

## REVELAÇÃO DE COLIBACILOS ASSOCIADOS AS DIARRÉIAS INFANTIS PELO MÉTODO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL DA ALÇA LIGADA DO INTESTINO DO COELHO

Luiz R. TRABULSI <sup>(1)</sup>

### RESUMO

Foram estudados por essa técnica 27 colibacilos isolados de crianças com diarreia aguda e 23 de crianças normais. Os dois grupos foram subdivididos em colibacilos enteropatogênicos e não-enteropatogênicos, de acordo com os resultados das provas de aglutinação com os soros 026:B6, 055:B5, 086:B7, 0111:B4, 0112:B11, 0119:B14, 0124:B17, 0125:B15, 0126:B16, 0127:B8, 0128:B12 e respectivos soros 0. Um dos três colibacilos enteropatogênicos isolados de normais e 9 dos 11 isolados de doentes provocaram dilatação da alça ligada do intestino do coelho; dos colibacilos não enteropatogênicos, 6 dos 16 isolados de doentes provocaram dilatação da alça ligada do intestino do coelho, não ocorrendo o mesmo com nenhum dos 20 isolados de normais. Os resultados obtidos sugerem que, colibacilos não considerados enteropatogênicos pelo critério sorológico, podem ser causa de diarreia infantil.

### INTRODUÇÃO

Vários trabalhos demonstram estreita correlação entre a ação dos colibacilos na alça ligada do intestino do coelho e a presença ou ausência de diarreia nos pacientes dos quais os mesmos foram isolados. Assim, DE & col.<sup>3</sup>, idealizadores do método, verificaram que elevada percentagem de colibacilos isolados de pacientes adultos com diarreia, possuía a habilidade de dilatar a alça intestinal do coelho, o mesmo ocorrendo apenas, com pequeno número de colibacilos isolados de indivíduos normais. MC NAUGHT & ROBERTS<sup>6</sup> complementaram estes estudos, demonstrando nítida dualidade de ação dos colibacilos considerados enteropatogênicos: aqueles isolados de crianças normais, com algumas exceções, não lesavam, enquanto a

maioria dos isolados de crianças com diarreia determinava inflamação da alça ligada do intestino do coelho. Mais recentemente, TAYLOR & col.<sup>9</sup> chegaram a conclusões semelhantes, demonstrando, ainda, que de numerosos colibacilos isolados de bezerros com diarreia, suínos com enterite, pacientes com infecção urinária e da água, somente alguns dos isolados de bezerros tinham a capacidade de dilatar a alça ligada do intestino do coelho.

No presente trabalho, resumo de nossa tese inaugural<sup>10</sup>, apresentamos os resultados obtidos ao estudarmos, pelo método de DE & col.<sup>3</sup>, 50 amostras de *E. coli* isoladas de crianças normais e com diarreia.

Trabalho realizado com uma bolsa do Instituto Brasileiro de Estudos e Pesquisas em Gastroenterologia.

(1) Assistente do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Diretor: Prof. Carlos da Silva Lacaz).

O objetivo principal do mesmo foi o de verificar se, pelo referido método, seria possível encontrar-se colibacilos associados às diarreias infantis entre aqueles não considerados enteropatogênicos pelo critério sorológico.

#### MATERIAL E MÉTODOS

##### *Colibacilos:*

1. Isolados de crianças sem sintomas de afecção digestiva: (a) 3 colibacilos enteropatogênicos, 2 do grupo 026:B6 e 1 do grupo 0126:B16; (b) 20 colibacilos não enteropatogênicos.

2. Isolados de crianças com diarreia aguda: (a) 11 colibacilos enteropatogênicos, 2 do grupo 026:B6, 2 do grupo 055:B5, 4 do grupo 0111:B4, 2 do grupo 0119:B14 e 1 do grupo 0127:B8; (b) 16 colibacilos não enteropatogênicos.

O isolamento foi feito por semeadura das fezes em placa de Teague e a identificação de acordo com os métodos recomendados por EDWARDS & EWING<sup>4</sup>. A subdivisão em enteropatogênicos e não-enteropatogênicos teve por base os resultados das provas de aglutinação com os soros 026:B6, 055:B5, 086:B7, 0111:B4, 0112:B11, 0119:B14, 0124:B17, 0125:B15, 0126:B16, 0127:B8, 0128:B12 e respectivos soros 0.

Todas as crianças tinham menos de 2 anos.

*Infecção experimental da alça ligada do intestino do coelho* — A técnica utilizada foi, em linhas gerais, a mesma descrita por TAYLOR & col.<sup>8</sup>.

Foram utilizados coelhos adultos, de ambos os sexos, pesando entre 2 e 2,5 kg, provenientes da mesma criação e que haviam permanecido sem alimentação durante 24 horas. O animal era submetido a leve anestesia por éter e o abdome aberto por incisão mediana de aproximadamente 3 cm de comprimento. Identificava-se o íleo e com fio

de algodão 10 preparavam-se 2 a 3 alças, a extremidade distal da primeira ficando aproximadamente a 6 cm da válvula íleo-cecal. Cada alça media 5 cm de comprimento, aproximadamente, e distanciava-se cerca de 10 cm uma da outra. Em seguida injetava-se a cultura nas alças preparadas, colocava-se o intestino na cavidade peritoneal, suturava-se a parede abdominal e fazia-se impermeabilização da ferida cirúrgica com solução coloidal estéril. O processo operatório demorava de 15 a 20 minutos e após 3 a 5, o animal já havia despertado. Ao fim de 20 a 24 horas sem alimentos, mas com água, o animal era sacrificado, a cavidade peritoneal aberta e as alças identificadas. Em cada uma delas verificava-se a presença de dilatação por exsudato, a qual era classificada em uma, duas e três cruzes, de acordo com a intensidade (Fig. 1). Em seguida retirava-se de cada alça, segmento de mais ou menos 1 cm de comprimento para exame histopatológico.

As reações inflamatórias foram classificadas em leves, moderadas e graves.

*Reação inflamatória leve* (Fig. 2): caracterizada por infiltração mononuclear que comprometia às vezes e secundariamente o epitélio, certo grau de edema discreto e produção de muco.

*Reação inflamatória moderada* (Fig. 3): caracterizada pelos mesmos achados, geralmente mais acentuados e acrescidos de destruição do epitélio, descamando para a luz do intestino.

*Reação inflamatória grave* (Fig. 4): acentuado processo inflamatório agudo, com destruição extensa do epitélio e áreas de hemorragia.

A infecção experimental das alças foi feita 48 horas após o isolamento das bactérias, utilizando-se como inóculo, 1 ml da cultura em caldo comum, incubado a 37°C durante 16 a 20 horas.

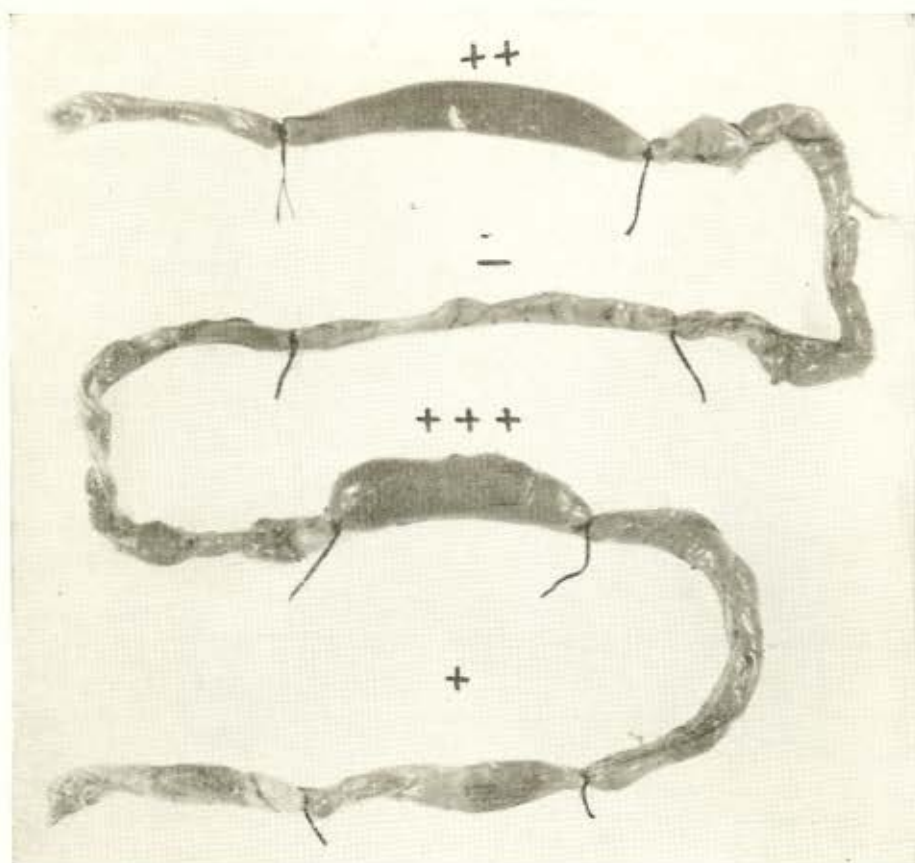


Fig. 1 — Alças ligadas do intestino do coelho mostrando os diferentes graus de dilatação (1, 2 e 3 cruzeiros); vê-se também uma alça não dilatada (sinal —).

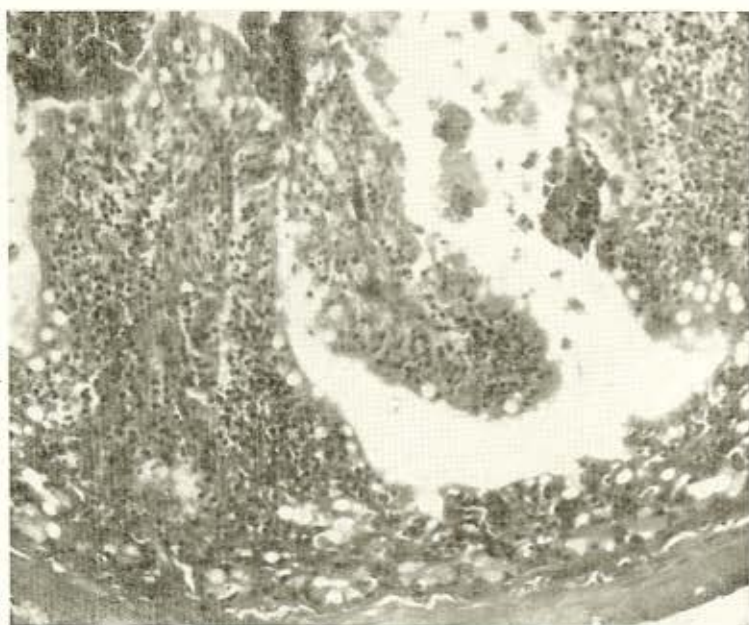


Fig. 2 — Reação inflamatória leve. Infiltração do corium por mononucleares com comprometimento secundário do epitélio. Edema discreto e hipersecreção de muco. H.E. (240x).

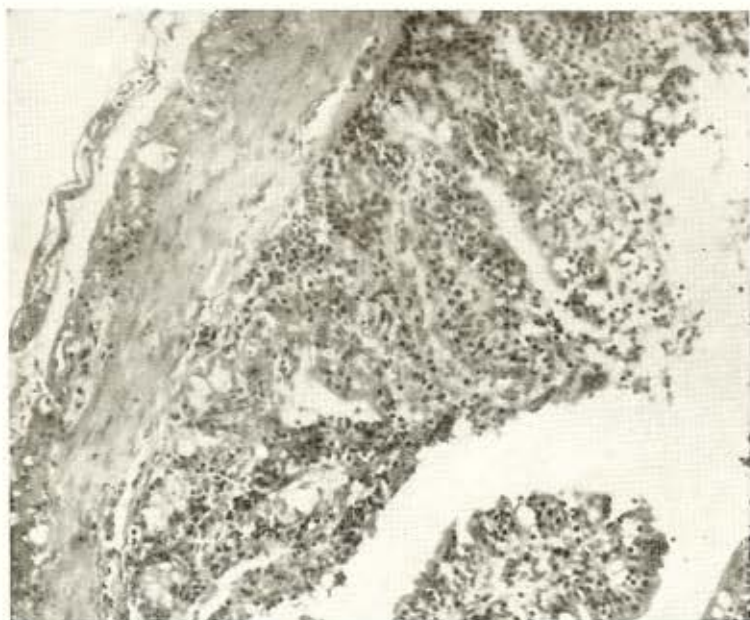


Fig. 3 — Reação inflamatória moderada. Infiltração do corium por mononucleares e neutrófilos, destruição parcial do epitélio que des-cama para a luz. H.E. (240×).



Fig. 4 — Reação inflamatória grave. Acentuado processo inflamatório agudo, com destruição extensa do epitélio. H.E. (240×).

## RESULTADOS

1. *Colibacilos isolados de crianças sem sintomas de afecção digestiva* — a) enteropatogênicos (Quadro I): das 3 culturas, ape-

QUADRO I

Ação de 3 colibacilos enteropatogênicos isolados de crianças normais sobre a alça ligada do intestino do coelho

Amostra	Grupo antigênico	Dilatação	Reação inflamatória
28	026:B6	—	Ausente
29	0126:B16	+++	Grave
34	C26:B6	—	Ausente

nas uma, o colibacilo 0126:B16 lesou o intestino do coelho, provocando dilatação intensa e reação inflamatória do tipo grave; b) não enteropatogênicos (Quadro II): nenhum dos 20 colibacilos provocou dilatação da alça ligada ou provocou reação inflamatória do tipo moderado ou grave. Entretanto, 8 culturas provocaram reação inflamatória leve.

QUADRO II

Ação de 20 amostras de colibacilos não-enteropatogênicos isolados de crianças normais, sobre o intestino do coelho

Amostra	Dilatação	Reação inflamatória
1	Ausente	Leve
2	"	Ausente
3	"	"
4	"	"
10	"	Leve
11	"	"
12	"	Ausente
13	"	"
14	"	Leve
15	"	"
18	"	"
19	"	"
21	"	Ausente
26	"	"
27	"	"
33	"	Leve
35	"	Ausente
45	"	"
46	"	"
48	"	"

2. *Colibacilos isolados de crianças com diarreia aguda* — a) enteropatogênicos: 9 dos 11, provocaram dilatação da alça intestinal, tendo variado de 1 a 3 cruces a intensidade da mesma. As reações inflamatórias, presentes em todos os casos com dilatação, variaram de leves a graves, sem correlação com a intensidade da dilatação. Assim, duas alças com dilatação de 1 cruz apresentaram inflamação moderada; 3 das 4 com dilatação de 2 cruces, apresentaram, também, reação moderada e uma, reação leve; finalmente, das três com dilatação de 3 cruces, duas

QUADRO III

Ação de 11 colibacilos enteropatogênicos isolados de crianças com diarreia sobre a alça ligada do intestino do coelho

Amostra	Grupo antigênico	Dilatação	Reação inflamatória
5	026:B6	+	Moderada
7	0111:B4	+	"
8	055:B5	+	"
20	0111:B4	++	Leve
24	0127:B8	+++	Moderada
25	055:B5	—	Ausente
32	026:B6	+++	Grave
40	0119:B14	++	Moderada
42	0111:B4	+	"
44	0111:B4	+++	"

apresentaram reação moderada e uma, inflamação grave; b) não enteropatogênicos (Quadro IV): dos 16 colibacilos estudados, 6 provocaram dilatação de 2 ou 3 cruces no intestino do coelho e as reações inflamatórias encontradas nas alças dilatadas variaram de leve a grave. Nota-se, também, falta de correlação entre a intensidade dos dois processos. Assim é que, embora as duas dilatações de 2 cruces se acompanhassem de reação inflamatória moderada, uma das quatro dilatações de 3 cruces acompanhou-se de reação leve. Além disto, uma alça não dilatada apresentou o mesmo tipo de inflamação.

#### QUADRO IV

Ação de 16 amostras de colibacilos não-enteropatogênicos isolados de crianças com diarréia, sobre a alça ligada do intestino do coelho

Amostra	Dilatação	Reação inflamatória
6	+++	Grave
9	Ausente	Leve
16	++	Moderada
17	—	Leve
23	Ausente	Ausente
30	+++	Grave
31	Ausente	Ausente
36	"	"
37	"	"
38	"	"
39	++	Moderada
41	Ausente	Ausente
43	"	"
47	+++	Leve
49	+++	Grave
50	Ausente	Ausente

#### DISCUSSÃO

Os resultados apresentados demonstram estreita correlação entre a origem e a ação dos colibacilos sobre o intestino do coelho, uma vez que apenas um (4,3%) dos 23 isolados de "normais", mas 15 (55%) dos 27 isolados de diarréias provocaram dilatação da alça ligada. Esta correlação é válida, mesmo quando subdividimos os colibacilos em enteropatogênicos e não-enteropatogênicos, embora seja pequeno o número dos primeiros, isolados dos normais. Não obstante, observa-se no Quadro I que, dos 3 colibacilos isolados de normais, apenas 1 dilatou o intestino do coelho, ocorrendo o mesmo, porém, com nove (81%) dos 11 isolados de diarréias (Quadro II). Estes resultados são semelhantes aos obtidos por MC NAUGHT & ROBERTS<sup>6</sup>, embora os autores tenham avaliado a ação patogênica de suas culturas

pelos achados histopatológicos das alças ligadas. Verificaram, porém, que aproximadamente 81% dos colibacilos isolados de doentes, mas apenas 9% dos isolados de normais, lesavam de modo mais intenso o intestino do animal. Também TAYLOR & col.<sup>9</sup> verificaram que, de 12 tipos sorológicos de *E. coli* enteropatogênicos isolados de crianças com diarréia, apenas um deixou de dilatar a alça do intestino do coelho. Este, porém, determinou reação inflamatória moderada, com exsudato purulento para a luz da alça. Ao contrário, somente dois de sete outros tipos sorológicos isolados de crianças normais, apresentaram ação semelhante. As duas culturas, porém, haviam sido isoladas de crianças que entraram em contato com doentes portadores das mesmas bactérias.

Considerando-se agora os resultados obtidos com os colibacilos não-enteropatogênicos (Quadros III e IV), verifica-se, também, a correlação mencionada, uma vez que nenhum dos isolados de normais, mas 6 (37%) dos isolados de doentes provocaram dilatação da alça ligada do intestino do coelho. Vários tipos sorológicos de *E. coli*, não pesquisados no presente trabalho, têm sido encontrados em associação com casos de diarréias infantis (ROGERS & CRACKNELL<sup>7</sup>, CHARTER<sup>2</sup>, LINZENMEIER<sup>5</sup>, ABOULDAHAD & col.<sup>1</sup> e outros) e TAYLOR & col.<sup>9</sup> relatam que duas amostras de *E. coli* 078:K80 (*E. coli* considerada não-enteropatogênica), isoladas de crianças com diarréia, tinham a capacidade de dilatar a alça ligada do intestino do coelho, o mesmo não acontecendo com outra *E. coli* do mesmo grupo antigênico, mas isolada de criança normal. Entretanto, a análise antigênica das seis amostras de *E. coli* patogênicas para o intestino do coelho, cujos resultados serão comunicados posteriormente, demonstrou que apenas uma delas já havia sido relacionada à etiologia das diarréias infantis. Deste modo, parece ser mais extensa do que se aceita, a participação da *E. coli* na gênese das diarréias infantis, podendo outros tipos não considerados enteropatogênicos pelo critério sorológico, ser a causa de tais processos.

Com relação aos achados macroscópicos e microscópicos encontrados na alça ligada do intestino do coelho, ficou evidente a falta de correlação entre a intensidade dos mesmos. Entretanto, deixando-se de considerar a reação inflamatória leve, presente em gran-

de número de alças sem dilatação e inoculadas com colibacilos isolados de crianças normais e doentes, verifica-se estreita concordância entre a presença de dilatação e reação inflamatória, no sentido de que, apenas com duas exceções, tôdas as alças dilatadas apresentaram inflamação moderada ou grave. Adotamos, porém, a dilatação como critério de patogenicidade da *E. coli*, porque a mesma não ocorreu nas alças inoculadas com colibacilos não-enteropatogênicos de normais e nas duas exceções mencionadas, havia dilatação e exsudato acentuados, mas foi leve a reação inflamatória. Tal critério explica as ligeiras discordâncias entre os resultados apresentados na tese e no presente trabalho.

#### SUMMARY

*On the detection of E. coli associated to infantile diarrhea by the experimental infection of ligated rabbit-gut segments.*

Ligated loops of rabbit gut have been used to test 50 strains of *E. coli* for their ability to cause dilatation. Twenty three strains were isolated from normal children and 27 from children with acute diarrhea. They were subdivided in enteropathogenic and non-enteropathogenic *E. coli* according to the results of slide and tube agglutination in OB and O sera against the following antigenic groups: 026:B6, 055:B5, 086:B7, 0111:B4, 0112:B11, 0119:B14, 0124:B17, 0125:B15, 0126:B16, 0127:B8 and 0128:B12.

One of three enteropathogenic *E. coli* isolated from normal children and 9 of eleven isolated from children with diarrhea were able to dilate the inoculated loops. On the other hand none of 20 non-enteropathogenic *E. coli* isolated from normal children but 6 of 16 isolated from children with diarrhea had the ability to cause dilatation of the inoculated loops. These results suggest that *E. coli* strains not belonging to the classical group of enteropathogenic *E. coli* might be the cause of infantile diarrhea.

#### AGRADECIMENTO

Consignamos nossos agradecimentos ao Dr. Thales de Brito pelos exames histopatológicos e a Dona Ethel Sandoval Peixoto pelo auxílio que nos prestou na execução do presente trabalho.

#### REFERÊNCIAS

1. ABOUL-DAHAD, Y. W.; TAWIL, G. S. & EL-KHOLY, S. — Response of infantile gastro-enteritis to chloramphenicol. *A.M.A. J. Dis. Child.* 96:348-361, 1958.
2. CHARTER, R. E. — *Escherichia coli* type 0114 isolated from infantile diarrhea and calf scours. *J. Path. & Bact.* 72:33-38, 1956.
3. DE, S. N.; BHATTACHARYA, K. & SARKAR, J. K. — A study of the pathogenicity of strains of the *Bacterium coli* from acute and chronic enteritis. *J. Path. & Bact.* 71: 201-209, 1956.
4. EDWARDS, P. R. & EWING, W. H. — *Identification of enterobacteriaceae*. Minneapolis, Burgess Publ., 1957.
5. LINZENMEIER, G. — Zur Diagnostik von *E. coli* 114 aus Stühlen dyspepsiekranker Säuglinge. *Zentralbl. Bakt., I. Abt., Originale* 177:435-436, 1960.
6. Mc NAUGHT, W. & ROBERTS, G. B. S. — Enteropathogenic effects of strains of *Bacterium coli* isolated from cases of gastro-enteritis. *J. Path. & Bact.* 76:155-158, 1958.
7. ROGERS, G. S. & CRACKNELL, V. M. — Epidemic infantile gastro-enteritis due to *Escherichia coli* type 0114. *J. Path. & Bact.* 72:27-31, 1956.
8. TAYLOR, J.; MALTBY, M. P. & PAYNE, J. M. — Factors influencing the response of ligated rabbit-gut segments to injected *Escherichia coli*. *J. Path. & Bact.* 76:491-499, 1958.
9. TAYLOR, J.; WILKINS, M. P. & PAYNE, J. M. — Relation of rabbit gut reaction to enteropathogenic *Escherichia coli*. *Brit. J. Exper. Path.* 42:43-52, 1962.
10. TRABULSI, L. R. — *Contribuição para o estudo das diarreias infantis pela Escherichia coli. A prova de enteropatogenicidade, em coelho, como recurso na caracterização de possíveis "coli-patogênicos"*. Tese de doutoramento. São Paulo, 1960.

Recebido para publicação em 23 março 1964.