

## FREQÜÊNCIA DE ENTEROBACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM PROCESSOS DIARRÉICOS INFANTIS NA CIDADE DO RECIFE, PERNAMBUCO, BRASIL

NILMA CINTRA LEAL\*, TANIA IVO ROBALINHO CAVALCANTI\*, MARIA JESUITA BEZERRA DA SILVA\*\*, ELIANE MOURA FALAVINA DOS REIS\*\*\*, CLAUDE ANDRÉ SOLARI\*\*\* & ERNESTO HOFER\*\*\*

\* Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Departamento de Microbiologia, Caixa Postal 7472, 50730 Recife, PE, Brasil \*\* Fundação de Saúde Amaury de Medeiros, Secretaria de Saúde, Rua Fernandes Vieira s/nº, Recife, PE \*\*\* Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Bacteriologia, Caixa Postal 926, 20001 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

**Frequency of enteropathogenic bacteria in children diarrhea cases from the city of Recife, Pernambuco, Brazil** – 326 samples of diarrheal feces obtained from children whose ages ranged from zero to 5 years, admitted in two rehydration hospitals in the city of Recife, Pernambuco, were analyzed. Feces were placed in Cary-Blair medium (4 °C) for shipment to the laboratory. There was no difference in the rate of bacteria isolation if the samples were analyzed within the period from 3 to 7 days of collection. 19.02% of the analyzed samples were positives for at least one of the searched bacteria, 26 *Salmonella* belonging to 3 species, 21 classic enteropathogenic *E. coli*, 1 invasive *E. coli*, 10 *Shigella* belonging to 3 serotypes and 1 *Yersinia enterocolitica* were found.

Key words: enteropathogenic bacteria – children diarrhea – Recife, Brazil

A causa primordial responsável pelos elevados índices de morbidade e mortalidade em crianças de 0-5 anos, nos países em desenvolvimento, cabe aos processos diarréicos (Organização Panamericana da Saúde, 1983).

No nordeste do Brasil, as investigações desenvolvidas procurando analisar a participação de enterobactérias patogênicas em processos diarréicos nas várias faixas etárias da população ainda são muito escassas, considerando a importância do problema (Guerrant et al., 1983; Leal et al., 1987; Magalhães et al., 1971, 1981; Maroja et al., 1959 a, b, c; McLean et al., 1981; Ramos et al., 1963; Rouquayrol, 1962; Souza et al., 1975).

Diante desse panorama tentou-se verificar o papel desempenhado por *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia coli* enteropatogênica e invasora, como causa de diarréia em crianças de 0-5 anos, residentes em Recife, Pernambuco.

### MATERIAL E MÉTODOS

No período de junho a outubro de 1982, foram analisadas 326 fezes diarréicas de crianças

até 5 anos de idade, pertencentes a um segmento sócio-econômico mais carente e internadas em dois hospitais de reidratação do Recife, Pernambuco.

As fezes foram recebidas no laboratório até 2 horas após a emissão e para facilitar o fluxo de trabalho foram conservadas em meio de transporte de Cary & Blair (1964), Difco a 4 °C. As fezes recolhidas durante a semana foram semeadas na 2a. feira seguinte, permanecendo no meio entre 3 a 7 dias.

O material retirado dos meios de transporte foi homogeneizado em salina glicerinada tamponada, permanecendo durante 6 horas a temperatura ambiente, para estabilização do pH antes das sementeiras em agar eosina azul de metileno (EMB, Difco), agar *Salmonella-Shigella* (SS, Difco) e caldo tetracionato de Kauffmann (Merck). Todos os meios foram incubados a 37 °C por 24 horas, sendo o crescimento do caldo tetracionato plaqueado em agar Hektoen enteric (HE, Difco) e incubado a 37 °C por 24 horas.

Em geral, dez colônias lac<sup>+</sup> crescidas em agar EMB, foram transplantadas para meio “triple sugar iron” (TSI, Difco), como etapa de isolamento de *E. coli* e cinco colônias lac<sup>-</sup> de cada um dos meios seletivos indicadores, foram re-

Trabalho financiado em parte pelo CNPq.

Recebido em 21 de abril de 1988.

Aceito em 25 de julho de 1988.

TABELA I

Freqüência de bactérias enteropatogênicas (*Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* enteropatogênica clássica e invasora) em fezes mantidas no meio de transporte – Cary & Blair, em diferentes tempos de acondicionamento

Entero- bactérias	Dias de acondi- cionamento					
	3 N = 43	4 N = 66	5 N = 68	6 N = 68	7 N = 81	T N = 326
EPEC	4 (9,3%)	6 (9,09%)	3 (4,41%)	4 (5,88%)	4 (4,94%)	21 (6,44%)
EIEC	—	—	—	—	1 (1,23%)	1 (0,31%)
<i>Salmonella</i>	5 (11,63%)	5 (7,58%)	7 (10,29%)	6 (8,82%)	6 (7,41%)	29 (8,89%)
<i>Shigella</i>	—	4 (6,06%)	1 (1,47%)	3 (4,41%)	3 (3,70%)	11 (3,37%)
Total de positivos	9 (20,93%)	15 (22,73%)	11 (16,18%)	13 (19,12%)	14 (17,28%)	62 (19,02%)

EPEC – *E. coli* enteropatogênica clássica.

EIEC – *E. coli* enteroinvasiva.

picadas para TSI e agar lisina ferro (LIA, Difco), visando o isolamento e caracterização presuntiva de *Salmonella* e *Shigella*.

As amostras bioquimicamente compatíveis de *E. coli*, *Salmonella* e *Shigella* foram analisadas sob o aspecto sorológico, recorrendo-se à técnica de aglutinação rápida em presença de anti-soros somáticos, de envoltórios e flagelares (IOC-FIOCRUZ), de acordo com as orientações de Kauffmann (1954), Edwards & Ewing (1972) e Costa & Hofer (1972).

Nas cepas de *Shigella* identificadas bioquímica e sorologicamente, foi verificada a ação invasiva *in vivo* para conjuntiva ocular de cobaia (Serény, 1955).

Os resultados foram analisados pelo teste do qui-quadrado, tabela de contingência 2 x 2 onde a hipótese nula foi calculada em  $p = 0,1$  (Vieira, 1983).

## RESULTADOS

A Tabela I mostra a freqüência de isolamento de enterobactérias em relação ao tempo de manutenção das fezes no meio de transporte e na Tabela II estão relacionadas as espécies bacterianas encontradas.

Foram isoladas 26 cepas de *Salmonella* pertencentes a 3 sorotipos, além de 3 outras em que não foi possível identificar o sorotipo. As *E. coli* enteropatogênicas isoladas se distribuíram em 6 sorogrupos, sendo que das 21

cepas, 13 pertenciam ao grupo 0111; 4 ao sorogrupos 055 e 1 a cada dos grupos 0119, 026, 018 ac e 0128. Houve apenas 1 *E. coli* invasora, caracterizada no sorogrupos 0112 ac K66. Das três espécies de *Shigella* isoladas, *S. flexneri* esteve presente 8 vezes em 326 exames (2,45%) enquanto *S. boydii* e *S. dysenteriae* foram detectadas apenas uma vez. Os animais inoculados com as amostras de *Shigella* desenvolveram o quadro de ceratoconjuntivite. Durante o desenvolvimento do trabalho ocorreu o isolamento de uma cepa de *Y. enterocolitica*.

TABELA II

Distribuição das enterobactérias patogênicas (espécies, sorogrupos e sorotipos) em 326 amostras de fezes de crianças diarreicas, Recife, Pernambuco

Enterobactérias	Nº	%
<i>Sal. typhimurium</i>	23	7,05
<i>Sal. livingstone</i>	2	0,61
<i>Sal. lomita</i>	1	0,30
<i>Salmonella</i> sp. (SG II)	1	0,30
<i>Salmonella</i> sp. (rugosa)	2	0,61
<i>E. coli</i> 0111K58	13	3,98
<i>E. coli</i> 055K59	4	1,22
<i>E. coli</i> 0119K69	1	0,30
<i>E. coli</i> 026K60	1	0,30
<i>E. coli</i> 018ac K77	1	0,30
<i>E. coli</i> 0128K67	1	0,30
<i>E. coli</i> 0112ac K66	1	0,30
<i>Sh. dysenteriae</i>	1	0,30
<i>Sh. flexneri</i>	8	2,45
<i>Sh. boydii</i>	1	0,30
<i>Y. enterocolitica</i>	1	0,30
Total	62	19,02

TABELA III

Freqüência de isolamentos de enterobactérias patogênicas em fezes diarréicas, obtidas de crianças hospitalizadas em Recife, Pernambuco (1982)

Faixa etária	Faixa etária						Total N = 326
	0 -  3 m N = 104	3 -  6 m N = 79	6 -  12 m N = 53	1 -  3 a N = 33	3 -  5 a N = 9	s/informação N = 49	
Enterobactérias							
EPEC	7 (6,73%)	6 (7,59%)	3 (5,66%)	1 (3,03%)	—	4 (8,16%)	21 (6,44%)
EIEC	1 (0,96%)	—	—	—	—	—	1 (0,31%)
<i>Salmonella</i>	8 (7,69%)	8 (10,13%)	5 (9,43%)	5 (15,15%)	1 (11,11%)	2 (4,08%)	29 (8,90%)
<i>Shigella</i>	2 (1,92%)	6 (7,59%)	1 (1,89%)	1 (3,03%)	1 (11,11%)	—	11 (3,37%)
Total de positivos	18 (17,31%)	20 (25,32%)	9 (16,98%)	7 (21,21%)	2 (22,22%)	6 (12,5%)	62 (19,02%)

Salienta-se que em oito ocasiões foram encontradas as seguintes associações: *E. coli* 0111K58 + *Salmonella typhimurium* em 4 casos, *E. coli* + 055K59 *Salmonella typhimurium* em 1 caso, *E. coli* 018acK77 + *Salmonella typhimurium* em 1 caso, *E. coli* 026K60 + *Shigella flexneri* em 1 caso e *E. coli* 055K59 + *Salmonella* sp. em 1 caso.

A distribuição dos isolamentos de *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC) e invasora (EIEC), *Salmonella* e *Shigella* em relação à idade está apresentada na Tabela III.

#### DISCUSSÃO

A detecção dos agentes bacterianos causadores de diarréia é muito variável, considerando a influência de certos fatores envolvidos no processo. Assim, exemplificam-se as interferências provocadas pela época de colheita em relação ao estágio da doença, do acondicionamento do material até a realização do exame, da metodologia adotada e da capacitação de técnicos experientes.

No presente trabalho, empregou-se o meio de Cary & Blair, conservando-se as fezes a 4 °C por 3 a 7 dias. Isto resultou em 19,02% de isolamentos. Tal índice de positividade é inferior àqueles referidos em investigações que utilizaram o processo de semeadura direta com fezes *in natura* (Giugliano & Giugliano, 1985; Loureiro et al., 1983; Pessoa et al., 1978 a, b). Entretanto a análise estatística dos dados da Tabela I, revelou um aspecto muito interessante e de cunho prático, ou seja, a inexistência de diferença significativa dos isolamentos dos diferen-

tes agentes, no caso de permanência das fezes no meio de Cary & Blair a 4 °C no intervalo de 3 a 7 dias ( $p < 0,1$ ).

Dos membros da família *Enterobacteriaceae* encontrados em 326 fezes (Tabela II), destacou-se a *Salmonella* perfazendo 29 isolamentos (8,89%) sendo a *Salmonella typhimurium*, o sorotipo mais freqüente, fato também observado em diversas outras regiões do país (Pessoa et al., 1978 b; Schwantes et al., 1983) e mesmo no Recife (Leal et al., 1987).

Como particularidade, observou-se que os demais sorotipos, *Salmonella livingstone* e *Salmonella lomita*, não foram citados em Recife por Leal et al. (1987), tanto em fezes diarréicas, como de indivíduos sadios (Leal et al., 1988) provenientes de áreas nas mesmas condições sócio-econômicas da população do presente trabalho.

Com referência aos tipos de *E. coli* enteropatogênica encontrados, predomina 0111 K58 (3,98%) seguido de 055K59 (1,22%). O primeiro, já foi responsabilizado por surtos diarréicos em Recife (Magalhães et al., 1981), São Paulo (Pessoa et al., 1978 a), Belém (Loureiro et al., 1983) e Manaus (Giugliano & Giugliano, 1985). Por outro lado 0111 K58 foi raramente encontrada entre portadores sadios em estudo realizado no Recife (Leal et al., 1988), sugerindo maior adaptabilidade e ação patogênica, determinando nos pacientes processos diarréicos graves.

A freqüência do gênero *Shigella* encontrada apenas 10 vezes em 326 exames (3,07%) é considerada baixa quando comparada com outros

trabalhos (Giugliano & Giugliano, 1985), mas equivalente aos achados em São Paulo (Pessoa et al., 1978 a) e em Belém (Loureiro et al., 1983). É curioso que o percentual de isolamento foi comparável àquele encontrado para os portadores sãos da mesma região (Leal et al., 1988), também utilizando meio de transporte.

O sorogrupo mais freqüente foi *Shigella flexneri*, à semelhança de outras regiões do Brasil (Giugliano & Giugliano, 1985; Loureiro et al., 1983; Pessoa et al., 1978 a) e em Recife (Leal et al., 1988). Por outro lado a *Shigella sonnei* não foi isolada em nenhuma ocasião.

A situação da *Shigella* no Recife é particular, uma vez que a freqüência e o sorotipo predominante são comparáveis aos dos portadores sãos (Leal et al., 1988) e diferente da *Salmonella* e *E. coli* em que as espécies e os sorotipos que levam a processos diarreicos são diversos daqueles encontrados entre os indivíduos sadios (Leal et al., 1988).

É interessante citar que foi obtido sem nenhuma metodologia específica, a partir de crescimento em agar EMB, após incubação a 37 °C por 24 horas o isolamento de uma cepa de *Yersinia enterocolitica* pertencente ao biotipo 1 é lisotipo Xo não tipável sorologicamente. O espécime clínico havia permanecido 7 dias em meio de Cary & Blair a 4 °C.

Provavelmente o pequeno número de infecções múltiplas encontradas, tenha como causa a parcimônia na metodologia, uma vez que só um tubo identificado bioquimicamente como *Salmonella* ou *Shigella* era processado sorologicamente.

Analisando a distribuição das enterobactérias como um todo, por faixa etária (Tabela III), a freqüência mais alta foi verificada nas crianças entre 3 – 6 meses de idade, quando o desmame já ocorreu e a exposição aos agentes bacterianos é maior. Observando cada tipo de enterobactéria é digna de nota a alta incidência de *Salmonella* em crianças de 1 – 3 anos, provavelmente devido à infecção hospitalar. Este aspecto está reforçado pela acentuada predominância de *Salmonella typhimurium* (Tabela II), reconhecida como um dos agentes mais comuns por sua extraordinária colonização e propagação em ambientes hospitalares. Um outro detalhe que corrobora esta suspeita refere-se que 95% das salmonelas, evidenciaram modelos de multirre-

sistência aos antibióticos, principalmente à ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina (dados não publicados).

Salienta-se que a distribuição das enterobactérias por faixa etária (Tabela III) é semelhante àquela apresentada por Giugliano & Giugliano (1985) em Manaus, entretanto Leal et al. (1988) analisando indivíduos sadios de uma comunidade, observaram que a faixa etária que abriga mais enterobactérias fazendo parte de flora intestinal, está entre 3 – 5 anos.

Em conclusão assinala-se que a detecção de apenas 19,02% de agentes etiológicos bacterianos, nos processos diarreicos analisados, implica em que nas avaliações futuras, sejam introduzidas técnicas de isolamento para outras bactérias enteropatogênicas (*E. coli* enterotoxigênicas, *Campylobacter*, *Yersinia*, etc.) e que no processo de identificação e caracterização bioquímicas e sorológicas seja analisado um maior contingente de cepas isoladas.

#### RESUMO

**Freqüência de enterobactérias patogênicas em processos diarreicos infantis na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil** – Foram analisadas 326 amostras de fezes diarreicas provenientes de crianças entre 0 a 5 anos, internadas em dois hospitais de reidratação do Recife, Pernambuco. Foi introduzido o meio de Cary & Blair a 4 °C para transporte das fezes, não havendo diferença no percentual de isolamento quando o material permaneceu no meio de transporte entre 3 a 7 dias. Dos exames, 19,02% estavam positivos para um ou mais dos agentes bacterianos pesquisados, tendo sido encontrados 26 *Salmonella* de 3 espécies, 21 *Escherichia coli* enteropatogênica clássica, 1 *Escherichia coli* enteroinvasiva, 10 *Shigella* de 3 sorotipos e 1 *Yersinia enterocolitica*.

Palavras-chave: enterobactérias patogênicas – diarreia infantil – Recife, Brasil

#### AGRADECIMENTOS

Nós somos gratos a Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida por seus comentários, sugestões e revisão do manuscrito.

#### REFERÊNCIAS

- CARY, S. G. & BLAIR, E. B., 1964. New transport medium for shipment of clinical specimens. *J. Bacteriol.*, 88: 96-98.

- COSTA, G. A. & HOFER, E., 1972. *Isolamento e identificação de enterobactérias*. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 120 p.
- EDWARDS, P. R. & EWING, W. H., 1972. *Identification of Enterobacteriaceae*, 3 ed., Burgess Publ. Minnesota, 326 p.
- GIUGLIANO, L. G. & GIUGLIANO, R., 1985. Etiologia das diarreias agudas em Manaus: observações ambulatoriais e na comunidade. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 16: 234-239.
- GUERRANT, R. L.; KIRCHOFF, L. V.; SHIELDS, D. S.; NATIONS, M. K.; LESLIE, J.; SOUZA, M. A.; ARAÚJO, J. G.; CORREIA, L. L.; SAUER, K. I.; McCLELLAD, K. E.; TROWBRIDGE, F. L. & HUGUES, J. M., 1983. Prospective study of diarrheal illness in northeastern Brazil: patterns of disease, nutritional impact, etiologies and risk factors. *J. Infect. Dis.*, 148: 986-997.
- KAUFFMANN, F., 1954. *Enterobacteriaceae* 2ª ed. E. Munksgard, Copenhagen, 382 p.
- LEAL, N. C.; CAVALCANTI, T. I. R.; RODRIGUES, D. P. & HOFER, E., 1988. Enteropatógenos detectados em crianças sadias em três comunidades de baixa renda, em Recife, Estado de Pernambuco, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 88: 153-159.
- LEAL, N. C.; SÁ, A. T.; SOLARI, C. A.; SILVA, S. J. & HOFER, E., 1987. Sorotipos de *Salmonella* isolados de processos entéricos humanos em Recife, Pernambuco, Brasil, durante o triênio 1978-1980. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82: 43-49.
- LOUREIRO, E. C. B.; SERAFIM, M. B.; LINHARES, A. C. & CASTRO, A. F. P., 1983. *Escherichia coli* enterotoxigênicas e rotavirus detectados em crianças com gastroenterite aguda em Belém, Pará. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 14: 129-135.
- MAGALHÃES, M.; ANDRADE, M. & CARVALHO, A. E., 1981. Pathogenic *Escherichia coli* associated with infantile diarrhea. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 12: 38-41.
- MAGALHÃES, M.; SIQUEIRA, Y.; MAGALHÃES, E.; VERAS, A. & CAMPOS, G., 1971. Avaliação do meio HE no isolamento de enterais patogênicas. In: III Cong. Brasileiro de Microbiologia, Belo Horizonte, 197-198.
- McLEAN, M.; BRENNAM, R.; HUGUES, J. M.; KORZENIOWSKI, O. M.; SOUZA, M. A.; ARAÚJO, J. G.; BENEVIDES, T. M. & GUERRANT, R. L., 1981. Etiology of childhood diarrhea and oral rehydration therapy in northeastern Brazil. *Publ. Pan. Am. Health Organ.*, 15.
- MAROJA, R. C.; ALMEIDA, A. J.; SOUZA, E. B. & FREITAS, E. N., 1959a. Estudos bacteriológicos de uma epidemia de diarreia infantil em Fortaleza, Ceará, 1957. *Rev. SESP*, 10: 733-739.
- MAROJA, R. C.; FREITAS, E. N. & CRUZ, F. M., 1959b. Tipos de *Salmonella* isoladas na Zona da Mata de Pernambuco, 1956-1958. *Rev. SESP*, 10: 759-763.
- MAROJA, R. C.; FREITAS, E. N. & PEDRO, T. L., 1959c. Frequência de enterobactérias e entroparasitas em casos de diarreia aguda em menores de 1 ano, Palmares, Pernambuco. *Rev. SESP*, 10: 747-755.
- ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE, 1983. La mortalidad en niños de 1 a 4 años en las Americas. *Boletim Epidemiológico*, 4: 1-4.
- PESSÔA, G. V. A.; CALZADA, C. T.; PEIXOTO, E. S.; MELLES, C. E. A.; KANO, E.; RASKIN, M.; SIMONSEN, V. & IRINO, K., 1978a. Ocorrência de bactérias enteropatógenicas em São Paulo no septênio 1970-76. III - Sorotipos de *Shigella* e de *Escherichia coli* da gastroenterite infantil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38: 129-139.
- PESSÔA, G. V. A.; IRINO, K.; CALZADA, C. T.; MELLES, C. E. A. & KANO, E., 1978b. Ocorrência de bactérias enteropatógenicas em São Paulo no septênio 1970-76. I - Sorotipos de *Salmonella* isolados e identificados. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38: 87-105.
- RAMOS, M.; COSTA, G. A.; TAVARES, H. P. & HOFER, E., 1963. Tipos de *Salmonella* isolados em Recife. *Atas Soc. Biol.*, Rio de Janeiro, 7: 5.
- ROUQUAYROL, M. Z., 1962. *Diarreia infantil em Fortaleza: contribuição ao seu estudo com especial referência à shigeloses, Ceará, Faculdade de Farmácia e Odontologia*, (Tese de Docência Livre), 85 p.
- SCHWANTES, I.; ESTEVES, J. E. L. & HOFER, E., 1983. Frequência de sorotipos de *Salmonella* em dois hospitais pediátricos. *Bol. Saúde Porto Alegre*, 10: 12.
- SERÉNY, B., 1985. Experimental *Shigella* keratoconjunctivitis: A preliminary report. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 2: 293-296.
- SOUZA, T. T.; NORONHA, M. C. C. & RIEDEL, O. O., 1975. Significado das salmonelas nas diarreias infantis em Fortaleza. *Rev. Univ. Fed. Ceará*, 15: 39-44.
- VIEIRA, S., 1983. *Introdução à Bioestatística*, 2ª ed. Rio de Janeiro, Ed. Campus, 294 p.