilos disentéricos e às salmonelas. As crianças, principalmente as de menos de 1 ano de idade, são muito susceptíveis e a infecção pode-se difundir por contato. No entanto, para que isso ocorra será necessário que exista uma fonte de infecção e já são bem conhecidos os focos de infecção hospitalar devidos à contaminação do ambiente ou às infecções por contato direto, seja por objetos contaminados seja pela enfermagem, fato comprovado por ROGERS (1951) e outros. No caso presente, tais fatores devem ter sido responsáveis pela infecção de grande número de crianças nascidas no hospital.

Também é de interêsse o problema das infecções extra-hospitalares, presentes em grande número dos casos por nós estudados. Tal fato já nos despertara a atenção, ao verificar a ocorrência, na clínica particular, de enterites graves em que o único germe isolado das fezes (em cultura pura) era precisamente certo tipo de *E. coli* G. E. I.

A propósito, KAUFFMANN (1954) é de opinião que o verdadeiro foco da infecção é extra-hospitalar e que certamente a infecção é trazida de fora para dentro do hospital. Também ORSKOV (1951) já assinalara certas ligações entre a enterite dos bezerras e a diarréia infantil. STEVENSON (1952) encontrou *E. coli* 0 111 em 14 adultos com diarréia e em 0,5% de adultos normais. OCKLITZ e col. (1955) fizeram a mesma verificação em adultos normais que trabalhavam na enfermaria de uma maternidade. Por outro lado, BRAY (1945) refere o achado, em môscas que tinham acesso à enfermarias, de germes idênticos aos isolados das crianças infetadas.

A suspeita de que o reservatório principal da infecção seja o próprio homem nos levou a examinar 1.027 amostras de fezes, pesquisando a eventual presença de *E. coli* G. E. I. Nosso material não foi selecionado mas colhido de doentes de ambulatório dos quais obtivemos informações nulas. A técnica que empregamos foi a de rotina dos serviços de coprocultura, isto é, sementeira em meio de ágar SS e de Holt-Harris Teague e, a seguir, isolamento, identificação e tipagem sorológica do germe pelos métodos descritos anteriormente.

Das 1.027 fezes examinadas, isolamos 2.865 amostras de *E. coli*, as quais sucessivamente foram tipadas frente a 4 diferentes anti-

-soros para *E. coli* G. E. I., a saber: *E. coli* 0 111, *E. coli* 055, *E. coli* 086, *E. coli* 026.

Os resultados estão reproduzidos no quadro seguinte.

#### QUADRO XIV

| N.º de exames | <i>E. coli</i><br>0 111: B4 | <i>E. coli</i><br>055 | <i>E. coli</i><br>086 | <i>E. coli</i><br>026 | Negativos |
|---------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------|
| 1.027         | 3                           | 5                     | 7                     | 15                    | 997       |

Dada a dificuldade em obtermos informações clínicas sobre a totalidade dos pacientes cujas fezes examinamos, limitamo-nos a referir os informes que conseguimos sobre os portadores de *E. coli* 0 111 - B4. Tratava-se de dois adultos e uma criança, todos do sexo feminino e que no momento do exame não apresentavam perturbações intestinais nem referiam contato recente com crianças portadoras de gastrenterite. Nos três casos o exame fôra solicitado para pesquisa de vermes e protozoários e, no caso da menina, para contrôlo do tratamento de parasitose intestinal.

#### ENTERITE EXPERIMENTAL

De modo geral, a maioria dos animais de laboratório é refratária a infecções experimentais por enterobactérias; estas, quando relatadas como bem sucedidas, são passíveis de crítica porque, quase sempre, as vias de infecção (endovenosa ou intraperitoneal) e as doses usadas deixam dúvidas sobre se as lesões ou a morte do animal foram conseqüência de infecção verdadeira ou de toxemia provocada pelo número elevado de germes injetados.

A nosso ver, a enterite infantil por *E. coli* G. E. I. tem alguns pontos de semelhança com o *cholera morbus*, seja nos sintomas clínicos que produz como nas lesões anatômicas encontradas. Em ambos se encontra inflamação difusa da mucosa intestinal com destruição do epitélio superficial, sem tendência para lesões mais profundas ou formação de ulcerações. Do ponto de vista clínico, é comum o aparecimento da clássica diarréia, semelhante à água de arroz, raramente apresentando sangue e flocos de muco; portanto, quadro nitidamente intestinal, provocado pela ação direta das toxinas bacterianas sobre a mucosa entérica ou por ação central de substâncias tóxicas absorvidas no intestino.

Partindo dessa hipótese, procuramos nos inteirar sôbre quais os animais mais facilmente infetados pelo cólera experimental e verificamos que o cobaio, de todos usados, foi o mais sensível. FRETER (1955 e 1956), trabalhando com cólera experimental de cobaios e camundongos, obteve número de "pegas" muito constante, empregando técnica bastante simples e que consistia em inibir a flora normal e a motilidade intestinais, objetivo facilmente conseguido mediante administração de antibióticos e de morfina.

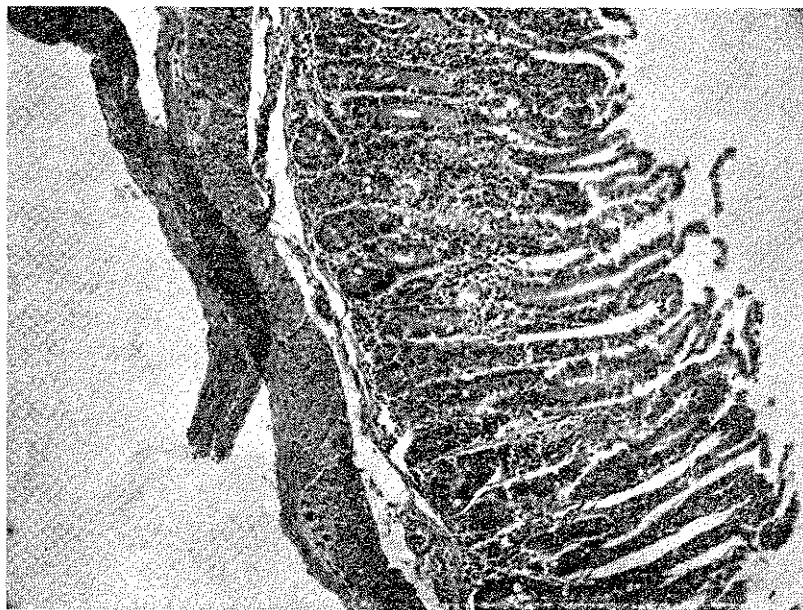
A técnica que seguimos, praticamente idêntica à de FRETER (1955), foi a seguinte: 1) os animais foram privados de alimentos (2 dias para camundongos e 3 dias para cobaios), dando-lhes água à vontade; 2) na manhã do dia da inoculação, os animais foram intubados com sonda de polietileno, introduzindo-se no estômago 1 mg de tetraciclina juntamente com solução de carbonato de cálcio a 2,5%, suspensas em 10 cm<sup>3</sup> para os cobaios e 2 cm<sup>3</sup> para os camundongos; 3) três horas depois, também por tubagem, administramos cultura de *E. coli* 0 111 : B4 em caldo, incubada a 37° C por 10 horas e diluída a 50% com solução salina estéril, à qual juntamos 250 mg de carbonato de sódio e 150 mg cm<sup>3</sup> de sulfato de estreptomícina (10 cm<sup>3</sup> para os cobaios e 3 cm<sup>3</sup> para os camundongos); 4) meia hora mais tarde, injetamos, por via intraperitoneal, sulfato de morfina (8 mg para os cobaios e 1 mg para os camundongos).

As cepas de *E. coli* 0 111 : B4 usadas foram isoladas de casos graves de enterite e, quando testadas *in vitro*, se mostraram resistentes a concentrações superiores às dos dois antibióticos usados para inibir a flora normal.

Iniciamos nossas experiências com 3 lotes de 5 camundongos, empregando para cada lote amostra diferente de *E. coli* 0 111 : B4. Após 48 horas, obtivemos morte de 4 dos 15 animais inoculados e a autopsia acusou, em todos, edema acentuado de todo o intestino delgado, que estava cheio de líquido mucoso de côr achocolatada, de onde recuperamos culturas mistas, com ligeira predominância de *E. coli* 0 111 : B4. Nos restantes animais, exames das fezes realizados nos dois dias seguintes não revelaram a presença de *E. coli* 0 111 : B4.

Como considerássemos maus os resultados experimentais obtidos ("pega" inconstante da infecção), repetimos as inoculações, desta vez usando como animal de experiência o cobaio. Utilizamos animais de pêso médio 250 a 300 g, de preferência machos, que

foram inoculados por sondagem com 3 amostras diferentes de *E. coli* 0 111 : B4, dois cobaios para cada germe. Independentemente do germe usado, todos os animais morreram em prazos que variaram de 2 a 4 dias, tendo sido sua alimentação reiniciada 48 horas após a inoculação. Todos apresentaram diarréia e a autópsia revelou congestão difusa de todo o intestino, principalmente do delgado, que se apresentava cheio de líquido de côr castanho-avermelhada. Verificamos também que três dos cobaios tiveram morte súbita: estavam aparentemente bem por ocasião da inspeção diária e uma hora depois foram encontrados mortos.



Infecção experimental no cobaio com *E. coli* 0 111 : BA: *enterite aguda difusa*.

Repetimos por duas vezes as mesmas experiências, usando a amostra *E. coli* 0 111 : B4 que na primeira prova se mostrara capaz de produzir morte mais rápida. Em 10 cobaios inoculados, obtivemos morte de 9 animais nos mesmos prazos e com os mesmos achados intestinais, somente sem aparecimento da disenteria, que foi constante na primeira experiência.

Tanto no primeiro como no segundo ensaio, a cultura do delgado comprovou a presença de *E. coli* 0 111, nunca em cultura pura, sendo que em 5 animais do segundo grupo predominaram francamente bacilos do grupo *Proteus*. Do único animal que so-

breviveu, não nos foi possível isolar das fezes *E. coli* 0 111 : B4, em cultivos repetidos durante 5 dias.

Exames histopatológicos do intestino delgado foram realizados em 6 animais do segundo grupo: em 4 o diagnóstico foi de enterite aguda difusa (ver microfotografia); nos dois restantes, apenas congestão da mucosa intestinal, anotando o anátomo-patologista descamação da camada epitelial como achado constante.

Tentamos também provocar infecção experimental em dois coelhos pelo mesmo método, porém sem submeter o animal ao jejum prévio: nenhum dos animais apresentou qualquer sintoma da infecção e o germe não pôde ser recuperado das fezes.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A elevada incidência de *E. coli* G. E. I. nos recém-nascidos e nas crianças de mais idade padecentes de enterites agudas demonstra a importância desse germe na patologia infantil tanto no ambiente hospitalar como fora dele. É necessário assinalar que a presença de tais enterobactérias nas fezes de crianças nem sempre está associada com a moléstia: assim PAYNE e col. (1950) descreveram epidemias em que pequeno número de crianças foi afetado, a despeito de ser grande o número de portadores assintomáticos. Tal fato não invalida a evidência da patogenicidade de *E. coli* G. E. I., sendo fenômeno conhecido o achado de enterobactérias patogênicas em portadores sãos. TAUNAY e col. (1956) referem haver encontrado *E. coli* 0 111 : B4 em recém-nascidos normais que alguns dias mais tarde apresentaram diarreia.

A incidência maior da infecção se dá nos primeiros meses de vida, adquirindo a criança maior resistência com o tempo. Segundo NETER (1955), tal fenômeno deve estar ligado à presença dos anticorpos sanguíneos, que aparecem em porcentagem alta nas crianças de mais idade e nos adultos (fato que por nós não pôde ser confirmado) a indicar contacto com o germe no decurso do tempo.

Nos casos agudos, a quantidade dos germes eliminados pelas fezes torna seu achado muito fácil, principalmente quando se empregam meios de cultura sem substâncias bacteriostáticas para *E. coli*, como o de Holt-Harris-Teague. O sucesso no exame depende do número de colônias que se isolam, o que naturalmente acarreta trabalho subsequente maior. Todavia, desde que sejam empregados os métodos indicados na presente pesquisa, tal incon-

veniente desaparece porque a simples aglutinação em lâmina a partir dos tubos de tríplice açúcar modificado permite separar rapidamente tôdas as culturas de *E. coli* G. E. I. por processos perfeitamente compatíveis com a rotina de um laboratório medianamente equipado.

Sendo a infecção por *E. coli* G. E. I. moléstia que muitas vêzes assume grave caráter epidêmico, tôdo esforço para sua elucidação deve ser empreendido, ainda mais em nosso meio onde as enterites representam a maior causa de óbitos na primeira infância.

Apesar de não ter sido nossa finalidade a de estudar a moléstia nos seus aspectos clínicos e terapêuticos, sabemos que em relação ao valor terapêutico dêste ou daquele antibiótico ou quimioterápico são divergentes as opiniões, tendo sido esta a razão por que realizamos sistemáticamente provas de sensibilidade *in vitro* as quais, dentro de certos limites, espelham o que se passa no vivo.

Nossos dados indicam que o uso sistemático do cloranfenicol, da oxitetraciclina e da clorotetraciclina determinou o aparecimento de grande número de raças resistentes de *E. coli* G. E. I. no ambiente hospitalar, onde a infecção ocorreu sob forma endêmica e, algumas vêzes, epidêmica. Tal fato, revelado pelas provas de sensibilidade *in vitro*, foi comprovado também pelas coproculturas de crianças em tratamento, em quem não notamos diminuição dos germes nas fezes, como é a regra nos casos de bactérias sensíveis.

Fora do ambiente hospitalar a situação era diversa porquanto a maioria dos germes isolados mostrou-se sensível aos antibióticos comumente empregados. Assim sendo, parece-nos de menor valia prescrever normas para o emprêgo dêste ou daquele antibiótico: importante é saber qual a situação local com relação aos antibióticos usados rotineiramente, estabelecendo métodos de contrôle para constatar diferenças na sensibilidade aos preparados mais comumente utilizados, o que pode ser realizado com facilidade pelo método dos discos de papel impregnados com antibióticos, êstes de preferência em concentração média.

A se comprovarem as presentes verificações, talvez seja preferível adotar o critério de alguns pediatras que concedem maior importância aos cuidados gerais que ao emprêgo dos antibióticos, argumentando que muitas vêzes êstes provocam alterações tais na flora intestinal que sua administração só deve ser realizada com o máximo de critério.

Com relação às sulfonamidas, já assinalamos as restrições que devem ser feitas às provas *in vitro*. Não temos elementos nem

cabe no presente trabalho ajuizar do seu valor terapêutico, mas não podemos deixar de assinalar que ainda recentemente extensa investigação feita na Inglaterra pelo "Medical Research Council" concluiu sôbre a superioridade da sulfadiazina em confronto às outras substâncias bacteriostáticas ou bactericidas.

A infecção por *coli* G. E. I. tem sido considerada moléstia tipicamente hospitalar, cuja disseminação se faz comprovadamente por contato, contaminação de ambiente ou dos alimentos, pela enfermagem e pelos objetos de uso das crianças.

Entre nós, a enterite por *E. coli* G. E. I. existe em forma endêmica no hospital mas fora dêle sua freqüência também é muito elevada nas crianças de tenra idade, contribuindo o referido germe com maior porcentagem de casos de diarréia que as outras enterobactérias patogênicas.

A transmissão deve processar-se por forma semelhante à da disenteria bacilar, na qual as condições precárias de higiene favorecem extraordinariamente a disseminação seja por contato direto de indivíduo a indivíduo seja por contaminação de objetos ou alimentos. Tivemos oportunidade de constatar ser elevado o número dos portadores de *E. coli* G. E. I. (quadro XIV) em nosso meio.

Via de regra, as tentativas de reprodução experimental da infecção em animais têm dado resultados quase sempre negativos. O método por nós utilizado propiciou resultados muito satisfatórios e pôde ser reproduzido repetidas vêzes sempre que o animal de experiência foi o cobaio; as lesões que pudemos constatar, principalmente no intestino delgado, são características de enterite aguda e na quase totalidade das vêzes foram mortais. Nessas experiências, a necessidade de inibir a flora normal do intestino para que o processo se instale mostra que no animal o *coli* 0 111 : B4 só é patogênico quando livre da concorrência de outras bactérias. Esse fato vem em abono do critério terapêutico de não alterar abruptamente a flora intestinal, principalmente quando exista a possibilidade de nos encontrarmos frente a germes que se tornaram resistentes aos antibióticos e sulfonamídicos.

#### RESUMO

Os AA. realizaram uma série de investigações laboratoriais sôbre a enterite infantil por *Escherichia coli* G. E. I.

O material proveio de três grupos de crianças: 1.º) 40 crianças de idade variável entre 1 mês e 5 anos, que serviram para

comparar métodos de colheita e cultura, tôdas portadoras de enterites agudas, sendo a colheita das fezes feita no momento da hospitalização; 2.º) 90 crianças de idade variável entre 30 dias e 2 anos com distúrbio nutritivo agudo; 3.º) 159 prematuros ou recém-nascidos com menos de 30 dias, dos quais 138 com gastrenterite aguda e 21 normais, todos da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas, da Universidade de São Paulo.

Usando fezes colhidas pelo "swab" retal (74 coproculturas), verificaram que os resultados foram equivalentes aos obtidos pela sementeira das fezes passadas naturalmente (74 coproculturas). O emprêgo de meios de enriquecimento (Gerbeaux, 1955), não aumentou o número de culturas positivas. Melhores resultados foram alcançados com o emprêgo combinado dos meios SS e de Holt-Harris-Teague, mesmo superiores aos do ágar-sangue.

A identificação de *E. coli* G. E. I. baseou-se nos caracteres morfológicos e antigênicos (aglutinação em lâmina, seguida por aglutinação lenta em tubo até o título do sôro).

A incidência da enterite por *E. coli* G. E. I. foi elevada, principalmente nos recém-nascidos portadores de gastrenterite:

|   | 1.º Grupo | 2.º Grupo | 3.º Grupo |        |
|---|-----------|-----------|-----------|--------|
|   |           |           | enterite  | normal |
| <i>E. coli</i> 0 111 .....                      | 7         | 15        | 71        | 2      |
| <i>E. coli</i> 0 55 .....                       | 0         | 2         | 0         | 0      |
| <i>E. coli</i> 0 86 .....                       | 2         | 0         | 0         | 0      |
| <i>E. coli</i> 0 111 + <i>E. coli</i> 0 86 .... | 0         | 1         | 0         | 0      |
| <i>E. coli</i> 0 111 + <i>Shigella</i> sp. .... | 0         | 3         | 0         | 0      |
| <i>E. coli</i> 0 55 + <i>Salmonella</i> sp. ..  | 0         | 1         | 0         | 0      |
| <i>E. coli</i> 0 111 + <i>Salmonella</i> sp. .  | 1         | 0         | 0         | 0      |
| <i>Shigella</i> sp. ....                        | 10        | 7         | 0         | 0      |
| <i>Salmonella</i> sp. ....                      | 5         | 4         | 0         | 0      |
| <i>Shigella</i> sp. + <i>Salmonella</i> sp. ..  | 1         | 0         | 0         | 0      |
| Negativos                                       | 14        | 57        | 67        | 19     |

A mortalidade no grupo dos recém-nascidos também foi bastante elevada: dos 71 com exame positivo para *E. coli* 0 111, 35 faleceram.



Compararam técnicas de aglutinação, hemaglutinação e microfloculação para pesquisa de anticorpos em alguns soros de crianças portadoras de gastroenterites; entretanto, os resultados obtidos não foram favoráveis para qualquer dos métodos empregues.

De tôdas as amostras de *E. coli* 0 111 : B4 isoladas, foram feitas provas de sensibilidade *in vitro* (método dos discos), para os seguintes antibióticos: cloranfenicol, oxitetraciclina, estreptomina, neomicina, polimixina e sulfadiazina. Concluíram que os antibiogramas correspondentes às tetraciclina e ao cloranfenicol eram equivalentes quando a bactéria isolada não provinha do hospital (1.º e 2.º grupos de crianças). Os germes isolados no hospital, evidenciaram aumento da resistência para as tetraciclina e o cloranfenicol. Acreditam não ser de maior valia prescrever normas para o emprêgo dêste ou daquele antibiótico: importante é saber qual a situação local com relação aos antibióticos usados rotineiramente.

Usando técnica semelhante à inicial, verificaram ser elevado o número de portadores normais de *E. coli* G. E. I. Examinaram 1.027 amostras de fezes; isolaram *E. coli* G. E. I. em 30. Finalmente, tentaram a infecção experimental no cobaio por introdução de bactérias diretamente no estômago. Em 16 animais infetados, obtiveram resultados positivos em 15 com quadro clínico e histopatológico de enterite aguda difusa e recuperação do germe nas fezes.

#### SUMMARY

Laboratory investigations of *Escherichia coli* (enteropathogenic coli) associated with enteric infection of children are reported. Specimens of feces were collected from the following groups of children: group I composed of 40 infants aged 1 month to 5 years whose material was collected on admission. The components of this group were admitted with acute enteritis and the material was examined by technics of isolation in order to compare these technics; group II was composed of 90 infants aged 30 days to 2 years with symptoms of severe enteric disturbances; group III was composed of 159 premature or newborn infants, all hospital delivered, with less than 30 days old. 138 of them had symptoms of an acute gastroenteritis and 21 were normal.

Cultures on 74 specimens of feces collected by rectal swab from group I gave similar results to those obtained on 74 specimens of feces collected by spontaneous defecation on the same group.

The investigators discovered that the use of enriched media (Gerbeaux, 1955) did not increase the number of positive cultures. Superior results were obtained by the combined use of SS and Holt-Harris-Teague media.

The identification of the *E. coli* was based on morphology and fermentation reactions. Antigenic analysis was performed by slide agglutination followed by slow tube agglutination.

The frequency of enteritis by *E. coli* (enteropathogenic *coli*) was high in all groups but higher in the newborn group (group III).

|   | Group I | Group II | Group III |        |
|---|---------|----------|-----------|--------|
|   |         |          | enteritis | normal |
| <i>E. coli</i> 0 111 .....                      | 7       | 15       | 71        | 2      |
| <i>E. coli</i> 0 55 .....                       | 0       | 2        | 0         | 0      |
| <i>E. coli</i> 0 86 .....                       | 2       | 0        | 0         | 0      |
| <i>E. coli</i> 0 111 + <i>E. coli</i> 0 86 .... | 0       | 1        | 0         | 0      |
| <i>E. coli</i> 0 111 + <i>Shigella</i> sp. .... | 0       | 3        | 0         | 0      |
| <i>E. coli</i> 0 55 + <i>Salmonella</i> sp. ..  | 0       | 1        | 0         | 0      |
| <i>E. coli</i> 0 111 + <i>Salmonella</i> sp. .  | 1       | 0        | 0         | 0      |
| <i>Shigella</i> sp. ....                        | 10      | 7        | 0         | 0      |
| <i>Salmonella</i> sp. ....                      | 5       | 4        | 0         | 0      |
| <i>Shigella</i> sp. + <i>Salmonella</i> sp. ..  | 1       | 0        | 0         | 0      |
| Negatives                                       | 14      | 57       | 67        | 19     |

The technics of agglutination, haemagglutination and micro-flocculation were compared for the detection of serum antibodies. The authors favor the last technic although none of the results was satisfactory.

From all isolated strains *E. coli* 0 111 B4 tests of sensivity *in vitro* (disk method) for the following drugs were performed: neomycin, polymyxin, sulphadiazine, chloramphenicol, oxytetracycline, chlortetracycline and streptomycin.

The authors came to the conclusion that antibiograms made with germs isolated from the first and second group were similar. In the third group it is noticed an increased resistance to tetra-

cycline and chloramphenicol. They emphasize the importance of to be acquainted with the local situation regarding the individual resistance of the patient against the commonest antibiotics used.

Using a similar technic, the authors made a search for normal carriers of enteropathogenic *coli* and isolated from 1027 samples 30 pathogenics.

Finally, they tried experimental infection on the guinea pig by introducing the germs directly into the stomach. In 16 infected animals, there were positive results in 15 cases with clinic and histopathologic picture of severe and diffuse enteritis and recovery of the germ from the feces.

### BIBLIOGRAFIA

ADAMSON, C. A., S. LOPGREN, C. MALMNAS — 1951 — Antibodies in mothers and newborn infants. *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, 3: 52-57.

ASSIS, A. — 1935 — Shigeloses crônicas. *Arch. bras. Med.*, 25: 133-149.

ASSIS, A. — 1948 — Shigella guanabara, tipo sorológico destacado do grupo B. ceylonensis-dispar. *O Hospital*, Rio de Janeiro, 33: 505-518.

BRAY, J. — 1945 — Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli neapolitanum* from diarrhoea of infants. *J. Path. Bact.*, 57: 239-247.

CHABBERT, Y., F. BOYER, & M. DECHAVASSINE — 1953 — Détermination de la sensibilité microbienne aux sulfamides par un méthode de disques séchés. *Ann. Inst. Pasteur*, 85: 56-63.

CHARTER R. E. & J. TAYLOR — 1952 — Cultural and serological reactions of strains of *Bact. coli* isolated from babies. *J. Path. Bact.*, 64: 729-734.

CRAIGE, J. — 1931 — Studies on the serological reactions of the flagella of *B. typhosus*. *J. Immunol.*, 21: 417-511.

DE BEER, E. J. & M. B. SHERWOOD — 1945 — The paper-disc agar plate method for the assay of antibiotic substances. *J. Bact.*, 50: 459-467.

ERICSSON, H., C. HOGMAN & K. WICKMAN — 1954 — A paper disk method for determination of bacterial sensitivity to chemotherapeutic and antibiotic agents. *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, 6 (supl. 11): 23-36.

EWING W. H., K. E. TANNES & H. W. TATUM — 1955 — A new serotype of *Escherichia coli* associated with infantile diarrhea. *Publ. Hlth. Rep.*, 70: 107-114.

FERGUSON, W. W. & B. C. JUNE — 1952 — Experiments on feeding adult volunteers with *Escherichia coli* 0111 B4, a coliform organism associated with infant diarrhea. *Amer. J. Hyg.*, 55: 155-169.

FRETER, R. — 1955 — The fatal enteric cholera infection in the guinea pig, achieved by inhibition of normal enteric flora. *J. Inf. Dis.*, 97: 57-65.

FRETER, R. — 1956 — Experimental enteric Shigella and Vibrio infections in mice and guinea pigs. *J. Exp. Med.*, 104: 411-418.

GERBEAUX, C. — 1955 — Milieu d'enrichissement et technique d'isolement des *E. coli* des gastro-entérites infantiles. *Ann. Inst. Pasteur*, 88: 790-793.

GILES C. & G. SANGSTER — 1948 — An outbreak of infantile gastro-enteritis in Aberdeen. *J. Hyg.*, 46: 1-9.

HARDY, A. V. & M. M. GALTON — 1955 — The role of food processing plants in the dissemination of *Salmonella*. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 4: 725-730.

HARDY, A. V. & J. WATT — 1944 — Newer procedures in laboratory diagnosis and therapy in the control of bacillary dysentery. *Amer. J. Pub. Health*, 34: 503-509.

HORMAECHE, E., C. A. PELUFFO & P. L. ALEPPO — 1936 — Nueva contibución al estudio etiológico de las "diarreas infantiles de verano". *Arch. urug. Med.*, 9: 113-162.

HUNTER, C. A. & B. COLBERT — 1956 — Flocculation tests for Brucellosis. *J. Immunol.* 77: 232-241.

KAUFFMANN, F. — 1954 — Enterobacteriaceae. Ejnar Munksgaard Publisher, Copenhagen.

KOYA, G., N. KOSAKAI, M. KONO, M. MORI & Y. FUKASAWA — 1954 — Observations on the multiplication of *Escherichia coli* 0-111 B4 in the intestinal tract of adult volunteers in feeding experiments. The intubation study with Miller-Abbott's double lumen tube. *Jap. J. med. Sci. Biol.*, 7: 197-204.

MAROJA, R. C. & W. D. LOWERY — 1956 — Eficácia relativa da coprocultura comparada ao swab-retal no isolamento de *Shigellas*. *Rev. Serv. Saúde públ.*, Rio de Janeiro, 8: 577-583.

MEDICAL RESEARCH COUNCIL — 1953 — Antibiotic and chemotherapeutic agents in the treatment of infantile diarrhoea and vomiting. *Lancet*, 2: 1163-1169.

NETER, E., L. F. BERTRAM, D. A. ZAK, M. R. MURDOCK & C. E. ARBESMAN — 1952 — Studies on hemagglutination and hemolysis by *Escherichia coli* antisera. *J. exp. Med.*, 96: 1-15.

NETER, E., N. J. ZALEWSKI & W. W. FERGUNSON — 1953 — *Escherichia coli* hemagglutinin response of adults volunteers to ingested *E. coli* 0 55 B5. *Proc. Soc. exp. Biol.*, N. Y., 82: 215-219.

NETER, E., O. WESTPHAL, O. LUDERITZ, M. R. GINO & A. E. GORZYNSKI — 1955 — Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. *Pediatrics*, 16: 801-808.

NOVAES, J. R. C., A. E. TAUNAY & S. S. ALMEIDA — 1949 — Tipagem de Salmonelas no Laboratório de Saúde Pública. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 9: 115-122.

OCKLITZ, H. W. & E. F. SCHMIDT — 1955 — Über das Vorkommen von Dyspepsie-Coli bei Erwachsenen. *Helvet. paediat. acta*, 10: 450-461.

ORSKOV, F. — 1951 — On the occurrence of *E. coli* belonging to O-group 26 in case of infantile diarrhoea and white scours. *Acta path. microbiol. scand.*, 29: 373-378.

PAYNE, A. M. M. & G. T. COOK — 1950 — A specific serological type of *Bact. coli* found in infants' home in absence of epidemic diarrhoea. *Brit. med. J.*, 2: 192-195.

RUGAI, E. — Informação pessoal.

STEVENSON, S. S. — 1952 — Further observation on the occurrence of *Bact. coli* D. 433 in adult faeces. *Brit. med. J.*, 2: 123-124.

TAUNAY, A. E. — 1951 — Bacteriologia das Shigeloses. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 11: 49-102.

TAUNAY, A. E., J. F. PONTES, E. PRADO & E. S. PEIXOTO — 1956 — Shigeloses. Comparação de método de colheita das fezes no diagnóstico bacteriológico das enterocolites crônicas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 16: 37-61.

TAUNAY, A. E., J. C. SOARES BICUDO, A. CORRÊA & E. S. PEIXOTO — 1956 — Estudo bacteriológico da diarreia do recém-nascido. *O Hospital*, Rio de Janeiro, 49: 625-634.

TAYLOR, J., B. W. POWELL & J. WRIGHT — 1949 — Infantile diarrhoea and vomiting. A clinical and bacteriological investigation. *Brit. med. J.*, 2: 117-125.

THOMAS, M. E. M. — 1954 — Disadvantages of the rectal swab in diagnosis of diarrhoea. *Brit. med. J.*, 2: 394-396.

