

INCIDÊNCIA DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÊNICA (ETEC), ROTAVÍRUS E *Clostridium perfringens* DE CASOS DE DIARRÉIA EM CRIANÇAS, NA REGIÃO DE CAMPINAS, SP, BRASIL

Maria Sílvia V. GATTI (1), Lucila C. RICCI (1), Marlene B. SERAFIM (1) & Antonio F. PESTANA DE CASTRO (1)

RESUMO

Foi realizada uma pesquisa na região de Campinas, SP, Brasil, sobre a presença de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), rotavírus e *Clostridium perfringens* enterotoxigênico em fezes diarreicas de crianças com até 2 anos de idade. Dos 132 espécimens fecais examinados quanto à presença de ETEC 27 (20,45%) foram positivos. Destes foram isoladas 41 amostras de ETEC, das quais 40 produziram apenas a enterotoxina termolábil (LT) detectada pelo teste de imuno-hemólise radial modificado. Entre as 183 amostras de fezes examinadas para rotavírus, 29 (15,84%) foram positivas pelas técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e ensaio imunoenzimático (EIE), sendo que destas, 15 (51,7%) foram provenientes de materiais coletados nos meses de inverno. Todas as amostras pertenciam ao grupo A e, através da técnica de PAGE, pode-se observar que o tipo eletroforético mais freqüente (9 amostras) foi designado Ib, IIc, IIIb, IVa, de acordo com a classificação por nós adotada. Apenas 113 amostras de fezes foram examinadas para a presença de *C. perfringens* enterotoxigênico. Para a detecção da enterotoxina nos sobrenadantes das culturas foram utilizadas as técnicas de hemaglutinação passiva reversa e inoculação intravenosa em camundongos, sendo encontradas 12 (10,61%) amostras enterotoxigênicas. Diante destes resultados é chamada a atenção sobre o valor apenas relativo de uma coprocultura convencional para fins de diagnóstico, ressaltando-se a importância da criação de métodos simplificados que favoreçam a detecção e identificação dos grupos de agentes enteropatogênicos estudados na presente pesquisa.

UNTERMOS: Diarréia infantil; *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC); Rotavírus; *Clostridium perfringens* enterotoxigênico.

INTRODUÇÃO

Nos países em desenvolvimento as diarreias são indubitavelmente, uma das mais importantes causas de mortalidade infantil^{10, 14, 25, 30}. A etiologia é bastante diversificada, mas pelo menos dois agentes têm sido bastante investigados: a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) e os

rotavírus^{3, 7, 16, 30}. As amostras de colibacilos do grupo ETEC podem produzir uma enterotoxina termolábil (LT-I) e/ou termoestável (STa)²⁴. Os rotavírus, por outro lado, têm sido relatados como uma das principais causas de gastroenterite infantil^{2, 3, 15, 18, 20, 21}, em alguns casos em associa-

(1) Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia — UNICAMP, Cidade Universitária, Caixa Postal 6109, CEP 13081, Campinas, São Paulo, Brasil.

ção com outros microrganismos, inclusive amostras de ETEC²⁴.

Em algumas das capitais brasileiras, tais como São Paulo^{2, 9}, Florianópolis¹⁰, Recife¹⁸ e Manaus⁹, têm sido feitos vários estudos sobre a incidência do grupo ETEC em casos de diarreia. Os rotavírus também têm sido estudados em São Paulo^{2, 20}, Rio de Janeiro²⁰, Belo Horizonte²¹ e Belém¹⁶.

Um outro microrganismo estudado na presente investigação foi *Clostridium perfringens* enterotoxigênico, em especial os tipos A e C. O tipo A tem sido observado em casos de intoxicação alimentar, inclusive em nosso país^{27, 29}, ao passo que o tipo C, que produz ainda uma toxina com efeitos letais e necrotizante, tem sido relatado em outros países como agente causal da enterite necrótica¹⁹. Embora esta bactéria possa ser considerada como um habitante normal da flora intestinal do homem e animais, não encontramos no Brasil estudos sobre a frequência de *C. perfringens* enterotoxigênico em fezes diarréicas de crianças.

No município de Campinas habitam, atualmente, cerca de 1.000.000 de pessoas, podendo pois ser esta cidade considerada como uma das mais populosas do país. Em que pese este fato, tanto quanto saibamos, não existe até o momento nenhum estudo mais abrangente que objetivasse pesquisar em crianças com diarreia a frequência de amostras de *E. coli* do grupo ETEC e rotavírus nesta região.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras fecais — No período de outubro de 1985 a setembro de 1986 foram coletadas, na região de Campinas, SP, 183 amostras de fezes de crianças com até 2 anos de idade com diarreia aguda.

Estas crianças quase na sua totalidade pertenciam à classe média e média alta tendo sido atendidos através de convênios ou consultas particulares, sendo então encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica de Campinas. Em todos os casos a coleta foi feita no laboratório através de evacuação normal em coletor universal esterilizado ou através do uso de suabe esté-

ril. As fezes, logo após a coleta foram refrigeradas e submetidas a exames microbiológicos para a detecção de ETEC, rotavírus e *C. perfringens* enterotoxigênico.

Exames bacteriológicos e detecção de enterotoxina — De cada material fecal isolou-se, após a semeadura em meio de Mc Conkey (Difco) e identificação bioquímica das colônias isoladas⁸, 4 amostras de *E. coli* que foram examinadas quanto à produção de enterotoxinas. As amostras de *E. coli* isoladas foram, então, cultivadas em meio de "Casamino Acids-Yeast Extract" (CAYE), para o preparo das enterotoxinas LT e STa, conforme anteriormente descrito⁵. Para a detecção da enterotoxina LT utilizou-se o teste da imunohemólise radial (IHR) modificado³², ao passo que para a detecção da enterotoxina STa foi usado o teste do camundongo recém-nascido (CRN), de acordo com o preconizado por DEAN et al.⁶.

No teste de IHR, após a adição do complemento de cobaia, diluído 1:10, a leitura dos halos de hemólise era feita após 18 h, à temperatura ambiente, considerando-se positivas as amostras cujo sobrenadante das culturas dessem halos de hemólise visíveis (iguais ou superiores a 5 mm). Testes das culturas controle LT + (*E. coli* 40 T) e LT — (*E. coli* K12), gentilmente cedidas por R. L. Trabulsi, EPM, São Paulo, foram incluídas nos testes de IHR.

A detecção da produção de enterotoxina STa foi realizada com os mesmos sobrenadantes, que foram inoculados por via intragástrica em camundongos recém-nascidos de 3 dias de idade, em lotes de 4 animais por material. O inóculo foi de 0,1 ml de sobrenadante, previamente misturado ao corante azul de Evans (0,02%). Após 4 horas, os animais foram sacrificados, calculando-se para cada material a relação peso dos intestinos/peso das carcaças. Valores iguais ou superiores a 0,085 foram considerados positivos¹⁶.

Para o isolamento de *Clostridium perfringens*, as amostras de fezes foram semeadas em meio de ágar SPS (Sulfonamida, Polimixina, Sulfito) (Difco)¹, em ambiente de anaerobiose, contendo uma atmosfera de 90% de N₂ e 10% de CO₂. As colônias suspeitas de serem *C. perfringens* foram identificadas bioquimicamente

de acordo com SERRANO²⁷. Para o preparo da enterotoxina, as amostras de *C. perfringens* isoladas foram semeadas em meio de Duncan & Strong²⁸, adicionando-se de 0,4% de rafinose, fazendo-se 4 a 5 passagens, até que se observasse pelo menos 50% de esporulação.

Os sobrenadantes obtidos a partir destas culturas, foram examinados quanto à produção de enterotoxina pela técnica de hemaglutinação passiva reversa (HPR)³¹ e inoculação endovenosa em camundongos (EIC)²⁶.

No teste de HPR títulos iguais ou superiores a 1:4 foram considerados como positivos, sendo as amostras classificadas como enterotoxigênicas.

Em relação a prova de IEC a morte dos camundongos inoculados, em tempo igual ou inferior a 30 min. indicava uma reação positiva desde que este efeito fosse neutralizado quando se inoculava em animais controles, sobrenadantes das culturas em teste com anti-enterotoxina, conforme recomendado por STARK & DUNCAN²⁸.

Deteção de rotavírus — A deteção de rotavírus foi feita pela eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE) e por ensaio imunoenzimático (EIE). A técnica de PAGE foi realizada de acordo com as recomendações de LAEMMLI¹³ com algumas modificações. Os extratos de RNA obtidos a partir do material fecal, de acordo com HERRING et al.¹², foram analisados em gel de poliácridamida e 7,0%, após 18 h a temperatura ambiente, com corrida sob corrente de 10 mA, sendo em seguida corado pela prata¹². A classificação utilizada para o estudo dos tipos eletroforéticos foi a de LOURENÇO et al.¹⁷, que consiste em dividir os 11 segmentos do RNA de rotavírus em 4 grupos, onde pequenas variações dentro de cada grupo podem significar tipos eletroforéticos diferentes. O teste de EIE foi realizado com um "kit" da Fundação Oswaldo Cruz, gentilmente cedido pelo Dr. H. G. Pereira e seguindo as recomendações deste pesquisador e seus colaboradores²⁰.

A amostra de rotavírus SA 11 foi incluída como padrão em ambos os testes.

RESULTADOS

Das 183 amostras de fezes coletadas apenas 132 puderam ser examinadas para pesquisa do grupo ETEC sendo que 27 (20,45%) apresentaram-se como positivas. Destas foram isoladas 41 amostras ETEC, sendo que apenas uma foi produtora da enterotoxina STa, enquanto que as restantes produziram exclusivamente LT.

Dos 183 materiais fecais examinados para rotavírus foi detectada a presença destes em 29 (15,84%) pelas técnicas de PAGE e/ou EIE. Sete amostras deram resultados positivos apenas no EIE (dados não apresentados em tabela). Na figura 1 está representada a frequência de distribuição de amostras de *E. coli* do grupo ETEC e de rotavírus no período estudado. Chama-se atenção para a incidência maior de infecções por rotavírus nos meses de junho e julho, quando foram detectadas 15 (51,7%) do total das 29 amostras de rotavírus identificadas nos materiais examinados durante o período de estudo.

Todas as amostras do rotavírus pertenciam ao grupo A (subgrupo 2) e, através do teste de PAGE pode-se observar que entre as 22 amostras detectadas por esta técnica foram verificadas 5 tipos eletroforéticos diferentes (Fig. 2, Ta-

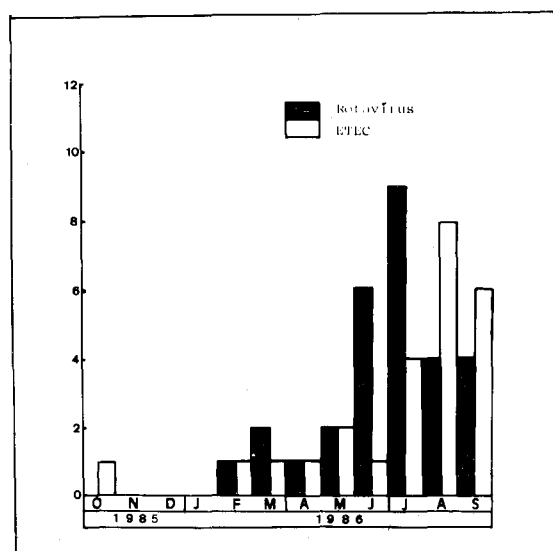


Fig. 1 — Número de amostras positivas de ETEC e rotavírus isoladas em fezes de crianças com até 2 anos de idade, no período de outubro de 1985 a setembro de 1986, na região de Campinas, SP.

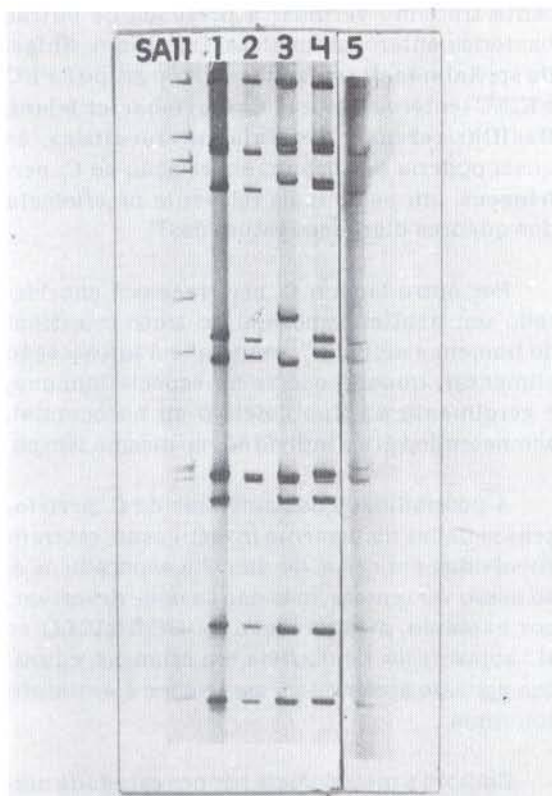


Fig. 2 — Eletroforetípos de rotavírus de origem humana e da amostra padrão SA11, em eletroforese em gel poliacrilamida. Linha 1: amostra Ic, IIc, IIIc, IVa; linha 2: Ic, IIc, IIIf, IVa; linha 3: Ib, IIa, IIIb, IVa; linha 4: Ib*, IIc, IIIb*, IVa e linha 5: Ib, IIc, IIIb, IVa.

TABELA 1

Amostras de rotavírus isoladas de fezes de crianças de acordo com eletroforetípos padrões¹⁾.

Tipo	Eletroforetípos	Nº amostras
1	Ib, IIc, IIIb, IVa	9
2	Ic, IIc, IIIc, IVa	6
3	Ib, IIa, IIIb, IVa	5
4	Ib*, IIc, IIIb*, IVa	1
5	Ic, IIc, IIIf, IVa	1

¹⁾ Segundo modelo proposto por Lourenço, M. H. & col.¹⁷⁾

bela 1), o que foi confirmado por co-eletroforese. Segundo a classificação por nós adotada, o tipo eletroforético mais freqüente foi Ib, IIc, IIIb, IVa, com 9 amostras. O tipo Ic, IIc, IIIc, IVa, apresentou 6 amostras e o tipo Ib, IIa, IIIb, IVa, 5 amostras. Uma amostra pertenceu ao tipo Ic, IIc, IIIf, IVa, ao passo que uma amostra apresentou 2 segmentos a mais (Fig. 2) respectiva-

mente nos grupos I e III, sendo identificada como sendo provavelmente uma mistura de rotavírus com o tipo eletroforético Ib*. IIc, IIIb*, IVa.

Apesar de incluído em nossa metodologia, o exame para *C. perfringens* enterotoxigênico só foi possível em 113 amostras de fezes. Destas, em apenas 12 (10,61%) foram isoladas cepas que se revelaram serem enterotoxigênicas pelos testes de HPR e IEC (dados não apresentados em tabela). Das 132 amostras de fezes examinadas concomitantemente para ETEC e rotavírus 6 (4,54%) apresentaram uma associação dos 2 agentes. Da única amostra de fezes, da qual se isolou uma amostra de ETEC produtora da enterotoxina STa, isolou-se também uma amostra de *C. perfringens* enterotoxigênica (dados não apresentados em tabela).

DISCUSSÃO

Em termos de Brasil, com raríssimas exceções, apesar da importância das diarreias como causa de mortalidade infantil, a identificação dos agentes causais, tem se limitado aos grandes centros.

Como os colibacilos do grupo EPEC são os mais freqüentes em casos de diarreia infantil, principalmente nos primeiros 6 meses de vida³⁰, a maioria dos laboratórios, mesmo em municípios com menos de 1.000.000 de habitantes, está potencialmente adaptada para realizar a identificação desse grupo, através de aglutinação em lâmina, usando antissoros comerciais. As infecções provocadas por *E. coli* invasora (EIEC), à semelhança de *Shigella* sp, embora possam ocorrer em qualquer idade, são mais comuns em adultos e em crianças com mais de 2 anos de idade³⁰. De modo geral, entretanto, os laboratórios estão também suficientemente equipados para tal diagnóstico.

Sob o ponto de vista microbiológico, embora outros patógenos devessem ser considerados num exame de fezes, existem dois grupos que pela sua importância merecem ser incluídos neste tipo de diagnóstico. Um deles é o dos colibacilos do grupo ETEC e outro, dos rotavírus. Assim, segundo TRABULSI³⁰, entre as diarreias de origem bacteriana, as ETEC constituem a 3ª causa mais freqüente de diarreia em crianças até

1 ano de idade e a 1ª causa em crianças de 1-2 anos de idade. No que diz respeito aos rotavírus, em trabalho recente, realizado em Belo Horizonte²¹, a incidência de rotavírus entre 136 crianças com idade compreendida entre 0-18 meses variou entre 19,5% a 31,2%, taxas estas crescentes de acordo com a faixa etária maior, com um resultado médio de 21,5%. Anteriormente, BALDACCINI et al.², em São Paulo, relataram 35,27% de positividade para rotavírus.

Nossos achados, em relação às amostras de ETEC e rotavírus, não diferem muito dos encontrados por outros autores em relação a São Paulo, Belo Horizonte, Recife, Belém^{2, 9, 10, 15, 16, 18, 20, 21, 23} no que tange à frequência destes agentes em casos de diarreia em crianças com até 2 anos de idade. No que tange às ETEC, contudo, causou nos certa surpresa o elevado número de amostras produzindo unicamente a enterotoxina LT. Alguns pesquisadores têm relatado que a ocorrência de amostras LT+ em indivíduos com diarreia e normais é aproximadamente a mesma^{23, 30}, o que poderia diminuir eventualmente a importância desta toxina, como fator de virulência, em relação a nossos achados.

Com relação a rotavírus a técnica de PAGE permitiu um estudo mais pormenorizado dos tipos eletroforéticos mais frequentes. Assim, no que concerne à região de Campinas, todos os rotavírus detectados foram do grupo A, subgrupo 2, e, embora com pequena diferença em relação a outros dois eletroforetípos, o tipo Ib, IIc, IIIb e IV, foi o mais frequente. Ressalta-se que em trabalho semelhante, realizado por PEREIRA et al.²⁰, abrangendo 3 capitais brasileiras, este eletroforetípo e os demais por nós identificados não foram relatados. Este fato pode representar apenas uma distribuição mais diversificada de eletroforetípos²⁰ ou até mesmo uma situação peculiar de nossa região. A técnica de PAGE revelou um quinto eletroforetípo, com 13 bandas (Ib*, IIc, IIIc*, IVa), que na realidade era uma mistura de 2 rotavírus. À semelhança do relatado por PEREZ et al.²¹, a maior frequência de rotavírus foi encontrada nos meses de inverno.

O significado das 12 amostras de *C. perfringens* enterotoxigênicos, por nós encontradas nas 113 fezes examinadas, não é fácil de ser analisado. Primeiramente, não foi objetivo do pre-

sente trabalho verificar a presença de outras bactérias enteropatogênicas, tais como, *Shigella* sp, *Salmonella* sp, colibacilos do grupo EPEC e EIEC (enteroinvasora), *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus* e *Yersinia enterocolitica*, as quais poderia se atribuir, em relação ao *C. perfringens*, um papel mais relevante na etiologia dos quadros diarreicos estudados³⁰.

Por outro lado, o *C. perfringens* é considerado um habitante normal do trato intestinal do homem e animais³⁰, sendo que a intoxicação alimentar, quando ocorre na espécie humana, é geralmente do tipo coletivo ou nosocomial, acometendo vários indivíduos ao mesmo tempo.

A possibilidade das amostras de *C. perfringens* isoladas na presente investigação, estarem envolvidas em casos de diarreia esporádicos é, ao nosso ver remota, mas não se pode desprezar, por exemplo, a observação de BORRIELO et al.⁴ sobre casos de diarreia em crianças, causados por este anaeróbio e associados à antibioterapia.

Embora a metodologia por nós estudada não tenha abrangido o estudo de outros agentes enteropatogênicos, já mencionados acima, nossos achados, principalmente com relação às ETEC e aos rotavírus, justificariam uma recomendação aos laboratórios clínicos sobre a inclusão de técnicas simplificadas que permitissem a detecção destes agentes, via de regra excluídos dos exames de fezes convencionais, mormente no que concerne a cidades do porte de Campinas ou menores.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração técnica de Izildinha A. G. Colli, Paula S. Siqueira e Mirtis M. G. Ferraz.

O presente trabalho recebeu apoio financeiro da FAPESP, do CNPq e da FINEP.

SUMMARY

Incidence of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), rotaviruses and *Clostridium perfringens* from cases of diarrhea among children, in the region of Campinas, SP, Brazil.

A survey for the detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), rotavirus and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in diarrheic stools of children up to 2 years old was carried out in the region of Campinas, SP, Brazil. Twenty-seven (20.45%) faecal specimens were positive for ETEC. From these samples 41 strains of ETEC were isolated from which 40 produced only thermolabile (LT) enterotoxin, as detected by a modified radial immune haemolysis test. Among the 183 faecal specimens examined for the detection of rotavirus, 29 (15.84%) were positive when examined by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and immunoenzymatic assay (EIA) being 15 (51.7%), derived from stools collected from winter months.

All strains of rotavirus belonged to group A and through the PAGE technique, it was observed that the most frequent (9 strains) electrophoretotype, according to the adopted classification, was Ib, IIc, IIIb, IVa. Only 113 fecal specimens were examined for the presence of enterotoxigenic *C. perfringens*. For the detection of enterotoxin in culture supernatants the reverse passive haemagglutination and intravenous inoculation of mice were used. Twelve (10.61%) enterotoxigenic *C. perfringens* strains were found. Taking into consideration these findings the authors call the attention of the relative value of conventional coprocultures for diagnostic purposes, pointing out the importance of establishing simplified methods which would render easier, the detection and identification of the groups of enteropathogenic agents studied in this research.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANGELOTTI, R.; HALL, H. E.; FOTER, M. J. & LEWIS, K. H. — Quantitation of *Clostridium perfringens* in food. *Appl. Microbiol.*, 10: 193-199, 1962.
2. BALDACCI, E. R.; CANDEIAS, J. A. N.; BREVIGLIERI, J. C. & GRISI, S. J. E. — Etiologia viral e bacteriana de casos de gastroenterite infantil: uma caracterização clínica. *Rev. Saúde públ. (S. Paulo)*, 13: 47-53, 1979.
3. BLACK, R. E.; MERSON, M. H.; RABMAN, A. S. M. M.; YUMUS, M.; ALIM, A. R. M. A.; HUG, I.; YOLKEN, R. H. & CURLIN, C. T. — A two year study of bacterial, viral and parasitic agents associated with diarrhea in rural Bangladesh. *J. infect. Dis.*, 142: 660-664, 1980.
4. BORRIELLO, S. P.; LARSON, H. E.; WELCH, A.; BARELAY, F.; STRINGER, M. F. & BARTHOLOMEW, B. A. — Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: a possible cause of antibiotic associated diarrhoea. *Lancet*, I, 305-307, 1984.
5. CASTRO, A. F. P. de; GATTI, M. S. V.; SERAFIM, M. B.; BRITO, J. R. F. & BARCELLOS, D. E. S. N. — Significance of thermostable enterotoxin produced by porcine enteropathogenic *Escherichia coli*. *Vet. Rec.*, 115: 518-519, 1984.
6. DEAN, A. G.; CHING, Y.; WILLIAMS, R. G. & HARDEN, L. B. — Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. infect. Dis.*, 125: 407-411, 1972.
7. DONTA, S. T.; WALLACE, R. B.; WHIPP, S. C. & OLART, Y. — Enterotoxigenic *Escherichia coli* and diarrheal disease in Mexican children. *J. infect. Dis.*, 135: 482-485, 1977.
8. EDWARDS, P. R. & EWING, W. H. — Identification of enterobacteriaceae. 3rd Minneapolis, Minnesota, Burgess Publishing, 1972. 258 p.
9. GIUGLIANO, L. G.; NAKAGIMA, G. S.; GIUGLIANO, R. & SHRIMPSON, R. — *Escherichia coli* enterotoxigenica isolada de lactentes em Manaus, Amazonas, Brasil. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 9: 198-201, 1978.
10. GUERRANT, R. L.; MOORE, R. A.; KIRSCHENFELD, B. A. & LANDI, M. A. — Role of toxigenic and invasive bacteria in acute diarrhoea of childhood. *New Engl. J. Med.*, 293: 567-573, 1975.
11. GUTH, B. E. C.; PICKETT, C. L.; TWIDDY, E. M.; HOLMES, R. K.; GOMES, T. A. T.; LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L. & TRABULSI, L. R. — Production of type II heat labile enterotoxin by *Escherichia coli* isolated from food and human feces. *Infect. Immun.*, 59: 587-589, 1986.
12. HERRING, A. J.; INGLIS, N. F.; OJEH, C. K.; SNODGRASS, D. R. & MENZIES, J. D. — Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. clin. Microbiol.*, 16: 473-477, 1982.
13. LAEMMLI, U. K. — Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond)*, 227: 680-685, 1970.
14. LEVINE, M. — *Escherichia coli* that cause diarrheal, enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *J. infect. Dis.*, 155: 377-389, 1987.
15. LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; FREITAS, R. B. de & MASCARENHAS, J. D. P. — Reinfections and rotavirus serotypes in Belém, Brazil (preliminary report). *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 30: 101-106, 1988.
16. LOUREIRO, E. C. B.; SERAFIM, M. B.; LINHARES, A. C. & CASTRO, A. F. P. de — *Escherichia coli* enterotoxigênicas e rotavírus detectados em crianças com gastroen-

GATTI, M. S. V.; RICCI, L. C.; SERAFIM, M. B. & PESTANA DE CASTRO, A. F. — Incidência de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), rotavírus e *Clostridium perfringens* de casos de diarreia em crianças, na região de Campinas, SP, Brasil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, **31**(6): 392-398, 1989.

- terite aguda em Belém, Pará. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, **14**: 129-135, 1983.
17. LOURENÇO, M. H.; NICOLAS, J. C.; COHEN, J.; SCHERNER, R. & BRIOCUT, F. — Study of human rotavirus genome by electrophoresis: attempt of classification among strains isolated in France. *Ann. Virol. (Paris)*, **132E**: 161-173, 1981.
18. MAGALHÃES, M.; ANDRADE, M. & CARVALHO, A. E. — Pathogenic *Escherichia coli* associated with infantile diarrhea. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, **12**: 38-41, 1981.
19. MURREL, T. G. C. & ROTH, L. — Necrotizing jejunitis: a newly discovered disease in the highlands of New Guinea. *Med. J. Aust.*, **50**: 61-69, 1963.
20. PEREIRA, H. G.; AZEREDO, R. S.; LEITE, J. P. G.; CANDEIAS, J. A. N.; RACZ, M. L.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B. & TRABULSI, L. R. — Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. *J. Hyg. (Lond)*, **90**: 117-125, 1983.
21. PEREZ, J. N.; REIS, L. F. L.; GONTIJO, J. G.; QUEIROZ, D. M. M.; MENDES, E. N. & PENNA, F. G. — Participação de rotavírus e adenovírus na diarreia aguda da infância, em Belo Horizonte. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, **19**: 180-183, 1988.
22. REIS, M. H. L.; MATTOS, P. P.; CASTRO, A. F. P. de; TOLEDO, M. R. F. & TRABULSI, L. R. — Relationship among enterotoxigenic phenotypes, serotypes and sources of strains in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **28**: 24-27, 1980.
23. REIS, M. H. L.; GUTH, B. E. C.; GOMES, T. A. T.; MURAHOVSKI, J. & TRABULSI, L. R. — Frequency of *Escherichia coli* strains producing heat labile or heat stable or both in children with diarrhea and without diarrhea in São Paulo. *J. clin. Microbiol.*, **15**: 1062-1064, 1982.
24. ROBINS BROWNE, R. M. — Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* in infantile diarrhea. *Rev. infect. Dis.*, **9**: 28-53, 1987.
25. SACK, R. B. — Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Microbiol.*, **29**: 333-353, 1975.
26. SAKAGUCHI, G.; UEMURA, T. & RIEMANN, H. P. — Simplified method for purification of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Appl. Microbiol.*, **26**: 762-767, 1973.
27. SERRANO, A. M. — Incidência de *Clostridium perfringens* em alimentos, um surto de intoxicação e evidência da prova de lecitinase, Campinas, 1976 (Tese de Doutorado — Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da UNICAMP).
28. STARK, R. L. & DUNCAN, C. L. — Biological characteristics of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Infect. Immun.*, **4**: 89-96, 1971.
29. TÓRTORA, J. C. O. & ZEBRAL, A. A. — A human food poisoning in Rio de Janeiro caused by sausage contaminated with enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, **19**: 113-118, 1988.
30. TRABULSI, L. R. — *Microbiologia*. Rio de Janeiro, Livraria Atheneu, 1989.
31. UEMURA, T.; SAKAGUCHI, G. & RIEMANN, H. P. — In vitro production of *Clostridium perfringens* enterotoxin and its detection by reversed passive hemagglutination. *Appl. Microbiol.*, **26**: 381-385, 1973.
32. YANO, T.; OLIVEIRA, M. S.; FONTES, C. F.; ALMEIDA, A. C. P. & CASTRO, A. F. P. de — Detection of heat labile (LT) enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* by the radial immune hemolysis test: a modification for clinical use. *Med. Microbiol. Immunol.*, **171**: 171-178, 1982.

Recebido para publicação em 16/1/1989