

IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGÊNICAS EM AMOSTRAS DE FEZES, POR REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

Ieda Maria Longo *
Octávio Ricci Jr. *
Carlos Augusto Pereira *

RSPUB9/500

LONGO, I. M. et al. *Identificação de cepas de Escherichia coli enteropatogênicas em amostras de fezes, por reação de imunofluorescência direta.* Rev. Saúde públ., S. Paulo, 14:199-204, 1980.

RESUMO: Foi realizado diagnóstico etiológico de casos de diarreia aguda em 121 pacientes internados na Clínica Pediátrica do Hospital da Santa Casa de São Paulo, Brasil. Foram utilizados os métodos bacteriológico clássico e de reação de imunofluorescência direta para a identificação de cepas de *Escherichia coli* enteropatogênicas; para estudo da sensibilidade das cepas de *Escherichia coli* isoladas, a diferentes antibióticos, foi usado o método de Concentração Inibitória Mínima (CIM). Dos 56 casos positivos, 89,3% correspondiam a diferentes sorotipos enteropatogênicos de *Escherichia coli*, quando utilizada a técnica de imunofluorescência direta. O método bacteriológico clássico revelou ainda, nos 121 casos examinados, 4 cepas de *Salmonella* e 2 de *Shigella*. No estudo da CIM verificou-se maior sensibilidade das cepas de *Escherichia coli* enteropatogênicas estudadas à Gentamicina e Amikacina, do que aos outros antibióticos.

UNITERMOS: *Escherichia coli*. Reação de imunofluorescência direta. Técnicas bacteriológicas.

INTRODUÇÃO

Em trabalhos publicados nos últimos anos, vários autores^{3,7,8} mostraram a aplicação do método de imunofluorescência direta na pesquisa de cepas de *Escherichia coli* enteropatogênicas, obtendo resultados satisfatórios do ponto de vista de especificidade, maior sensibilidade que a coprocultura e bons resultados quanto à facilidade e rapidez de execução da técnica. Estes últimos fatores são importantes, tanto pelo número de exames solicitados, como

pelo rápido diagnóstico e isolamento precoce do paciente⁴.

O presente estudo visa a verificação da etiologia de casos de diarreia aguda, na Clínica Pediátrica do Hospital da Santa Casa de São Paulo, e a determinação da sensibilidade a antimicrobianos, de cepas de *Escherichia coli* dos sorotipos tidos como enteropatogênicos. O estudo da sensibilidade das cepas não enteropatogênicas de *Escherichia coli* foi realizado em trabalho anterior⁵.

* Do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP) — Rua Dr. Cezário Motta Júnior, 112 — 01221 — São Paulo, SP — Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

— *Pacientes* — Foram colhidas amostras de fezes de 121 crianças com até 3 anos de idade, internadas na Clínica Pediátrica do Hospital da Santa Casa de São Paulo, apresentando quadro de diarreia aguda.

— *Colheita do material* — Foram utilizados, para colheita de fezes, “swabs” devidamente acondicionados em tubos de ensaio esterilizados por autoclavagem.

— *Reação de imunofluorescência direta para pesquisa de Escherichia coli enteropatogênica (RIFD)*. — Foi realizada segundo técnica já anteriormente padronizada e descrita³. Utilizamos soros conjugados com fluoresceína anti-*Escherichia coli* enteropatogênicas, preparados pelo laboratório Difco, que são fornecidos comercialmente. Estes soros são agrupados em 3 “pools” contendo anticorpos anai-*Escherichia coli* dos seguintes sorotipos¹:

“Pool” A — 026:B6, 055:B5, 0111:B4, 0127:B8.

“Pool” B — 086:B7, 0119:B14, 0124:B17, 0125:B15, 0126:B16, 0128:B12.

“Pool” C — 018:B21, 020:B7, 020:84(B), 028:B18, 044:K74, 0112:B11.

— *Isolamento e identificação bacteriológica* — Foi feita semeadura do material obtido em duas placas de Petri, uma com meio de MacConkey(MC) e outra com meio SS; procedeu-se à identificação bioquímica, a partir do meio de MC de no máximo 12 colônias lactose positivas, servindo o meio SS para a identificação de outros agentes etiológicos. As colônias de *Escherichia coli* isoladas foram testadas novamente por imunofluorescência, visando, deste forma, a confirmação da RIFD.

— *Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)* — As cepas de *Escherichia coli* isoladas foram mantidas em meio “Stock” (Difco), por um período de 2 meses, sendo posteriormente testadas frente a 5 antimicrobianos, a saber: Kanamicina, Cloranfenicol, Neomicina, Gentamicina e Amikacina. Essas cepas do estoque foram posteriormente repicadas em caldo nutriente e a partir deste determinou-se a CIM segundo técnica de Steers e Graves⁶, por meio de diluições seriadas em placa com os antimicrobianos incluídos no meio de cultura (Agar Müller Hinton). As concentrações usadas dos diferentes antimicrobianos foram: 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78 mcg/ml de meio de cultura.

RESULTADOS

Nas Tabelas 1 e 2 estão expressos os resultados obtidos pela RIFD e aqueles obtidos pelo método bacteriológico clássico.

TABELA 1

Agentes etiológicos encontrados nos casos de diarreia aguda

| Agente etiológico * | Número de casos | Porcentagem |
|-------------------------|-----------------|-------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 50 | 89,3 |
| <i>Salmonella</i> ** | 4 | 7,2 |
| <i>Shigella</i> *** | 2 | 3,5 |
| Total | 56 | 100,0 |

* *Escherichia coli* identificadas por método de imunofluorescência; *Salmonella* e *Shigella* identificadas por cultura

** *Salmonella paratyphi B* (2)
Salmonella typhimurium (1)
Salmonella sp (sem identificação) (1)

*** *Shigella sonney* (1)
Shigella flexneri (1)

TABELA 2

Comparação entre os resultados encontrados na Reação de imunofluorescência direta para pesquisa de *Escherichia coli* enteropatogênica (RIFD) e coprocultura para *Escherichia coli*.

| RIFD | Coprocultura | | | | Total | |
|-----------|--------------|------|-----------|------|-------|-------|
| | positivos | | negativos | | | |
| | nº | % | nº | % | nº | % |
| positivos | 48 | 39,7 | 2 | 1,6 | 50 | 41,3 |
| negativos | 0 | 0 | 71 | 58,7 | 71 | 58,7 |
| Total | 48 | 39,7 | 73 | 60,3 | 121 | 100,0 |

Na Tabela 3 e na Fig. 1 pode-se verificar os resultados da determinação da CIM, em 45 cepas de *Escherichia coli* enteropatogênicas estudadas, frente aos seguintes antimicrobianos: Kanamicina, Cloranfenicol, Neomicina, Gentamicina e Amikacina.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Dos 121 casos estudados de diarreia infantil, obtivemos 56 casos positivos para determinado agente etiológico, o que representa uma positividade de 46,3%. Deste total de 56 pacientes, foi identificada a *Escherichia coli* enteropatogênica em 50 casos, *Salmonella* em 4 casos e *Shigella* em 2 casos, o que concorda com os dados da literatura^{2,4}. Comparando o método bacteriológico clássico com a RIFD, na identificação de *Escherichia coli*, a correlação entre os dois foi boa, dado que só houve 2 casos de discordância.

Observamos uma predominância de cepas de *Escherichia coli* enteropatogênicas dos sorotipos que constituem o "pool" A; dois pacientes apresentaram cepas correspondentes aos sorotipos incluídos no "pool" B e "pool" C.

Considera-se assim, recomendável o emprego, em rotina de laboratório, do exame de imunofluorescência direta, para a identificação de *Escherichia coli* enteropatogênica^{3,7,8}, já que esta reação permite obter resultados preciosos num curto espaço de tempo. Esta característica é importante não só em termos de número de exames laboratoriais, mas também bastante útil quando se considera a necessidade do isolamento dos pacientes portadores de *Escherichia coli* enteropatogênica, visando evitar que a infecção se dissemine por contágio.

De acordo com os resultados do estudo da CIM por nós obtidos, podemos observar que as cepas de *Escherichia coli* enteropatogênicas estudadas mostraram-se sensíveis principalmente à Gentamicina e Amikacina e, em menor proporção, à Neomicina, Cloranfenicol e Kanamicina. Segundo estes resultados e os obtidos em trabalho anterior⁶, concluímos não haver diferenças significativas quanto à sensibilidade a estes antimicrobianos entre as cepas de *Escherichia coli* consideradas enteropatogênicas e as consideradas não-enteropatogênicas.

TABELA 3
Sensibilidade das 45 cepas de *Escherichia coli* enteropatogênicas, à diferentes antibióticos*.

| Antibióticos | Concentração em mcg/ml | | | | | | | | | | | | Resultados acumulados para 50mcg/ml | | | |
|---------------|------------------------|------|----|-----|------|-----|------|-----|------|------|------|------|-------------------------------------|------|----|-------|
| | 50 | | 25 | | 12,5 | | 6,25 | | 3,15 | | 1,56 | | 0,78 | | nº | % |
| | nº | % | nº | % | nº | % | nº | % | nº | % | nº | % | nº | % | | |
| Amikacina | — | 0 | 1 | 2,2 | 2 | 4,4 | 4 | 9,0 | 22 | 48,8 | 12 | 26,6 | 4 | 9,0 | 45 | 100,0 |
| Gentamicina | 5 | 11,1 | 3 | 6,6 | 4 | 9,0 | 2 | 4,4 | 1 | 2,2 | 6 | 13,4 | 23 | 51,1 | 44 | 98,8 |
| Neomicina | 1 | 2,2 | — | 0 | — | 0 | 2 | 4,4 | 7 | 15,5 | — | 0 | — | 0 | 10 | 22,1 |
| Cloranfenicol | — | 0 | 1 | 2,2 | 3 | 6,6 | 4 | 9,0 | 1 | 2,2 | — | 0 | — | 0 | 9 | 20,0 |
| Kanamicina | — | 0 | — | 0 | 1 | 2,2 | 2 | 4,4 | 4 | 9,0 | 2 | 4,4 | — | 0 | 9 | 20,0 |

* Resultados não acumulados do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

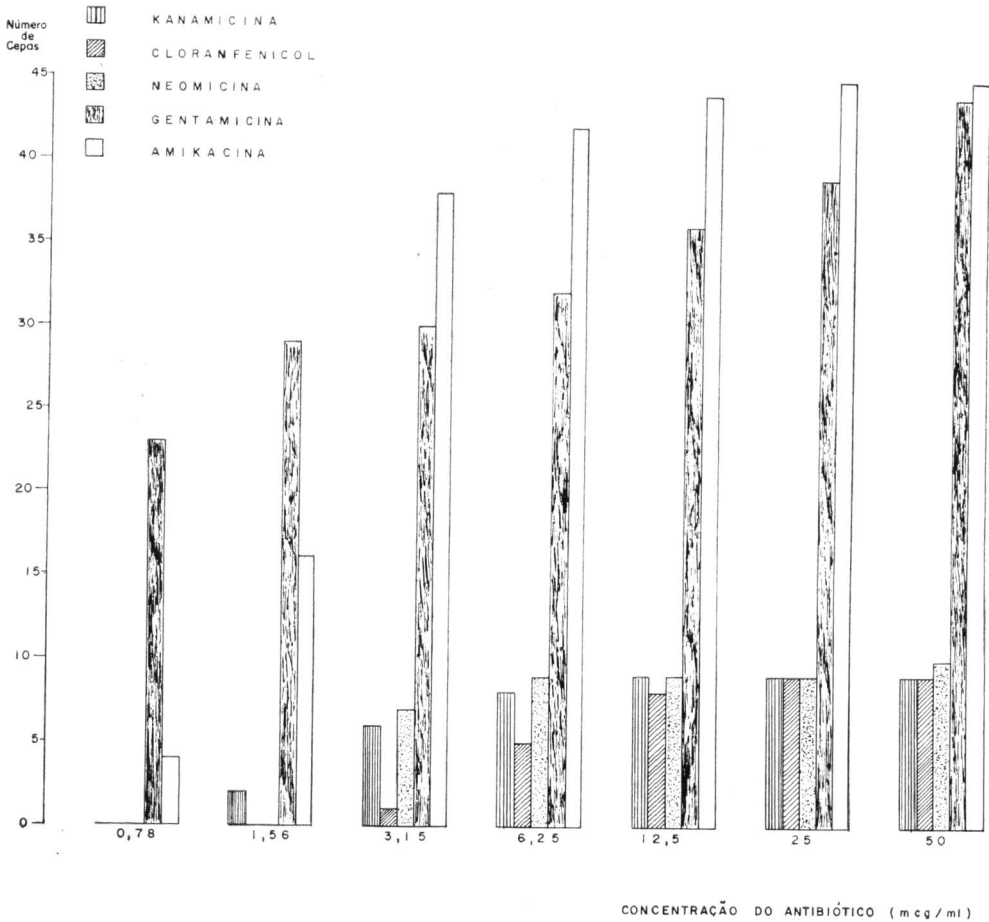


Figura — Resultados acumulativos da sensibilidade de *Escherichia coli* a diferentes antibióticos por Concentração Inibitória Mínima.

LONGO, I. M. et al. [Identification of strains of *Escherichia coli* in stool samples by direct fluorescent antibody tests] *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 14: 199-204, 1980.

ABSTRACT: A study of 121 patients with acute diarrhea was made at the Pediatric Clinic of the Santa Casa de S. Paulo (the S. Paulo Charity Hospital). Etiological diagnosis of 121 cases was carried out through the classical bacteriological method and direct fluorescent antibody tests for the identification of *E. coli*. The antibiotic sensitivity of these bacteria to different antimicrobials was determined by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) method. Fifty-six positive cases were found; 89.3% of which corresponded to different serotypes of enteropathogenic *E. coli* (89.3%), when the direct fluorescent antibody test was used. The classic bacteriological method bared four *Salmonella* strains and two *Shigella*. The MIC showed the *E. coli* to be more sensitive to Gentamicin and Amikacin than to other antibiotics.

UNITERMS: *Escherichia coli*. Fluorescent antibody technic. Bacteriological technics.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DIFCO Laboratories: fluorescent antibody reagents and procedures. Detroit, Mich., 1972. (Difco supplementary literature, 123).
2. LOBOS, H. et al. Bacteriologia de la diarrea aguda del lactante hospitalizado. *Pediatría*, 8:280-6, 1965.
3. MARSDEN, H. & HIDE, W. A. Immunofluorescence in the diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli* infections. *Lancet*, 1:189-91, 1965.
4. MELENDEZ, M. et al. Diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatogênicas em diarreias infantiles por el método de imunofluorescência. *Bol. Inst. bact. Chile*, 15:138-49, 1973.
5. MIMICA, I. M. et al. Estudo da sensibilidade de *Escherichia coli* a diferentes antimicrobianos. *Ciênc. méd.*, S. Paulo, 9(2):38-45, 1976.
6. STEERS, E. & GRAVES, B. S. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot. & Chemother.*, 9: 307-11, 1959.
7. THOMASON, B. M. et al. Rapid presumptive identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in faecal smears by means of fluorescent antibody. 2. Use of various types of swabs for collection and preservation of faecal specimens. *Bull. Wld Hlth Org.*, 25:153-8, 1961.
8. VASQUEZ, D. A. Aplicación de técnicas de anticuerpos fluorescentes a la determinación de coproanticuerpos inducidos por *Escherichia coli*. *Rev. lat.-amer. Microbiol.*, 8:111-8, 1966.

Recebido para publicação em 04/07/1979

Aprovado para publicação em 01/02/1980