

MARTA BEATRIZ LEONARDO

"AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOHÊMOLISE RADIAL PARA A IDENTIFICAÇÃO DE *Escherichia coli* PRODUTORA DE ENTEROTOXINA TERMOESTÁVEL (LT)".

Orientador: Prof. Dr.

Antonio Fernando Pestana de Castro

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do grau de Mestre.

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Universidade Estadual de Campinas

São Paulo - Brasil

1981

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais,  
Mário Flávio e Maria Leonor,  
a meu esposo, Antonio Carlos  
e a meu filho Davi.

## MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro, pela orientação e ensinamentos científicos que tanto contribuíram para minha formação profissional.

À Profa. Dra. Marlene Braide Serafim que colaborou de maneira valiosa, co-orientando os trabalhos práticos.

Aos professores integrantes da comissão examinadora desta tese, Dr. Antonio Carlos Corsini, Dr. Luiz Cândido de Souza Dias e Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo, pelas sugestões, críticas e correções.

Ao Prof. Dr. Aquiles Eugenio Piedrabuena pela colaboração na análise estatística dos dados.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Imunologia na pessoa do Prof. Dr. Humberto de Araújo Rangel e aos demais Professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pelos conhecimentos científicos e por me propiciarem as condições de realização deste curso.

Ao Prof. Marcos Garcia Costa, pelo auxílio valioso prestado na concretização deste trabalho.

À Amélia Rosa Monteiro, pela imprescindível e eficiente ajuda na execução dos experimentos.

À Maria Célia Giorgi Almeida pelo cuidadoso trabalho datilográfico.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação e aos demais amigos e funcionários deste Departamento pelo agradável convívio, colaboração e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) da qual fui bolsista durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradecemos às seguintes Instituições pelos recursos fornecidos ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Estadual de Campinas:

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE  
NÍVEL SUPERIOR - CAPES

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE  
SÃO PAULO - FAPESP

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍ-  
FICO E TECNOLÓGICO - CNPq

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (DIVISÃO DE IMU  
NOLOGIA)

BIBLIOTECA REGIONAL DE MEDICINA

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	9
2.1 - LINHAGENS .....	9
2.2 - REAGENTES .....	9
2.2.1 - ANTISORO .....	9
2.2.2 - COMPLEMENTO .....	11
2.2.3 - HEMÁCIAS DE CARNEIRO .....	11
2.2.4 - PREPARO DAS ENTEROTOXINAS .....	11
2.2.5 - FONTES COMERCIAIS DE OUTROS REAGENTES .....	13
2.3 - TESTE EM CÉLULAS Y-1 .....	13
2.4 - TESTE DA IMUNOHEMÓLISE PASSIVA (PIH) .....	14
2.5 - TESTE DA IMUNOHEMÓLISE RADIAL (SRIH) .....	15
2.5.1 - PREPARO DAS LÂMINAS .....	15
2.5.2 - PREPARO DA AGAROSE .....	15
2.5.3 - TESTE .....	15
2.6 - TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS .....	17
3. RESULTADOS .....	18
3.1 - AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ENTEROTOXIGÊNICA DE AMOSTRAS DE <i>E. coli</i> PELOS TESTES DA PIH E EN- SAIO EM CÉLULAS DA LINHAGEM Y-1 .....	18
3.2 - PADRONIZAÇÃO DO TESTE DA SRIH .....	23
3.2.1 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE HEMÁCIAS .....	23
3.2.2 - COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES DA SRIH E PIH .....	23

3.2.3 - INFLUÊNCIA DA DILUIÇÃO DO ANTISORO (ANTITOXINA COLÉRICA) .....	26
3.2.4 - INFLUÊNCIA DA DILUIÇÃO DO ANTÍGENO (ENTEROTOXINA LT) .....	28
3.2.5 - INFLUÊNCIA DO TEMPO DE DIFUSÃO DO ANTISORO (ANTITOXINA COLÉRICA).....	30
3.3 - COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES DA SRIH E PIH NA DETECÇÃO DE ENTEROTOXINA LT PRODUZIDA POR OUTRAS AMOSTRAS DE COLIBACILOS ENTEROTOXIGÊNICOS ....	34
3.4 - AVALIAÇÃO DO TESTE DA SRIH NA DETECÇÃO DA ENTEROTOXINA LT PRODUZIDA EM CULTURAS ESTACIONÁRIAS .....	37
3.5 - AVALIAÇÃO DO TESTE DA SRIH NA DETECÇÃO DE ENTEROTOXINA LT EM SOBRENADANTES DE CULTURAS NÃO SUBMETIDAS AO TRATAMENTO PELA POLIMIXINA .....	40
4. DISCUSSÃO .....	44
5. RESUMO .....	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59

## 1. INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* é reconhecida atualmente como um dos principais agentes envolvidos na etiologia da diarréia em seres humanos e em animais. A partir do ano de 1940, surgiram uma série de epidemias em berçários dos quais foram isoladas amostras de *E. coli* que através de estudos sorológicos demonstrou-se ocorrer em baixa frequência em crianças e adultos normais, sendo porém de prevalência bastante alta nestes surtos de diarréias (28). A esses sorogrupos inicialmente descritos, por exemplo O<sub>111</sub> e O<sub>55</sub>, foram acrescentados outros que fazem hoje parte de um grande grupo de colibacilos enteropatogênicos, ditos clássicos, cujos fatores de virulência ainda não são conhecidos, com relação a maioria dos sorogrupos nele enquadrados.

Mais recentemente, foram elucidados dois outros mecanismos de enteropatogenicidade: invasão da mucosa (10, 28) e produção de enterotoxinas no lúmen intestinal (10,



27).

Interessam-nos de perto, no presente trabalho, as *E. coli* enterotoxigênicas que são tidas como causa comum da doença diarréica em várias partes do mundo, tanto no homem, como em animais (10, 27, 28).

Duas toxinas são produzidas por estes microrganismos: uma, é um péptide termoestável (ST), não antigênico, de baixo peso molecular, entre 1000 e 10000 daltons (1), que parece estimular a secreção de líquidos celulares via ativação da enzima *guanil-ciclase*, aumentando os níveis do monofosfato de guanosina cíclico (GMPC) intracelular (20, 25); e a outra, é termolábil (LT), de natureza proteica, antigênica, com alto peso molecular (8). Esta última causa secreção intestinal de maneira semelhante a toxina do *Vibrio cholerae* pela ativação da enzima *adenil-ciclase*, aumentando os níveis do monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) intracelular; além disso, adsorvem-se ao mesmo receptor celular, o gangliosídeo GM<sub>1</sub> (2, 15, 22, 28).

Quanto aos aspectos físicos, químicos e antigênicos, a enterotoxina LT é semelhante, se não idêntica a toxina colérica, sendo constituída também por duas subunidades (designadas A e B), sendo as mesmas imunologicamente distintas entre si (6, 7, 8).

Os mecanismos pelos quais o aumento do GMPC e AMPC intracelulares ocasionam o extravasamento de líquido para a luz intestinal ainda não estão perfeitamente esclarecidos (2, 15, 20, 25).

As diarreias produzidas por *E. coli* enterotoxigênicas têm se correlacionado com a capacidade destes microrganismos colonizarem o intestino delgado dos indivíduos doentes, através da adesão ao epitélio, sem invasão do tecido (12, 13, 14). Esta capacidade é conferida por antígenos termolábeis, chamados antígenos de aderência ou fatores de colonização, com morfologia do tipo fímbria, associados a superfície da bactéria (35). Ambos os caracteres, isto é, produção de enterotoxinas e a existência dos antígenos de aderência, são codificados por plasmídeos (12, 23, 29, 30, 35).

A enterotoxina ST é normalmente investigada pelo teste do camundongo recém-nascido, visto que o teste de alça ligada de coelho ou de outros animais tem mostrado grande variação na obtenção dos resultados (19). Ambos os testes baseiam-se na capacidade desta enterotoxina induzir um aumento no volume de líquido intestinal.

Até recentemente, somente os testes biológicos eram disponíveis para se detectar a enterotoxina LT de *E. coli*. Um destes testes, o da alça ligada de coelho, para este tipo de enterotoxina tem dado resultados satisfatórios. Este teste consiste em se injetar preparações de enterotoxina diretamente em alças ligadas de intestino de coelho que devem pesar em média 1,8 Kilogramas. Após 18 a 24 horas, mede-se o acúmulo de fluido resultante da ação da enterotoxina, através da relação entre volume de líquido (em mililitros) e comprimento da alça (em centímetros). Relações iguais ou superiores a 0,4 são consideradas positi-

vas (11).

A pesquisa do fator de permeabilidade capilar (PF), também bastante utilizada para a detecção de LT, consiste em se injetar, intradermicamente, os sobrenadantes das culturas em estudo na pele de coelhos. Vinte e quatro horas após, faz-se uma injeção intravenosa de Azul de Evans, que devido ao aumento de permeabilidade capilar ao nível da injeção da enterotoxina vai extravasar para o tecido, conferindo ao mesmo uma coloração azulada após 1 ou 2 horas. Paralelamente, mede-se o endurecimento do edema existente no local.

As dificuldades de se usar ambos os modelos relacionam-se principalmente ao custo dos animais e a presença ocasional de reações falso-positivas e falso-negativas. Também se faz necessário repetir o teste em três coelhos diferentes para cada amostra em virtude dos resultados serem irregulares. Com relação ao teste do PF tem-se apontado o tamanho do coelho como um fator importante: coelhos maiores (4,0 a 4,5 kg) reagem menos a enterotoxina LT do que os menores (1,5 a 2,0 kg) (16).

Atualmente, os laboratórios especializados têm dado preferência aos ensaios em cultura de tecido, para a detecção da enterotoxina LT. Estes testes baseiam-se na capacidade desta enterotoxina induzir alterações morfológicas em células de tumor de adrenal de camundongo de linhagem Y-1 (9), em células de ovário de hamster (22), e em células VERO (34). Estas três linhagens celulares mostram-se

bastante sensíveis a esta enterotoxina, sendo vantajosas para diagnóstico de rotina, pela especificidade e rapidez dos testes com elas realizados.

Além dos ensaios em cultura de tecido, a enterotoxina LT pode ser detectada por uma variedade de testes sorológicos. Estes, baseiam-se, via de regra, na reação cruzada entre LT de *E. coli* e a toxina do *V. cholerae*. Alguns deles são analisados a seguir:

A - RADIOIMUNOENSAIO (RIA). Neste teste descrito por GREEMBERG e col., em 1977 (21), a toxina é adicionada nos orifícios previamente recobertos com antitoxina colérica, de placas tipo microtítulo. Após várias lavagens e incubação a temperatura ambiente com tampão apropriado, uma quantidade padronizada de antitoxina colérica marcada com  $^{125}\text{I}$  é acrescentada. Seguindo um período de incubação a  $37^{\circ}\text{C}$ , as placas são novamente lavadas com tampão, os orifícios são cortados e levados a um contador gama para análise. Esta técnica apresenta várias vantagens sobre as de cultura de tecido. É mais sensível quando comparado com o teste em células da linhagem Y-1, não apresenta problemas relativos a contaminação e viabilidade das culturas celulares e os resultados obtidos são mais facilmente quantificáveis. Porém, requer reagentes radioativos e um sistema de detecção caros.

B - TESTE DE ELISA ("ENZYMELINKED IMMUNOSORBENT ASSAY"). Descrito por YOLKEN e col. (37), mostrou-se tão sensível como RIA. Na técnica de ELISA uma enzima (peroxidase

ou fosfatase) é acoplada a uma imunoglobulina da classe IgG dirigida contra o antígeno que se está procurando detectar, no nosso caso, a enterotoxina LT. As reações são feitas em placas tipo microtítulo, em cujos orifícios se adicionam preparações (sobrenadantes de culturas), nas quais procura-se identificar a presença de enterotoxina. A enterotoxina, bem como outras proteínas, ligam-se inespecificamente ao polivinil, substância com a qual são feitas as placas de microtítulo. Após lavagem com tampões especiais, são colocadas quantidades apropriadas de IgG marcada com enzimas. Após permanência de 1 hora a 37° C, é feita nova lavagem adicionando-se em seguida o substrato específico. Para o caso da fosfatase utiliza-se p-nitrofenil fosfato. Ocorrendo a reação entre o antígeno e a IgG marcada, com adição do substrato, ocorrerá uma modificação de cor devida a atuação da enzima sobre o substrato. Esta técnica, embora largamente utilizada em outros países, em nosso caso tem encontrado algumas limitações, para o fim específico, não só por requerer drogas e reagentes caros, como também pelo fato de não ter sido ainda convenientemente adaptada pelos nossos laboratórios que se dedicam a detecção de amostras de *E. coli* enterotoxigênica.

C - TESTE DA IMUNOHEMÓLISE PASSIVA (PIH). Descrito por EVANS e col. (17), utiliza sobrenadantes de culturas crescidas em meio de casaminoácido e extrato de levedura (CAYE), tratados pelo antibiótico polimixina B que, por atuar a nível de membrana, promove uma maior liberação de enterotoxina LT contida no espaço periplásmico da célula

bacteriana. Esta toxina se adsorve às membranas das hemácias de carneiro quando incubadas em quantidades apropriadas a 37° C. Com a adição de soro anti-LT e complemento, estes eritrócitos sensibilizados são lisados. Após centrifugação, a leitura da reação é realizada espectrofotometricamente, a 420 nm.

D - TESTE DE COAGLUTINAÇÃO ESTAFILOCÓCICA. Descrita por BRILL e col. (4), utiliza a proteína A extraída da superfície de algumas cepas de *Staphylococcus aureus* como ligante para a fração F<sub>C</sub> de IgG específico, no caso, anti-cólera. Deste modo, suspensões de estafilococos sensibilizados com antitoxina colérica, são aglutinados por sobrenadantes de culturas contendo enterotoxina.

E - TÉCNICA DA IMUNOHEMÓLISE RADIAL (SRIH). Esta técnica vem sendo bastante utilizada para a determinação sérica de anticorpos contra diversos antígenos virais, tais como, vírus da rubéola (18), e vírus de influenza (31). Este teste tem sido considerado como de considerável valor potencial no diagnóstico sorológico e nos levantamentos epidemiológicos da influenza (31). Resumidamente, nesta técnica, eritrócitos sensibilizados com o antígeno contra o qual está se procurando uma resposta sorológica, adicionados a um gel (agarose), são hemolizados pela adição de anticorpo específico e complemento.

Uma técnica de Imunohemólise Radial, em placas de Petri, foi descrita para se detectar mutantes hipotoxigênicos de *E. coli* (3) e *V. cholerae*, mas não foi feita, até o

presente, nenhuma tentativa de se adaptar deste teste à identificação de colibacilos enterotoxigênicos, na rotina bacteriológica. Considerando que ao avaliar a atividade hemolítica do anticorpo IgG, WEILER e col., em 1965 (38), demonstraram a existência de uma relação linear entre a área de hemólise e o logarítmo da concentração do antisoro, este teste pode ser viabilizado.

As considerações acima quanto as dificuldades inerentes a cada um dos testes até agora utilizados, justificam, pois, este trabalho, que teve como objetivo principal relatar e avaliar uma adaptação do teste de Imunohemólise Radial para a detecção de colibacilos enterotoxigênicos produtores de LT.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Linhagens de *E. coli*

Linhagens de origem humana, provenientes da Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brasil, e de origem suína obtidas em nosso laboratório, foram utilizadas para a realização deste trabalho. A designação das amostras estudadas, com as respectivas origens e características quanto a enterotoxigenicidade se encontram na Tabela 1.

### 2.2 - Reagentes

2.2.1 - Antisoro - A antitoxina colérica liofilizada preparada pelo "Swiss Serum and Vaccine Institute" foi generosamente cedida pelo Dr. Carl E. Miller, "Enteric Diseases Program Officer, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA". Para a realização dos experimentos, a antitoxina colérica foi reconstituída em água desti-



TABELA 1 - Origem, propriedades enterotoxigênicas e procedência das linhagens de *E. coli* estudadas.

Proveniência	Linhagens	Enterotoxigenicidade	
Suíno com diarreia <sup>a</sup>	306, 339, 2423, 3406, A, 406	LT <sup>+</sup>	ST <sup>-</sup>
	446	LT <sup>-</sup>	ST <sup>-</sup>
Água de Rio <sup>b</sup>	36, 153	LT <sup>+</sup>	ST <sup>-</sup>
Crianças com diarreia <sup>b</sup>	156/2, 13/D, 05/75, 2161	LT <sup>+</sup>	ST <sup>-</sup>
	Crianças sem diarreia <sup>b</sup>	73/1, 82/2, 269/7	LT <sup>+</sup>
	150/2	LT <sup>-</sup>	ST <sup>+</sup>
Adulto com diarreia <sup>b</sup>	38, 19927	LT <sup>+</sup>	ST <sup>+</sup>
Controle positivo <sup>b</sup>	40T	LT <sup>+</sup>	ST <sup>+</sup>
Controle negativo <sup>c</sup>	711 nal ( <i>E. coli</i> K <sub>12</sub> )	não enterotoxigênica	

a. Linhagens isoladas em nosso laboratório (Depto. de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil).

b. Linhagens fornecidas por L. R. Trabulsi, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brasil.

c. Linhagem fornecida por C. L. Gyles, University of Guelph, Ontario, Canadá.

lada como recomendado, sendo, a seguir, diluída a 1:10 em solução de NaCl 0,15 M (solução salina). Após inativação a 56° C, por 30 min., a antitoxina foi absorvida três vezes com hemácias de carneiro.

2.2.2 - Complemento - O sangue individual de várias cobaias (mínimo de 20 animais) foi coletado em tubos de vidro 20 X 200 mm, incubado a 37° C, por 15 min. e o soro de cada tubo foi coletado e centrifugado separadamente. Os soros obtidos foram em seguida misturados, separados em alíquotas (0,5 ml) e mantido em congelador a -70° C até o momento do uso.

A titulação de complemento nas diferentes amostras de soro foi realizada segundo as condições descritas por MAYER (26) revelando um título médio de  $340 \pm 34,78$  unidades  $CH_{50}$ /ml.

2.2.3 - Hemácias de Carneiro - As hemácias de carneiro foram coletadas em solução de Alsever estéril, mantidas a 4° C e utilizadas num período compreendido entre o 4º e o 45º dia após a coleta.

2.2.4 - Preparo das Enterotoxinas - O preparo das enterotoxinas extraídas pela polimixina foi realizado de acordo com o descrito por EVANS e col. (16). As amostras foram semeadas em frascos Erlenmeyers de 125 ml contendo 10 ml de meio de CAYE (16). Após 18 horas de incubação a 37° C, sob agitação (150 rpm), a cada 10 ml de cultura foi adicionado 1 ml de solução de polimixina (2,2 mg/ml) em so-

lução salina tamponada de fosfatos (PBS) 0,04 M, pH 6,7. Após 15 min. de agitação adicionais, na mesma temperatura, os sobrenadantes das culturas foram recuperados por centrifugação e examinados concomitantemente pelos testes da PIH e SRIH.

Para a realização do teste em células da linhagem Y-1, os sobrenadantes não foram submetidos ao tratamento pela polimixina.

A fim de simplificar ainda mais o teste da SRIH, foi de interesse verificar se o tratamento ou não pela polimixina B alteraria a quantidade de enterotoxina LT encontrada no sobrenadante. Para este propósito, 2 amostras humanas (156/2 e 05/75) e uma suína (3406), foram cultivadas sob agitação, não sendo submetidas ao tratamento pela polimixina B, e os sobrenadantes comparados, pelos testes da SRIH e PIH, àqueles provenientes de culturas tratadas por este antibiótico.

No presente estudo, foram realizadas com algumas das amostras por nós utilizadas, culturas estacionárias (5) para se verificar se a produção de enterotoxina LT nessas condições era detectável pelo teste da SRIH. As amostras foram semeadas em frascos Erlenmeyers de 500 ml contendo 5 ml de meio de CAYE, incubadas por 24 horas em estufa a 37° C, sendo adicionado ao final deste tempo, 0,5 ml de solução de polimixina. Após 15 min., a 37° C, as culturas foram centrifugadas, e os sobrenadantes coletados e mantidos em congelador a -20° C até o momento do uso.

### 2.2.5 - Fontes Comerciais de Outros Reagentes -

Casaminoácido, Extrato de Levedura, meio F<sub>10</sub>, Tripsina, EDTA, Bicarbonato de Sódio da DIFCO LAB; Cloreto de Sódio, Ácido 5,5 dietilbarbitúrico, 5,5 dietilbarbiturato de Sódio, Fosfato Bibásico de Potássio, Cloreto de Cálcio, Cloreto de Manganês, Cloreto de Magnésio da MERCK; Cloreto Férrico e Glicose da REAGEN; Sulfato de Magnésio da M. & B. LABORATORY CHEMICALS; Gentamicina da SHERING S/A; Fungizona da SQUIBB; Agarose da SIGMA CHEMICAL CO.; Polimixina B da WELLCOME RESEARCH LABORATORIES.

### 2.3 - Teste em células Y-1

A investigação de LT pelo teste em células Y-1 foi executado de acordo com os procedimentos recomendados por DONTA (9).

Em placas de fundo chato apropriadas para cultura de tecido foram adicionados 0,25 ml de uma suspensão celular de linhagem Y-1 em meio F<sub>10</sub> contendo 2000 células/ml. Após incubação por 24 horas, a 36° C, 25 µl da toxina a ser testada foram acrescentados a cada orifício. As placas foram então incubadas por 6 horas, a 37° C, procedendo-se em seguida a leitura. Aqueles orifícios em que se encontrou 50% ou mais de arredondamento celular em relação ao controle negativo corresponderam a reações positivas para a produção de enterotoxina LT.

#### 2.4 - Teste da Imunohemólise Passiva (PIH)

A execução do teste da PIH foi semelhante a descrita por EVANS & EVANS (17) com a exceção da salina tamponada veronal (VBS) adicionada de 1,5 ml de uma solução de cloreto de cálcio 0,1 M e 5 ml de cloreto de magnésio 0,1 M por litro de Tampão que foi usado ao invés de PBS. Foi verificado que esta modificação tornava o teste muito mais sensível (5).

A suspensão de hemácias de carneiro a ser utilizada neste teste foi padronizada de tal maneira que quando diluída 1:20 em água destilada e lida em espectrofotômetro (COLEMAN Jr) a 550 nm, desse uma absorbância de 0,42, que corresponde a 420 nm a absorbância 1,3. Esta leitura, de acordo com testes preliminares, indicava que a suspensão de hemácias continha  $2 \times 10^9$  células/ml.

A antitoxina colérica foi utilizada na diluição 1:80 conforme resultados preliminares (32).

O complemento foi utilizado na diluição 1:10 conforme recomendado por EVANS & EVANS (17).

Extratos de polimixina de culturas LT positiva e LT negativa foram incluídos como controles do teste da PIH. Além destes, para corrigir eventuais fenômenos de hemólise inespecífica, tubos contendo os seguintes reagentes foram incluídos como controles:

- a. Hemácias de carneiro, extrato em teste, tampão veronal;

- b. Hemácias de carneiro, extrato em teste, tampão veronal, complemento;
- c. Hemácias de carneiro, tampão veronal, antisoro e complemento.

## 2.5 - Teste da Imunohemólise Radial (SRIH)

2.5.1 - Preparo das Lâminas - Lâminas para microscopia comuns foram fervidas em uma solução de fosfato trissódico (5/gr/ml) por 30 min. À seguir, as lâminas foram lavadas em água de torneira (10 vezes) e então colocadas em uma solução de ácido clorídrico (250 ml/20 litros de água destilada). A lavagem com água de torneira foi repetida várias vezes, seguida de lavagem com água destilada (10 vezes). Após secagem em estufa a 56° C por 2 horas, as lâminas tiveram uma de suas superfícies cobertas com agarose 1%.

2.5.2 - Preparo da Agarose - Agarose foi diluída em VBS mais íons  $Ca^{++}$  e  $Mg^{++}$  conforme descrito anteriormente a pH 7,4 (18) em uma concentração final de 1%. O gel foi fundido por aquecimento e então distribuído em tubos de vidro de 5 ml (2,7 ml/tubo) e resfriado a 45° C em banho-maria.

2.5.3 - Teste - A execução do teste da Imunohemólise Radial foi semelhante àquela descrita para a detecção de anticorpos anti-rubéola (18).

As hemácias de carneiro foram lavadas três vezes com VBS e então diluídas no mesmo tampão em uma concentração de 10%. Para a sensibilização das hemácias, 1 ml do extrato de polimixina ou sobrenadantes provenientes de culturas crescidas em meio de CAYE foi adicionado a um igual volume da suspensão de hemácias. As misturas foram incubadas em banho-maria a 37° C por 30 min., centrifugadas, sendo o sedimento ressuspenso no mesmo tampão a uma concentração final de 5% de hemácias. Volumes de 0,3 ml de cada preparação de hemácia sensibilizada foram adicionados em cada tubo de agarose (45° C), sendo os conteúdos dos tubos agitados vigorosamente para homogeneização sendo em seguida colocados sobre as lâminas.

Após a solidificação das suspensões, foram feitos 2 orifícios sobre o suporte agarose-hemácia sensibilizada, distantes um do outro aproximadamente 2,5 cm, tendo cada um o diâmetro de 5 mm. Estes orifícios foram feitos na linha mediana do comprimento longitudinal da lâmina. Em cada orifício foram adicionados 25 µl de anti-toxina colérica em diferentes diluições a saber: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 e 1:160. As lâminas foram mantidas a 4° C por 24 horas ou 48 horas. Após este tempo, 2 ml de soro de cobaia (complemento) diluído a 1:10 em tampão veronal foram pipetados sobre a superfície do gel. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37° C por 6 horas. O excesso de complemento foi então removido e os diâmetros dos halos de hemólise medidos em milímetros.

## 2.6 - Tratamento Estatístico dos Dados

O cálculo do Fator de Correlação ( $r$ ) foi realizado segundo o método dos quadrados mínimos e o do Intervalo de Confiança (IC) a partir do Desvio Padrão da Regressão estabelecido o limite de confiança de 5% pelo teste de STUDENT (33).



### 3. RESULTADOS

3.1 - Avaliação da capacidade enterotoxigênica de amostras de *E. coli* pelos testes da PIH e ensaio em células da linhagem Y-1.

Visto que um dos objetivos do nosso trabalho era avaliar a sensibilidade e especificidade do teste da SRIH como método de detecção da enterotoxina LT, havia necessidade da capacidade enterotoxigênica das amostras de colibactérios a serem utilizadas neste estudo ser determinada por testes já padronizados e de uso corrente, no caso, o teste da PIH e o ensaio em células Y-1 (Tabela 2).

Estes resultados mostram que o teste da PIH, nas condições de realização do mesmo é mais sensível na detecção de enterotoxina LT do que o ensaio em células Y-1. Por este motivo, e considerando-se que o teste da PIH é também uma reação de imunohemólise, achamo-lo mais adequado

TABELA 2 - Capacidade enterotoxigênica de colibacilos de origem humana e suína pelo teste da PIH e ensaio em células de linhagem Y-1.

Amostras	Título		Capacidade Enterotoxigênica <sup>f</sup>
	PIH	Y-1	
05/75 <sup>a</sup>	4 <sup>c</sup>	2 <sup>d</sup>	B
36 <sup>a</sup>	16	2	I
156/2 <sup>a</sup>	16	2	I
49T <sup>a</sup>	128	16	F
339 <sup>b</sup>	4	8	B
3406 <sup>b</sup>	4	8	B
2423 <sup>b</sup>	16	2	I
controle (K <sub>12</sub> ) <sup>a</sup>	- <sup>e</sup>	-	-
meio de Evans	-	-	-

a. Origem humana.

b. Origem suína.

c. Recíproco da maior diluição de sobrenadantes de cultura que causou no teste da PIH uma hemólise correspondente a  $A_{420} > 0,17$  ( $> 30 \mu\text{g}$  de hemoglobina liberada).

d. Recíproco da maior diluição de sobrenadantes de cultura que provocou 50% ou mais de arredondamento em células Y-1 em relação ao controle negativo (*E. coli* K<sub>12</sub>).

e. Negativo.

f. Vide texto

para ser escolhido como método comparativo na avaliação e padronização do teste da SRIH. Assim sendo, no teste da PIH, à despeito das medidas apresentadas referentes às leituras de absorvância superiores a 0,7 serem de pouca significância, devido a menor sensibilidade do aparelho nesta faixa, as amostras foram classificadas em 3 grupos, conforme o título expresso como a maior diluição da toxina que causa no teste da PIH uma hemólise correspondente a  $A_{420} > 0,17$  ( $> 30 \mu\text{g}$  hemoglobina liberada) (Tabela 2).

Grupo I - fortemente toxigênica (F);

Grupo II - toxigenicidade intermediária (I);

Grupo III - baixa toxigenicidade (B).

Desta maneira, entre os colibacilos de origem humana, a amostra 40T acha-se incluída no grupo I, sendo de toxigenicidade intermediária (grupo II) as amostras 36 e 156/2 e de baixa toxigenicidade (grupo III) a amostra 05/75. Uma representação gráfica da capacidade toxigênica destas amostras, avaliadas pelo teste da PIH, acha-se na Figura 1.

Com relação as amostras de origem suína, a Figura 2 ilustra o comportamento das mesmas, sendo a amostra 2423 incluída no grupo II (toxigenicidade intermediária) e as amostras 3406 e 339, inseridas no grupo III (baixa toxigenicidade).

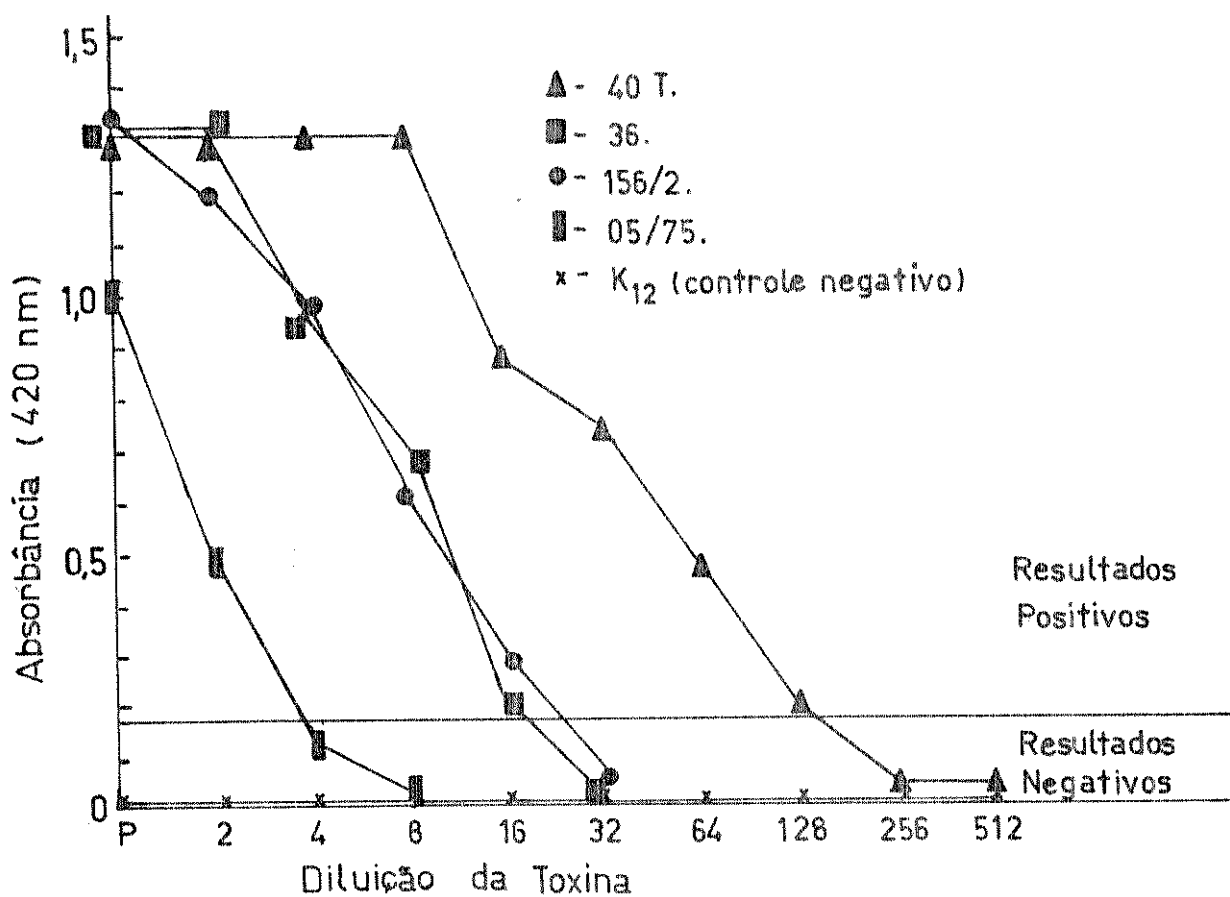


FIGURA 1 - Comportamento das amostras de *E. coli* enterotoxigênica de origem humana no teste da PIH.

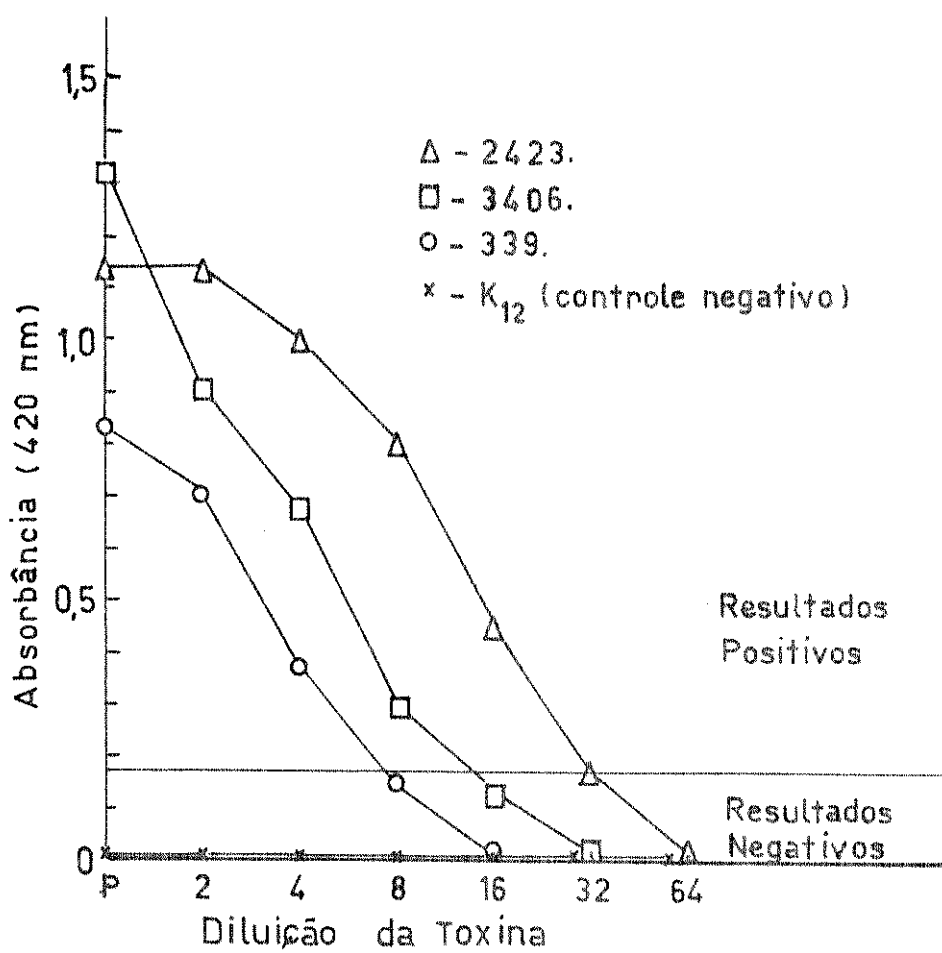


FIGURA 2 - Comportamento das amostras de *E. coli* enterotoxigênicas de origem suína no teste da PIH.

### 3.2 - Padronização do teste da SRIH

3.2.1 - Influência da concentração de hemácias - O estudo sobre o efeito da concentração de hemácias sobre o diâmetro e a transparência dos halos de hemólise, demonstrou que uma variação na concentração final de eritrócitos, entre 0,5% e 0,125%, não modificava o tamanho desses halos. Contudo, quanto menor a concentração de hemácias, mais difícil se tornava a distinção entre a transparência dos halos de hemólise e o fundo avermelhado da lâmina conferido pelos glóbulos vermelhos. Com base nestes resultados, utilizou-se suspensões de hemácias sensibilizadas a 5%, de tal modo que, quando diluídas em agarose, para o preparo da lâmina, a concentração final fosse de 0,5%. Ressalte-se todavia, que com a concentração final de 1% de hemácias se obtinha leituras semelhantes às aquelas conseguidas com 0,5%. Diante desta similaridade, optou-se pela concentração mais baixa com o objetivo evidente de se evitar um gasto desnecessário de glóbulos vermelhos.

3.2.2 - Comparação entre os testes da SRIH e PIH - Devido a sua alta toxigenicidade evidenciada pelo teste da PIH e pelo ensaio em células Y-1, a amostra de *E. coli* 40T, de origem humana, foi selecionada para este estudo comparativo. Assim sendo, foram realizados testes da PIH e SRIH utilizando diferentes diluições de sobrenadantes de culturas desta amostra, frente a várias diluições de antitoxina colérica. A absorvância a 420 nm (Figura 3) bem como a quantidade de hemoglobina liberada (Figura 4) encontradas

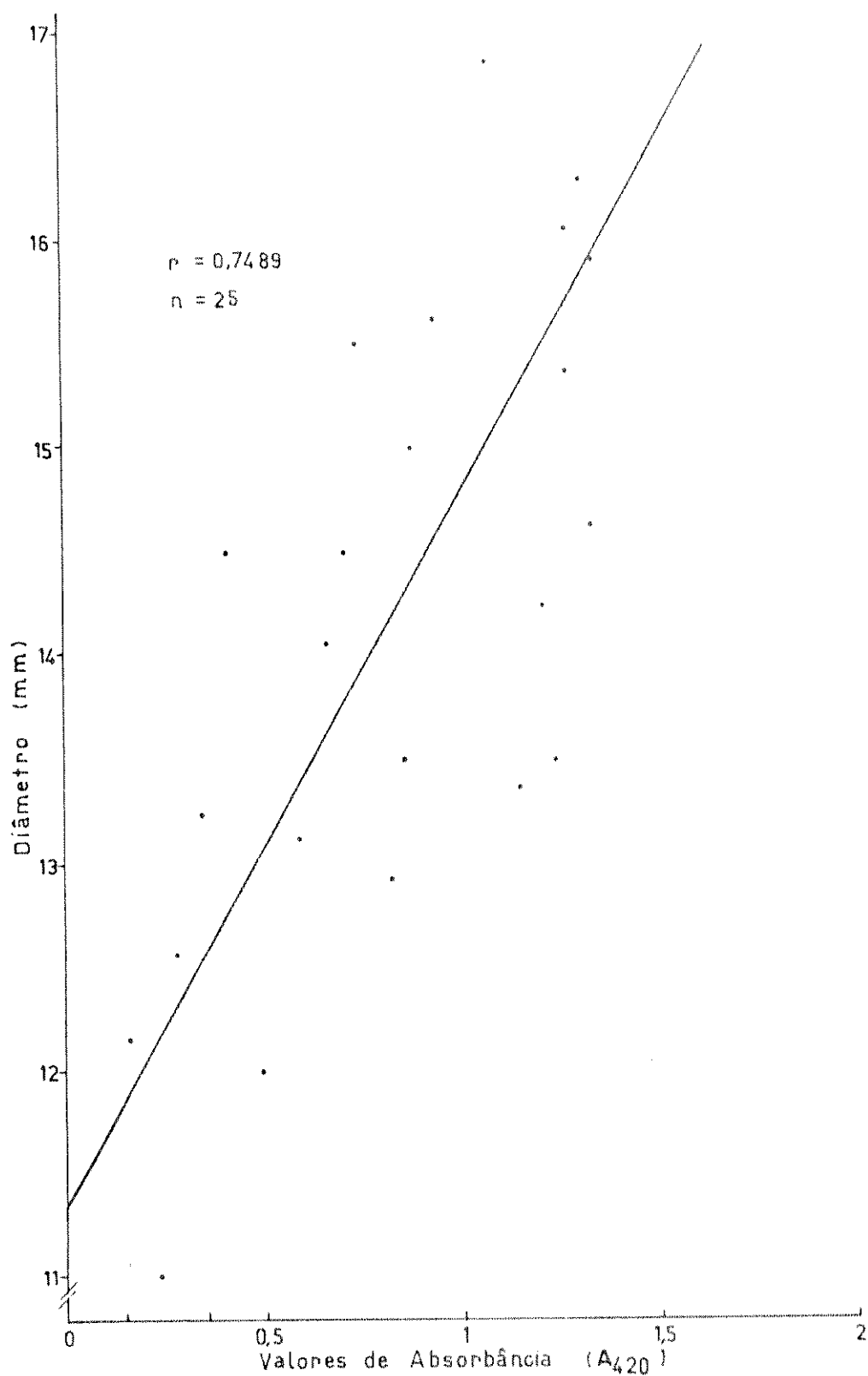


FIGURA 3 - Correlação entre o teste da PIH (Absorbância a 420 nm) e da SRIH (diâmetro em mm do halo de hemólise) no ensaio de diferentes diluições de enterotoxina preparada com a amostra 40 T frente a várias diluições de antitoxina colérica.

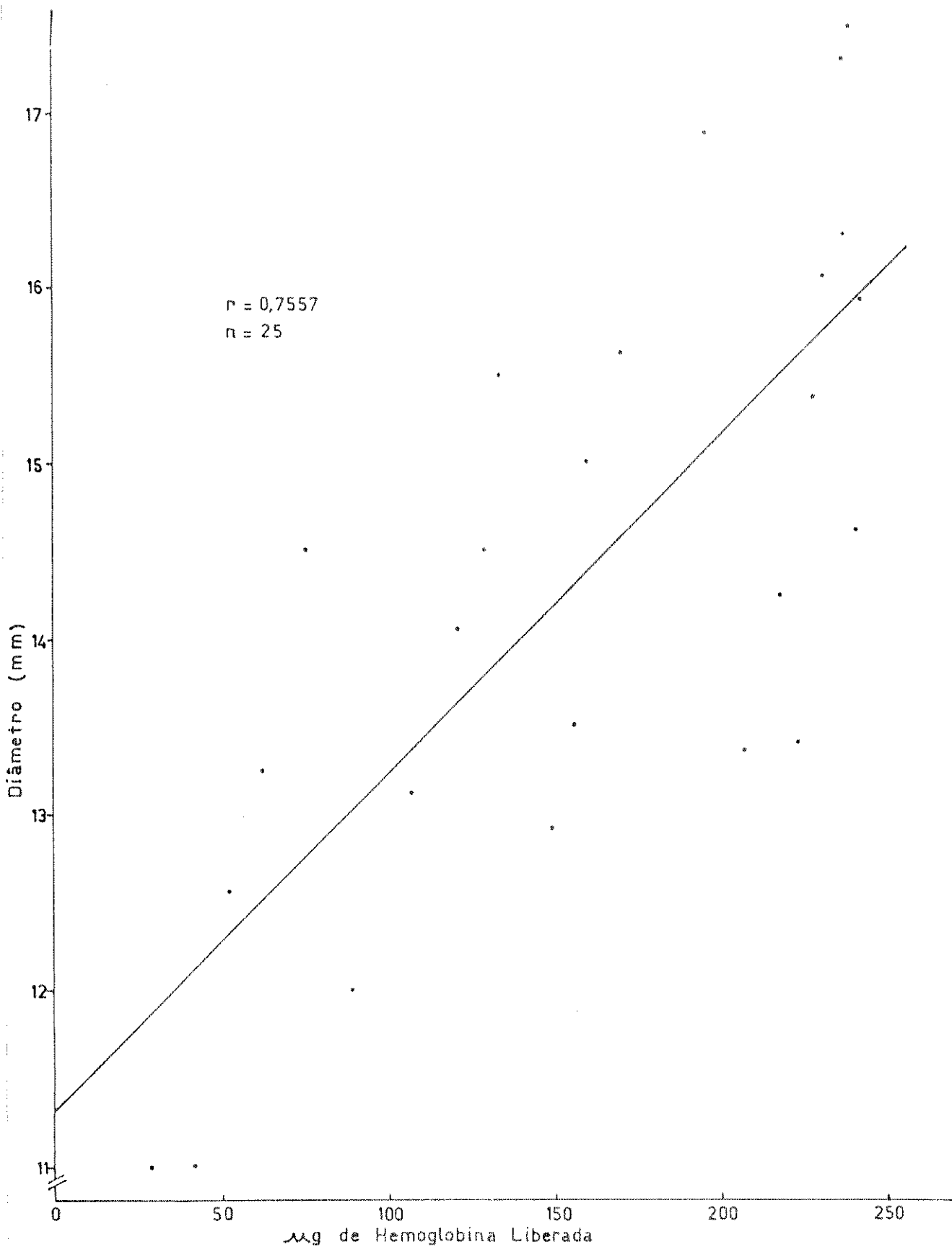


FIGURA 4 - Correlação entre o teste da PIH ( $\mu\text{g}$  de hemoglobina liberada) e da SRIH (diâmetro em mm do halo de hemólise) no ensaio de diferentes diluições de enterotoxina preparada com a amostra 40 T frente a várias diluições de antitoxina colérica.



no teste da PIH foram comparadas com os diâmetros dos halos de hemólise observados no teste da SRIH.

O valor de  $r$  ( $n = 25$ ) para a correlação entre absorvância e diâmetro do halo de hemólise foi de 0,748. Por outro lado, quando se estabeleceu a correlação entre a quantidade de hemoglobina liberada na PIH e o diâmetro do halo de hemólise na SRIH, o valor de  $r$  foi igual a 0,755 para  $n = 25$ .

À partir do valor crítico para o teste da PIH de 30  $\mu\text{g}$  de hemoglobina liberada, onde valores acima deste são considerados positivos e inferiores, negativos (17), foi calculado o intervalo de confiança (IC) para o teste da SRIH.

Estes teste estabeleceu que, para 23 graus de liberdade ao nível de 5% de probabilidade, diâmetros superiores a 12,43 mm, são seguramente positivos e inferiores a 11,33 mm, são negativos.

Valores entre 11,33 e 12,43 mm são considerados duvidosos, recomendando-se repetir a reação para amostras cujos diâmetros dos halos de hemólise se situem nesta faixa.

3.2.3 - Influência da diluição do antisoro (anti-toxina colérica) - Na Tabela 3 estão colocados os valores dos diâmetros dos halos de hemólise no teste da SRIH para as reações feitas com os sobrenadantes não diluídos de culturas de diferentes graus de toxigenicidade, frente a dife-

TABELA 3 - Valores obtidos no teste da SRH com várias toxinas frente a diferentes diluições de antitoxina colérica.

Diluição da Antitoxina	Sobrenadantes de Culturas								K <sub>12</sub> (controle negativo)
	40T	36	156/2	05/75	3406	2423	339	339	
10	17,50 <sup>±</sup> 0,2887 <sup>a</sup>	17,50 <sup>±</sup> 0,2887	17,25 <sup>±</sup> 0,1453	16,50 <sup>±</sup> 0,0722	16,75 <sup>±</sup> 0,1443	16,25 <sup>±</sup> 0,1443	15,37 <sup>±</sup> 0,2165	15,37 <sup>±</sup> 0,2165	7,00 <sup>±</sup> 0,2887
20	16,69 <sup>±</sup> 0,1875	16,60 <sup>±</sup> 0,4330	16,12 <sup>±</sup> 0,0722	14,50 <sup>±</sup> 0,0722	15,75 <sup>±</sup> 0,1443	14,37 <sup>±</sup> 0,0722	14,00 <sup>±</sup> 0,2041	14,00 <sup>±</sup> 0,2041	6,00 <sup>±</sup> 0,2500
40	15,93 <sup>±</sup> 0,2366	15,70 <sup>±</sup> 0,2887	15,50 <sup>±</sup> 0,0000	14,25 <sup>±</sup> 0,1443	14,00 <sup>±</sup> 0,5774	14,25 <sup>±</sup> 0,0722	13,50 <sup>±</sup> 0,2887	13,50 <sup>±</sup> 0,2887	NR
80	14,62 <sup>±</sup> 0,1875	14,25 <sup>±</sup> 0,1443	13,87 <sup>±</sup> 0,0722	13,25 <sup>±</sup> 0,1443	13,50 <sup>±</sup> 0,2887	12,56 <sup>±</sup> 0,2165	12,75 <sup>±</sup> 0,1443	12,75 <sup>±</sup> 0,1443	NR
160	14,00 <sup>±</sup> 0,2041	13,25 <sup>±</sup> 0,1443	12,37 <sup>±</sup> 0,3608	12,25 <sup>±</sup> 0,1443	11,50 <sup>±</sup> 0,2887	10,87 <sup>±</sup> 0,3608	12,12 <sup>±</sup> 0,0722	12,12 <sup>±</sup> 0,0722	NR

a. Média aritmética dos valores dos diâmetros (mm) dos halos de hemólise em 4 testes realizados para cada amostra  $\pm$  1 EPX (erro padrão da média).

NR. Não realizado.

rentes diluições de antitoxina colérica.

Considerando-se que para algumas amostras de enterotoxigenicidade considerada baixa ou intermediária foram obtidos valores duvidosos em relação a positividade da reação, quando se utilizou diluição de 1:160 de antitoxina colérica, empregamos a antitoxina nas diluições 1:80 ou 1:40, preferencialmente esta última quando todas as amostras estudadas, inclusive as de baixa toxigenicidade, forneceram valores para o diâmetro do halo de hemólise bem superiores a 12,43 mm.

Essas observações ficaram também evidentes quando um lote de enterotoxina produzido a partir da amostra 40T, que no teste da PIH estava dando 1:16 (toxigenicidade intermediária), forneceu valores para o diâmetro dos halos de hemólise no teste da SRIH superiores a 12,43 mm quando se utilizou antitoxina colérica em diluições iguais ou inferiores a 1:80. Neste caso em particular, considerando-se que o preparado da amostra 40T, era de toxigenicidade baixa, não se observou nas diluições 1:40 e 1:80, fenômenos de zona apreciáveis (Figura 5).

3.2.4 - Influência da diluição do antígeno (enterotoxina LT) - Diferentes diluições de sobrenadantes de culturas das amostras em estudo foram examinadas pelo teste da SRIH utilizando antitoxina colérica a 1:40 e a 1:80.

Na Figura 6 pode-se observar que nas reações feitas com a antitoxina diluída a 1:40, utilizando amostras de origem humana, mais toxigênicas, foi verificado

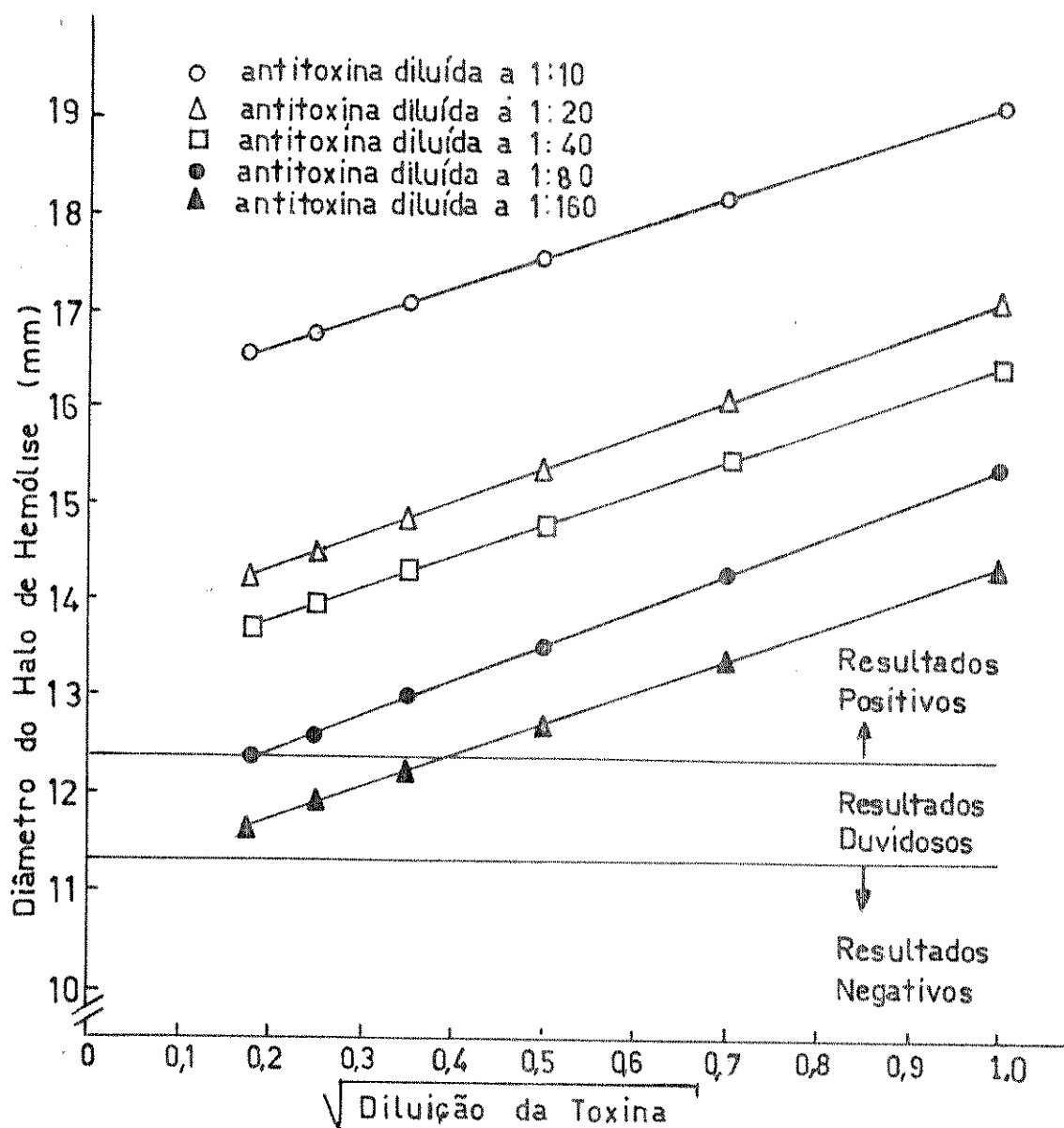


FIGURA 5 - Valores obtidos no teste da SRIH com diluições da toxina 40 T, frente a diferentes diluições de antitoxina colérica.

um fenômeno de prozona. Isto é, nas reações com amostra 40T, em que se usou preparados concentrados (puro e 1:2) desta enterotoxina, ocorreu certa inibição dos halos de hemólise. Com as amostras de toxigenicidade mais baixa (05/75, 36 e 156/2) não se observou esta inibição.

Com relação as amostras de origem suína, verificou-se que com aquelas de toxigenicidade baixa (3406) e intermediária (2423) ainda foram obtidos alguns fenômenos de prozona (Figura 7).

Como seria de se esperar, as amostras mais toxigênicas, quer de origem humana, quer suína, foram capazes de dar reações positivas em diluições maiores. De qualquer modo, o que ficou em evidência neste estudo comparativo, é que as amostras de origem humana deram não só diâmetros maiores nas reações feitas com preparados brutos, como também forneceram resultados ainda positivos com sobrenadantes mais diluídos.

Quando estes experimentos foram repetidos com antitoxina colérica diluída 1:80 se observou que algumas amostras forneceram resultados negativos, nas mesmas condições em que esses resultados foram positivos quando se utilizou antitoxina colérica diluída a 1:40 (Figura 6 e 7).

3.2.5 - Influência do tempo de difusão do antisoro (antitoxina colérica) - Na Tabela 4 são colocadas as leituras dos diâmetros dos halos de hemólise medidos após 24 e 48 horas de difusão da antitoxina colérica (1:40) em reações do teste da SRIH feitas com amostras de diferentes

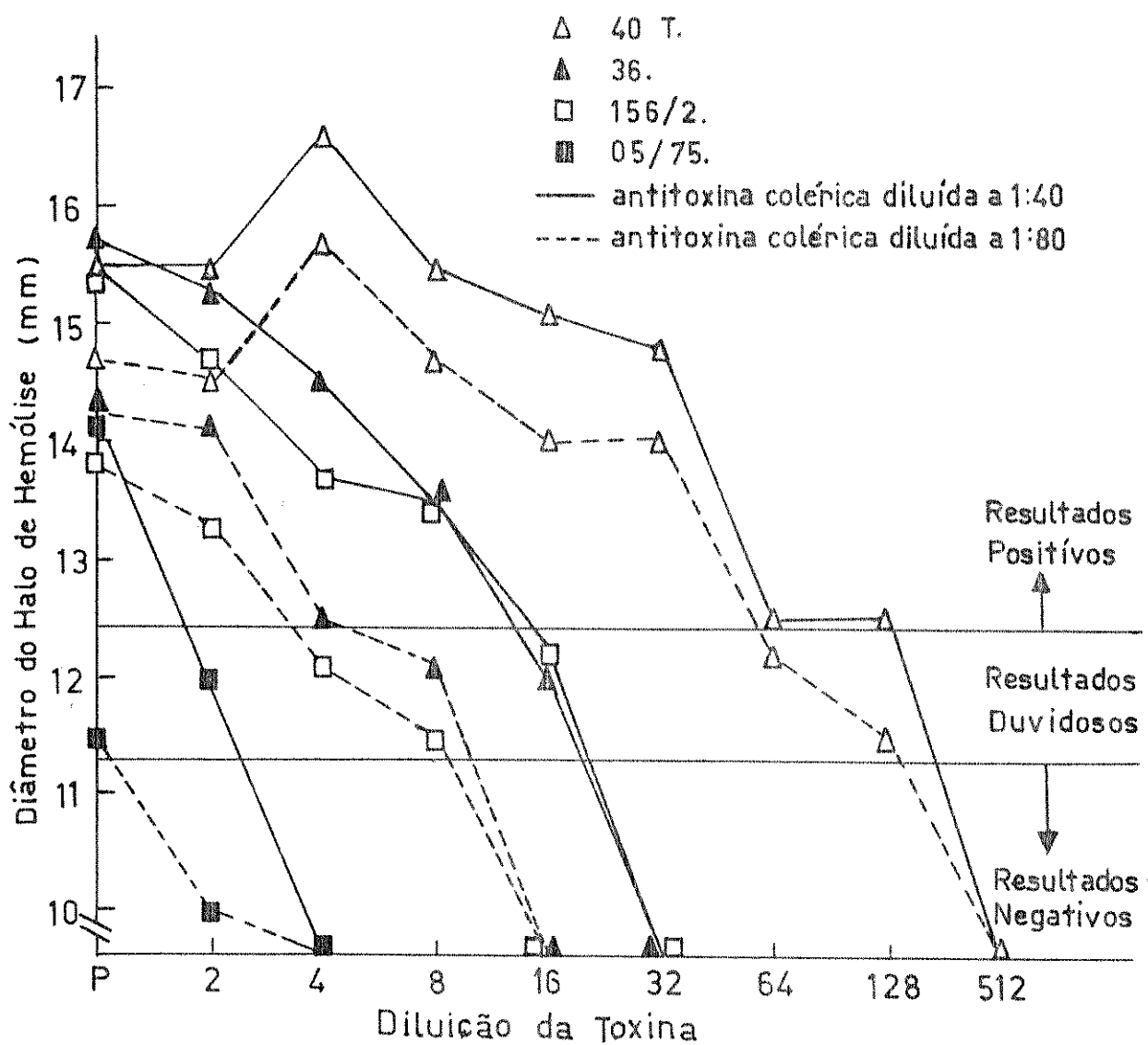


FIGURA 6 - Influência da diluição da toxina, preparada a partir de amostras de *E. coli* de origem humana, no teste da SRIH.

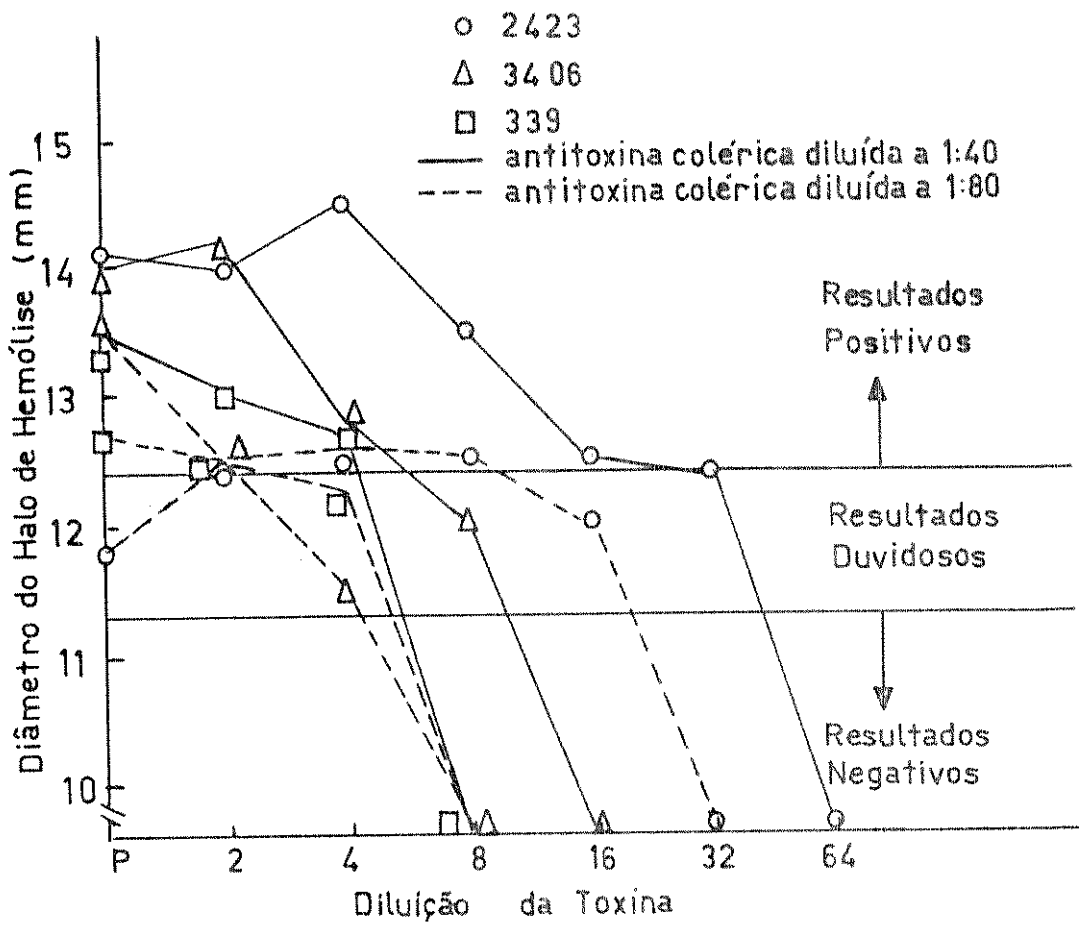


FIGURA 7 - Influência da diluição da toxina, preparada a partir de amostras de *E. coli* de origem suína, no teste da SRIH.

TABLE 4 - INFLUÊNCIA DO TEMPO DE DIFUSÃO DA ANTITOXINA COLÉRICA NA DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA ENTEROTOXIGÊNICA DE VÁRIAS AMOSTRAS DE *E. COLI*, ENSAIADAS PELO TESTE DA SRTH.

Diluição	Sobrenadantes de Culturas																											
	40T				36				156/2				05/75				2423				3406				539		1/2 (CONTROLE NEGATIVO)	
	24 HORAS	48 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	24 HORAS	48 HORAS		
TOXINA	15,50±0,2887 <sup>b</sup>	18,50±0,0000	15,75±0,1443	18,25±0,2887	15,50±0,0000	18,00±0,0000	15,50±0,0000	18,00±0,0000	14,25±0,0722	15,62±0,2165	14,00±0,0000	15,62±0,2165	14,00±0,0000	15,62±0,2165	14,00±0,0000	15,62±0,2165	14,00±0,0000	15,62±0,2165	14,00±0,0000	15,62±0,2165	14,00±0,0000	15,62±0,2165	14,00±0,0000	15,62±0,2165	14,00±0,0000	15,62±0,2165	14,00±0,0000	15,62±0,2165
2	15,50±0,2887	18,60±0,2165	15,12±0,0722	17,75±0,1443	14,62±0,0722	17,75±0,1443	14,62±0,0722	17,75±0,1443	14,00±0,0000	16,50±0,2887	14,00±0,0000	16,50±0,2887	14,00±0,0000	16,50±0,2887	14,00±0,0000	16,50±0,2887	14,00±0,0000	16,50±0,2887	14,00±0,0000	16,50±0,2887	14,00±0,0000	16,50±0,2887	14,00±0,0000	16,50±0,2887	14,00±0,0000	16,50±0,2887	14,00±0,0000	16,50±0,2887
4	16,60±0,3676	19,12±0,0722	14,50±0,0000	17,37±0,2165	13,75±0,1443	16,25±0,1443	13,75±0,1443	16,25±0,1443	-	15,87±0,0722	12,87±0,0722	15,87±0,0722	12,87±0,0722	15,87±0,0722	12,87±0,0722	15,87±0,0722	12,87±0,0722	15,87±0,0722	12,87±0,0722	15,87±0,0722	12,87±0,0722	15,87±0,0722	12,87±0,0722	15,87±0,0722	12,87±0,0722	15,87±0,0722	12,87±0,0722	15,87±0,0722
8	15,50±0,2887	18,50±0,2887	13,50±0,2887	15,25±0,1443	13,50±0,2887	13,75±0,1443	13,50±0,2887	13,75±0,1443	-	16,62±0,0722	12,00±0,0000	16,62±0,0722	12,00±0,0000	16,62±0,0722	12,00±0,0000	16,62±0,0722	12,00±0,0000	16,62±0,0722	12,00±0,0000	16,62±0,0722	12,00±0,0000	16,62±0,0722	12,00±0,0000	16,62±0,0722	12,00±0,0000	16,62±0,0722	12,00±0,0000	16,62±0,0722
16	15,12±0,0722	18,25±0,1443	11,50±0,2887	13,12±0,0722	12,25±0,0000	13,00±0,0000	12,25±0,0000	13,00±0,0000	-	15,50±0,2887	12,50±0,0000	15,50±0,2887	12,50±0,0000	15,50±0,2887	12,50±0,0000	15,50±0,2887	12,50±0,0000	15,50±0,2887	12,50±0,0000	15,50±0,2887	12,50±0,0000	15,50±0,2887	12,50±0,0000	15,50±0,2887	12,50±0,0000	15,50±0,2887	12,50±0,0000	15,50±0,2887
32	14,87±0,2165	17,62±0,2165	-	-	-	-	-	-	-	14,50±0,2887	12,00±0,0000	14,50±0,2887	12,00±0,0000	14,50±0,2887	12,00±0,0000	14,50±0,2887	12,00±0,0000	14,50±0,2887	12,00±0,0000	14,50±0,2887	12,00±0,0000	14,50±0,2887	12,00±0,0000	14,50±0,2887	12,00±0,0000	14,50±0,2887	12,00±0,0000	14,50±0,2887
64	12,50±0,2887	16,00±0,2887	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
128	12,50±0,0000	12,50±0,2887	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
256	- <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a. TEMPO DE DIFUSÃO DA ANTITOXINA COLÉRICA.

b. MÉDIA ARITMÉTICA DOS VALORES DOS DIÂMETROS (µm) DOS HALOS DE HEMÓLISE AO REDOR DOS ORIFÍCIOS CONTENDO ANTITOXINA COLÉRICA DILUÍDA A 1:40 EM 4 TESTES REALIZADOS ± 1 EPM (ERRO PADRÃO DA MÉDIA).

c. NEGATIVO.



capacidades toxigênicas. Os resultados obtidos com 48 horas de difusão forneceram diâmetros dos halos de hemólise para cada uma das diluições das toxinas estudadas, independentemente da sua origem. Esses dados demonstram que se o teste for feito com 48 horas de incubação o mesmo se torna mais sensível. Todavia, conforme se pode verificar na mesma tabela, para cada uma das toxinas estudadas não houve variação significativa no título final obtido nas reações feitas com difusão por 24 ou 48 horas.

### 3.3 - Comparação entre os testes da SRIH e PIH na detecção de enterotoxina LT produzida por outras amostras de colibacilos enterotoxigênicos.

Embora pelos testes da SRIH realizados com amostras de origem humana (40T, 36, 156/2 e 05/75) e suína (2423, 3406 e 339) já tivéssemos uma idéia da eficiência desta prova, havia o interesse em se estudar o comportamento da mesma frente a outras amostras de colibacilos enterotoxigênicos, de várias origens, conforme mencionado em material e métodos. A Tabela 5 mostra que os resultados obtidos nos testes da PIH e da SRIH, de acordo com os padrões estabelecidos, foram coincidentes, ou seja, as amostras negativas no teste da PIH ( $A_{420} < 0,17$  ou 30  $\mu\text{g}$  de hemoglobina liberada) também foram negativas no teste da SRIH como aconteceu com as amostras 150/2, 446 e *E. coli* K<sub>12</sub>, esta última incluída como controle negativo (Figura 8). As amostras fracamente positivas, isto é,  $A_{420} = 0,18 - 0,25$  (32 a 45  $\mu\text{g}$  de hemoglobina liberada) também o foram no teste da SRIH

TABELA 5 - Detecção de *E. coli* enterotoxigênica pelos testes da PIH e da SRIH.

Amostras	Diâmetro dos halos de hemólise (mm)	Absorbância ( $A_{420}$ )
	antitoxina 1:40	antitoxina 1:80
19927	16,00 $\pm$ 0,0000 <sup>a</sup>	1,32 $\pm$ 0,0043 <sup>b</sup>
38	15,25 $\pm$ 0,2500	1,32 $\pm$ 0,0029
73/1	16,00 $\pm$ 0,2887	1,31 $\pm$ 0,0014
A	14,50 $\pm$ 0,2887	1,26 $\pm$ 0,0043
2161	15,25 $\pm$ 0,1443	1,22 $\pm$ 0,0202
13/D	16,00 $\pm$ 0,2887	1,21 $\pm$ 0,0050
269/7	14,75 $\pm$ 0,1443	1,13 $\pm$ 0,0152
82/2	15,50 $\pm$ 0,2887	0,99 $\pm$ 0,0029
153	15,75 $\pm$ 0,1443	1,14 $\pm$ 0,0050
406	12,00 $\pm$ 0,0000	0,22 $\pm$ 0,0202
306	12,00 $\pm$ 0,0306	0,20 $\pm$ 0,0022
150/2	- <sup>c</sup>	0,08 $\pm$ 0,0029
446	-	0,11 $\pm$ 0,0500
40T (controle positivo)	15,75 $\pm$ 0,1443	1,28 $\pm$ 0,0325
K <sub>12</sub> (controle negativo)	-	0,09 $\pm$ 0,0029

- a. Média aritmética dos valores dos diâmetros dos halos de hemólise em 4 testes realizados para cada amostra  $\pm$  1 EPM (erro padrão da média).
- b. Média aritmética dos valores das absorbâncias ( $A_{420}$ ) em 4 testes realizados para cada amostra  $\pm$  1 EPM (erro padrão da média).
- c. Negativo.

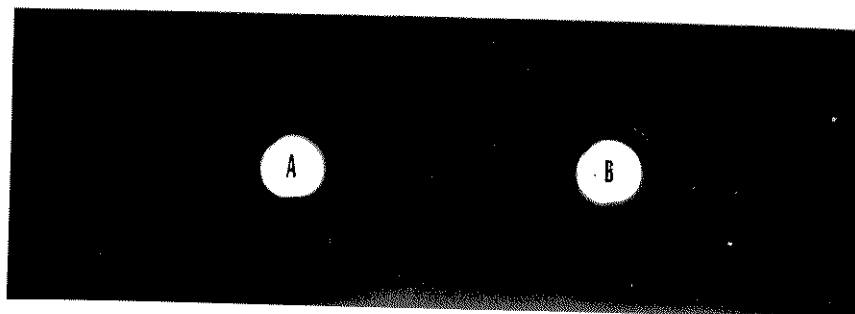


FIGURA 8 - Teste da SRIH com a amostra de *E. coli* K<sub>12</sub> (controle negativo). Aumento da fotografia: 5 x.

A - antitoxina colérica diluída a 1:40

B - antitoxina colérica diluída a 1:80

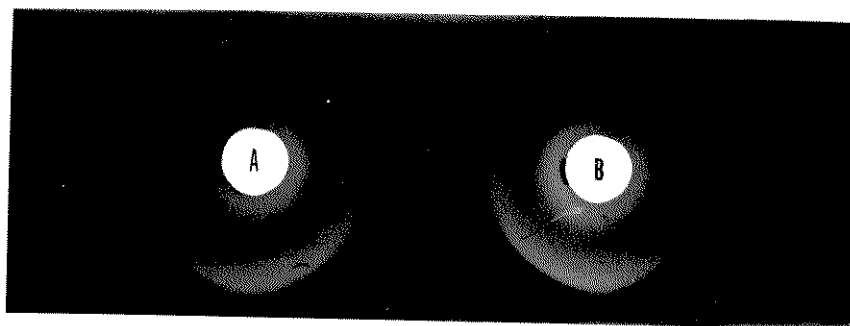


FIGURA 9 - Teste da SRIH com a amostra de *E. coli* 40T (produtora de enterotoxina LT). Aumento da fotografia: 5 x.

A - antitoxina colérica diluída a 1:40

B - antitoxina colérica diluída a 1:80

(amostras 306 e 406). Finalmente, todas as amostras definitivamente positivas no teste da PIH, ou seja,  $A_{420} > 0,25$  ( $> 46 \mu\text{g}$  de hemoglobina liberada) também foram positivos no teste da SRIH, como ocorreu com as amostras 82/2, 38, 19927, 2161, 73/1, 269/7, 13/D, 153, A e 40T, esta última incluída como controle positivo da reação (Figura 9).

#### 3.4 - Avaliação do teste da SRIH na detecção da enterotoxina LT produzida em culturas estacionárias.

Os resultados obtidos com sobrenadantes provenientes de culturas estacionárias e cultivadas sob agitação (150 rpm), examinadas pelo teste da SRIH, são apresentados na Tabela 6.

Das 15 amostras examinadas observa-se que em dois casos (13,33%) referentes as amostras 153 e 306, os resultados foram negativos. Isto nos levou a crer, como era esperado, que o cultivo estacionário causasse uma diminuição da produção de enterotoxina LT. Desse modo, as amostras fracamente positivas poderiam não ter a produção de enterotoxina detectável por esta técnica, quando cultivadas sem agitação.

Os resultados encontrados na Tabela 7 com algumas amostras, que tiveram a produção de enterotoxina tituladas pelo SRIH, em culturas estacionárias e cultivadas sob agitação, demonstram que para algumas delas (40T, 339 e 2423) houve uma diminuição da produção de enterotoxina LT nas culturas estacionárias. Para a amostra 339 a diferença não

TABELA 6 - Influência de culturas estacionárias e com agitação na produção de enterotoxina LT pelo teste da SRIH.

Amostras	Diâmetro dos halos de hemólise (mm)		Absorbância ( $A_{420}$ )	
	agitação <sup>a</sup>	estacionária <sup>b</sup>	agitação	estacionária
40T	15,75 <sup>±</sup> 0,1443 <sup>c</sup>	15,50 <sup>±</sup> 0,2887	0,98 <sup>±</sup> 0,0578 <sup>d</sup>	0,96 <sup>±</sup> 0,0058
156/2	17,25 <sup>±</sup> 0,1443	17,00 <sup>±</sup> 0,0000	0,85 <sup>±</sup> 0,0058	0,85 <sup>±</sup> 0,0144
19927	15,25 <sup>±</sup> 0,125	16,00 <sup>±</sup> 0,0000	0,89 <sup>±</sup> 0,0144	0,90 <sup>±</sup> 0,0870
36	16,37 <sup>±</sup> 0,2394	14,50 <sup>±</sup> 0,2887	0,91 <sup>±</sup> 0,0144	0,77 <sup>±</sup> 0,0144
73/1	16,00 <sup>±</sup> 0,0000	14,75 <sup>±</sup> 0,1443	1,02 <sup>±</sup> 0,0192	0,87 <sup>±</sup> 0,0289
153	15,25 <sup>±</sup> 0,1443	-	0,80 <sup>±</sup> 0,0960	0,08 <sup>±</sup> 0,0818
38	15,12 <sup>±</sup> 0,0722	15,75 <sup>±</sup> 0,1443	0,95 <sup>±</sup> 0,0577	0,92 <sup>±</sup> 0,0144
A	15,00 <sup>±</sup> 0,0000	13,75 <sup>±</sup> 0,1443	0,93 <sup>±</sup> 0,0053	0,62 <sup>±</sup> 0,0058
82/2	16,12 <sup>±</sup> 0,0722	16,00 <sup>±</sup> 0,0000	0,84 <sup>±</sup> 0,0144	0,90 <sup>±</sup> 0,0144
269/7	16,25 <sup>±</sup> 0,1443	14,38 <sup>±</sup> 0,0722	0,91 <sup>±</sup> 0,0058	0,78 <sup>±</sup> 0,0091
2423	15,25 <sup>±</sup> 0,1443	14,75 <sup>±</sup> 0,1443	0,91 <sup>±</sup> 0,0144	0,82 <sup>±</sup> 0,0058
3406	15,75 <sup>±</sup> 0,1443	13,75 <sup>±</sup> 0,0722	0,93 <sup>±</sup> 0,0058	0,62 <sup>±</sup> 0,0029
339	15,50 <sup>±</sup> 0,0000	14,25 <sup>±</sup> 0,1443	0,90 <sup>±</sup> 0,0144	0,76 <sup>±</sup> 0,0058
05/75	15,25 <sup>±</sup> 0,1443	15,00 <sup>±</sup> 0,0000	0,57 <sup>±</sup> 0,0115	0,75 <sup>±</sup> 0,0115
306	13,00 <sup>±</sup> 0,0000	-	0,45 <sup>±</sup> 0,0202	0,18 <sup>±</sup> 0,0058
K <sub>12</sub>	- <sup>e</sup>	-	0,04 <sup>±</sup> 0,0029	0,03 <sup>±</sup> 0,0058
(controle negativo)				

a. Sobrenadantes de culturas obtidos após 18 hs. de incubação a 37°C, sob agitação e extraídos pelo polimixina B.

b. Sobrenadantes de culturas estacionárias incubadas a 37°C por 24 hs, extraídos pela polimixina B.

c. Média aritmética dos valores dos diâmetros dos halos de hemólise em 4 testes realizados para cada amostra  $\pm$  1 EPM (erro padrão de média).

d. Média aritmética das absorbâncias em 4 testes realizados  $\pm$  1 EPM (erro padrão de média).

e. Negativo.

TABELA 7 - Títulos obtidos em culturas estacionárias e sob agitação quanto a produção de enterotoxina I<sup>r</sup>, detectável pelo teste da SRIN.

Diluição da toxina	Sobrenadantes de Culturas												K <sub>12</sub> (controle negativo)								
	40T				156/2				05/75					339				2423			
	agitação <sup>a</sup>	estacionária <sup>b</sup>	agitação	estacionária	agitação	estacionária	agitação	estacionária	agitação	estacionária	agitação	estacionária		agitação	estacionária	agitação	estacionária	agitação	estacionária		
pura	15,75 <sup>±</sup> 0,1443	15,50 <sup>±</sup> 0,2887	17,25 <sup>±</sup> 0,1443	17,12 <sup>±</sup> 0,0722	14,50 <sup>±</sup> 0,2887	15,12 <sup>±</sup> 0,0722	15,25 <sup>±</sup> 0,1443	13,50 <sup>±</sup> 0,0722	15,75 <sup>±</sup> 0,125	15,62 <sup>±</sup> 0,0722	15,75 <sup>±</sup> 0,1443	13,00 <sup>±</sup> 0,0000	15,62 <sup>±</sup> 0,0722	15,62 <sup>±</sup> 0,0722	15,75 <sup>±</sup> 0,1443	13,00 <sup>±</sup> 0,0000	15,62 <sup>±</sup> 0,0722	15,62 <sup>±</sup> 0,0722			
2	15,50 <sup>±</sup> 0,0000	16,00 <sup>±</sup> 0,0000	16,00 <sup>±</sup> 0,2887	17,00 <sup>±</sup> 0,0000	13,25 <sup>±</sup> 0,1443	14,25 <sup>±</sup> 0,1443	14,00 <sup>±</sup> 0,0000	13,25 <sup>±</sup> 0,0722	15,62 <sup>±</sup> 0,0722	15,62 <sup>±</sup> 0,0722	15,62 <sup>±</sup> 0,0722	13,00 <sup>±</sup> 0,0000	15,62 <sup>±</sup> 0,0722	15,62 <sup>±</sup> 0,0722	15,75 <sup>±</sup> 0,1443	13,00 <sup>±</sup> 0,0000	15,62 <sup>±</sup> 0,0722	15,62 <sup>±</sup> 0,0722			
4	16,25 <sup>±</sup> 0,1443	15,25 <sup>±</sup> 0,1443	16,50 <sup>±</sup> 0,0000	15,75 <sup>±</sup> 0,1443	12,00 <sup>±</sup> 0,0000	13,00 <sup>±</sup> 0,0000	13,12 <sup>±</sup> 0,0722	12,00 <sup>±</sup> 0,0000	15,75 <sup>±</sup> 0,1443	15,75 <sup>±</sup> 0,1443	15,75 <sup>±</sup> 0,1443	12,00 <sup>±</sup> 0,0000	15,75 <sup>±</sup> 0,1443	15,75 <sup>±</sup> 0,1443	15,75 <sup>±</sup> 0,1443	13,00 <sup>±</sup> 0,0000	15,75 <sup>±</sup> 0,1443	15,75 <sup>±</sup> 0,1443			
8	15,25 <sup>±</sup> 0,1443	15,25 <sup>±</sup> 0,1443	15,50 <sup>±</sup> 0,2887	15,25 <sup>±</sup> 0,1443	-	-	12,00 <sup>±</sup> 0,0000	-	15,50 <sup>±</sup> 0,0000	15,50 <sup>±</sup> 0,0000	15,50 <sup>±</sup> 0,0000	12,00 <sup>±</sup> 0,0000	15,50 <sup>±</sup> 0,0000	15,50 <sup>±</sup> 0,0000	15,50 <sup>±</sup> 0,0000	-	15,50 <sup>±</sup> 0,0000	15,50 <sup>±</sup> 0,0000			
16	15,38 <sup>±</sup> 0,0722	14,25 <sup>±</sup> 0,1443	14,25 <sup>±</sup> 0,1443	14,50 <sup>±</sup> 0,0000	-	-	14,25 <sup>±</sup> 0,1443	-	14,75 <sup>±</sup> 0,1443	14,75 <sup>±</sup> 0,1443	14,75 <sup>±</sup> 0,1443	-	14,75 <sup>±</sup> 0,1443	14,75 <sup>±</sup> 0,1443	14,75 <sup>±</sup> 0,1443	-	14,75 <sup>±</sup> 0,1443	14,75 <sup>±</sup> 0,1443			
32	15,50 <sup>±</sup> 0,0000	13,00 <sup>±</sup> 0,0000	13,00 <sup>±</sup> 0,1443	13,00 <sup>±</sup> 0,2887	-	-	13,00 <sup>±</sup> 0,1443	-	14,00 <sup>±</sup> 0,0000	14,00 <sup>±</sup> 0,0000	14,00 <sup>±</sup> 0,0000	-	14,00 <sup>±</sup> 0,0000	14,00 <sup>±</sup> 0,0000	14,00 <sup>±</sup> 0,0000	-	14,00 <sup>±</sup> 0,0000	14,00 <sup>±</sup> 0,0000			
64	15,10 <sup>±</sup> 0,0722	- <sup>d</sup>	-	-	-	-	-	-	13,00 <sup>±</sup> 0,0000	13,00 <sup>±</sup> 0,0000	13,00 <sup>±</sup> 0,0000	-	13,00 <sup>±</sup> 0,0000	13,00 <sup>±</sup> 0,0000	13,00 <sup>±</sup> 0,0000	-	13,00 <sup>±</sup> 0,0000	13,00 <sup>±</sup> 0,0000			
128	14,00 <sup>±</sup> 0,0000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
256	14,25 <sup>±</sup> 0,1443	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

a. Sobrenadantes de culturas obtidos após 16 horas de incubação a 37° C, sob agitação e extraídos pela polidixina B.

b. Sobrenadantes de culturas estacionárias incubadas a 37° C por 24 horas, extraídas pela polidixina B.

c. Média aritmética dos valores dos diâmetros (nm) dos halos de hemólise em 4 testes realizados para cada amostra ± 1 EPM (erro padrão da média).

d. Negativo.

foi significativa e, em outras (156/2 e 05/75), o título final obtido em culturas estacionárias e sob agitação foi o mesmo.

### 3.5 - Avaliação do teste da SRIH na detecção de enterotoxina LT em sobrenadantes de culturas não submetidos ao tratamento pela polimixina.

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados obtidos quando toxinas não diluídas extraídas ou não pela polimixina B foram examinadas frente a diferentes diluições da antitoxina colérica.

Não se observaram diferenças significantes entre os diâmetros dos halos de hemólise correspondentes às reações das toxinas obtidas por ambos os métodos.

Apesar destes resultados, havia interesse em se verificar se a extração pela polimixina alteraria a quantidade de enterotoxina LT a ser detectada no sobrenadante. Por este motivo, culturas da amostra 3406, submetidas ou não ao tratamento pela polimixina, foram tituladas pelos testes da PIH e da SRIH com a antitoxina colérica diluída a 1:40. Os resultados encontrados na Tabela 9 mostram que não existe diferença significativa na quantidade de enterotoxina LT presente nos sobrenadantes obtidos por ambos os métodos.

Além disso, estes resultados evidenciam novamente a forte correlação existente entre os testes da PIH e da

TABELA 8 - Valores obtidos nos testes da SRIH e da PIH com sobrenadantes de culturas submetidas ou não ao tratamento pela polimixina B.

Diluição de Antitoxina	Sobrenadantes de Culturas				K <sub>12</sub> (controle negativo)		
	156/2 com poli <sup>a</sup>	sem poli <sup>b</sup>	05/75 com poli	sem poli		3406 com poli	sem poli
40	15,50 <sup>±</sup> 0,0000 <sup>c</sup>	15,00 <sup>±</sup> 0,0000	14,25 <sup>±</sup> 0,1443	14,00 <sup>±</sup> 0,0000	14,00 <sup>±</sup> 0,5774	14,00 <sup>±</sup> 0,5774	- <sup>e</sup>
80	13,87 <sup>±</sup> 0,0722	13,00 <sup>±</sup> 0,0000	13,50 <sup>±</sup> 0,1443	13,00 <sup>±</sup> 0,0000	14,00 <sup>±</sup> 0,2887	13,00 <sup>±</sup> 0,5774	-
80	1,28 <sup>±</sup> 0,0500 <sup>d</sup>	1,02 <sup>±</sup> 0,0577	1,12 <sup>±</sup> 0,0577	0,58 <sup>±</sup> 0,0029	1,32 <sup>±</sup> 0,0000	1,15 <sup>±</sup> 0,0577	-

a. Sobrenadantes provenientes de culturas incubadas por 18 horas, a 37° C, sob agitação e extraídas pela polimixina B.

b. Sobrenadantes provenientes de culturas incubadas por 18 horas, a 37° C, sob agitação, não submetidas ao tratamento pela polimixina B.

c. Média aritmética dos valores dos diâmetros (mm) dos halos de hemólise em 4 testes realizados para cada amostra ± 1 EPM (erro padrão da média).

d. Média aritmética das absorbâncias (A<sub>420</sub>) em 4 testes realizados para cada amostra ± 1 EPM (erro padrão da média).

e. Negativo.



TABELA 9 - Títulos obtidos pelos testes da SRIH e da PIH com sobrenadantes de culturas de amostras 3406 submetida ou não ao tratamento pela polimixina B.

Amostra	Diâmetro dos halos de hemólise (mm)		Absorbância ( $A_{420}$ )	
	com poli <sup>a</sup>	sem poli <sup>b</sup>	com poli	sem poli
3406				
Pura	14,00 ± 0,5774 <sup>c</sup>	14,00 ± 0,5774	1,32 ± 0,0000 <sup>d</sup>	1,15 ± 0,0577
2	14,25 ± 0,4330	13,25 ± 0,1443	0,92 ± 0,0076	0,84 ± 0,0289
4	12,87 ± 0,0722	10,50 ± 0,2887	0,67 ± 0,0100	0,51 ± 0,0233
8	12,00 ± 0,0000	-	0,26 ± 0,0126	0,17 ± 0,0071
$K_{12}$ (controle negativo)	- <sup>e</sup>	-	-	-

a. Sobrenadantes provenientes de culturas incubadas por 18 horas, a 37°C, sob agitação e extraídas pela polimixina B.

b. Sobrenadantes provenientes de culturas incubadas por 18 horas, a 37°C, sob agitação, não submetidas ao tratamento pela polimixina B.

c. Média aritmética dos valores dos diâmetros (mm) dos halos de hemólise ao redor dos orifícios contendo antitoxina colérica diluída a 1:40 em 4 testes realizados para cada diluição de toxina ± 1 EPM (erro padrão da média).

d. Média aritmética dos valores das absorbâncias ( $A_{420}$ ) em 4 testes realizados ± 1 EPM (erro padrão da média).

e. Negativo

SRIH pois ambos mostraram-se eficientes na detecção da enterotoxina LT.

#### 4. DISCUSSÃO

Existem atualmente, para detecção de enterotoxina LT, vários testes sorológicos, bem como ensaios em certas linhagens celulares que, quando em contacto com aquela enterotoxina, apresentam alterações morfológicas (4, 9, 17, 21, 22, 32, 37).

As desvantagens dos testes do RIA e ELISA se baseiam sobretudo na necessidade de aparelhagem e reagentes especiais, bem como pessoal técnico qualificado. O teste da PIH, embora bastante simples, apresenta o inconveniente de requerer leitura espectrofotométrica. Este foi um dos motivos que levou BRILL e col. (4) a estudarem uma prova onde fosse possível uma leitura macroscópica, sem exigir, por outro lado, equipamentos ou reagentes especiais, a não ser uma capa de *Staphylococcus aureus*, produtora de proteínas A, bem como a antitoxina colérica. Segundo estes autores, esta prova apresentaria sensibilidade comparável aos

demais testes em cultura de tecido.

Todavia, em nossas condições, vários pesquisadores que tentaram sua adaptação para a detecção de LT não relataram resultados favoráveis (TRABULSI, comunicação pessoal; PESTANA DE CASTRO, comunicação pessoal), principalmente quanto a sua especificidade e sensibilidade.

Todos estes inconvenientes apresentados tornam grande parte destes testes sorológicos pouco apropriados para laboratórios menores e menos equipados o que é, via de regra, habitual nos países em desenvolvimento.

Com relação à detecção de enterotoxina LT, através de ensaios realizados em cultura de tecido, é importante ressaltar algumas inconveniências próprias do sistema em questão, tais como: a necessidade de manutenção das células e de pessoas adequadamente treinadas para a manipulação das mesmas. Além disso, as principais linhagens celulares utilizadas até o momento (Y-1, CHO e VERO) apresentam algumas diferenças de natureza não só qualitativa, como quantitativa, no que concerne à leitura das alterações morfológicas produzidas (9, 22, 32). Não existe até o momento, estudos comparativos para avaliar esses efeitos nas linhagens mencionadas e, por outro lado, ainda que as considerássemos isoladamente existiria ainda a necessidade de se manter pessoal familiarizado com a leitura destes ensaios.

Estas razões tornam ainda mais inviável a difusão dos testes em cultura de tecido como método padrão para se identificar amostras de *E. coli* enterotoxigênicas,

produtoras de enterotoxina LT.

Em vista disto, tentamos no presente trabalho, através de um teste sorológico mais simples, estudar uma técnica que fosse passível de realização em laboratórios modestos. O método escolhido foi o da SRIH, com relação ao qual teceremos agora algumas considerações, com base nos resultados por nós obtidos no estudo comparativo que realizamos com o teste da PIH.

#### 4.1 - Correlação entre os testes da SRIH e da PIH

Verificou-se (SERAFIM, comunicação pessoal) que o teste da PIH era mais sensível na detecção da enterotoxina LT do que o ensaio em células de linhagem Y-1. Aliás, com relação a esta prova, sabia-se ser a mesma não muito apropriada para a detecção de amostras fracamente toxigênicas, fornecendo por vezes resultados inconstantes em leituras realizadas por diferentes técnicos (36).

Embora, mais adiante, venhamos fazer considerações sobre as limitações ou vantagens de se utilizar testes sorológicos, em especial o SRIH e o PIH, para a detecção de enterotoxina LT, é importante salientar que resultados falso-positivos, nesses testes, poderiam ser devidos a amostras de colibacilos que produzissem enterotoxina LT inativa. Nessas condições, o ensaio, embora positivo nos testes sorológicos, seria negativo nos ensaios biológicos, em especial aqueles realizados em cultura de tecido.

No entanto, embora a ocorrência de tais tipos de amostras seja possível, na prática, tem-se demonstrado que o isolamento, a partir de espécimes clínicos, de colibacilos enterotoxigênicos que produzem uma toxina defectiva é bastante raro (17).

Observou-se no presente trabalho, que o teste da SRIH, como o da PIH, nas condições investigadas, são ambos mais sensíveis do que o teste em Y-1. Assim sendo, a comparação do teste da SRIH com o teste da PIH demonstrou uma boa correlação entre ambos (Figuras 3 e 4).

Embora neste estudo comparativo tivéssemos nos valido de apenas uma amostra de origem humana, foi possível se estabelecer os limites de confiança para o teste da SRIH. Em outras palavras, valores do diâmetro do halo de hemólise superiores a 12,43 mm são seguramente positivos. Por outro lado, aqueles entre este valor e 11,33 mm poderiam ser considerados duvidosos, o que acontece, de modo semelhante, no teste da PIH, quando obtemos com amostras negativas ou de toxigenicidade bastante baixa, valores de  $A_{420}$  entre 0,17 e 0,25.

Conforme se pode verificar nos resultados obtidos nos estudos comparativos entre o SRIH e o PIH, em diluições mais elevadas do antisoro utilizado (1:40 e 1:80), não se observou qualquer halo de hemólise visível macroscopicamente, nos testes realizados com as amostras não enterotoxigênicas. Como, em diluições mais baixas de antitoxina colérica (1:10 e 1:20), foram encontrados alguns halos de

hemólise com o controle negativo, não enterotoxigênico (*E. coli* K<sub>12</sub>), recomendamos que o teste da SRIII seja sempre padronizado no que concerne a melhor diluição de antitoxina colérica a ser utilizada no mesmo, de modo a evitar reações falso-positivas.

Uma explicação para estes resultados falso-positivos, quando se utilizou antitoxina colérica mais concentrada nos é desconhecida e merece ser melhor investigada. Contudo, apesar de termos realizado a absorção da antitoxina colérica com hemácias de carneiro, é possível que alguns anticorpos heterófilos tenham ainda permanecido no soro absorvido. Todavia, somos particularmente favoráveis à hipótese de que a antitoxina colérica contivesse anticorpos capazes de reagir cruzadamente em baixos títulos com componentes extracelulares de sobrenadantes de cultura de *E. coli* K<sub>12</sub> utilizada como controle negativo.

#### 4.2 - Influência de algumas variáveis da reação

Embora não fosse nosso intuito estudar exaustivamente as condições de preparo dos sobrenadantes de culturas a serem examinados, bem como a influência que algumas variáveis do teste viesse a ter nos resultados obtidos, procuramos selecionar alguns aspectos, nesse particular, que pudessem nos dar uma idéia mais precisa sobre a sua influência na sensibilidade do teste, bem como torná-lo mais facilmente adaptável a laboratórios menos equipados, aumentando o seu rendimento diante dos reagentes disponíveis.

Assim sendo, determinou-se qual a menor concentração final ótima (0,5%) de hemácias a ser utilizada no teste. Nas provas realizadas com sobrenadantes de cultura não diluídos ocorreu um fenômeno de prozona, mais acentuado nas amostras de origem humana de toxigenicidade enquadrada no grupo I (F) (Figura 6). Contudo, visto que este fenômeno só foi verificado com as amostras mais toxigênicas, provavelmente devido a um excesso de antígeno (toxina), que não foi porém suficiente para tornar negativo o teste, julgamos que o mesmo pode ser realizado com sobrenadantes de culturas sem diluir. Outra possibilidade, seria a presença de inibidores do complemento presentes no meio de cultura.

Com relação ao antisoro utilizado, no teste da SRIH, o ideal seria o uso de um soro anti-LT preparado com toxina purificada, sendo esta de origem semelhante à das amostras em investigação. Isto nem sempre é possível devido às dificuldades inerentes à metodologia de purificação destas toxinas. Deste modo, na maioria dos trabalhos que estudaram testes sorológicos para detecção de LT, tem-se lançado mão da antigenicidade cruzada existente entre a enterotoxina LT e a toxina colérica (6, 7, 8). Esta última, bem como o seu respectivo antisoro, ou seja, a antitoxina colérica, podem ser obtidas comercialmente, porém, são dispendiosas. Conseqüentemente, verificamos qual a maior diluição de antitoxina que ainda era capaz de detectar amostras de *E. coli* de toxigenicidade baixa.

No caso do lote de antitoxina utilizado



(2/67B, contendo 4470 unidades/ml), verificou-se que em diluições superiores a 1:80 algumas poucas amostras deixavam de reagir no teste em questão. Conseqüentemente, se quizermos aumentar a sensibilidade e eficiência do teste nas condições investigadas, é mais recomendável que se utilize este lote de antitoxina diluído a 1:40. Esta diluição ainda que aparentemente baixa, podendo ser inclusive aumentada para o caso de antisoros mais potentes, permitiu que com cada 1 ml de antitoxina, não diluída, fossemos capazes de realizar em duplicata 800 reações, considerando-se que em cada orifício da lâmina de agarose colocávamos 25  $\mu$ l de antitoxina diluída a 1:40.

Esses dados demonstram que, o teste é bom quanto ao dispendio de antitoxina colérica.

Portanto com uma toxina colérica purificada seríamos capazes de preparar antisoros potentes em quantidade suficiente para atender as necessidades atuais dos laboratórios brasileiros, que se dedicassem, através deste teste, à detecção de colibacilos enterotoxigênicos produtores de enterotoxina LT.

O estudo sobre a influência do tempo de difusão da antitoxina colérica demonstrou uma maior sensibilidade do teste se a mesma for deixada difundir na lâmina de agarose por 48 horas ao invés de 24 horas. Todavia, esta maior sensibilidade se traduziu apenas num maior diâmetro do halo de hemólise (Tabela 4), não se observando uma variação no título final obtido.

4021/BC

Os estudos realizados sobre a eficiência do teste da SRIH frente a outras amostras de colibacilos enterotoxigênicos, que não aquelas utilizadas na padronização do mesmo, demonstraram que os resultados obtidos, foram coincidentes.

Como o intuito principal de nosso trabalho era tornar o teste da SRIH facilmente executado em laboratórios menos equipados, estudamos outras modificações, a saber:

- a. Produção de enterotoxina LT detectável pelo teste da SRIH, em culturas estacionárias

Verificamos, mais uma vez, a correlação entre o teste da SRIH e o teste da PIH. O número de amostras examinadas neste estudo comparativo foi relativamente baixo, contudo, pode-se verificar que a maioria das amostras positivas no teste de imunohemólise passiva, o foram também no teste de imunohemólise radial. Houve apenas duas amostras que foram negativas no teste da SRIH, sendo que uma delas também o foi no teste da PIH (amostra 153) (Tabela 6). A amostra restante (amostra 306), embora em cultura estacionária não tenha fornecido diâmetros de halos de hemólise compatíveis com a positividade do teste da SRIH, sendo portanto considerada não enterotoxigênica nestas condições, no teste da PIH forneceu valores de absorvância ( $A_{420}$ ) entre 0,18 e 0,25, sendo identificada como fracamente positiva.

Apesar desta discordância, que aparentemente poderia prejudicar a eficiência do teste com culturas estacionárias, somos da opinião que, para investigações epidemiológicas e trabalhos de rotina, poder-se-ia dispensar a incubação sob agitação das culturas de colibacilos a serem examinadas. Além disso, o bom rendimento e a eficiência do teste da SRIH, mesmo em culturas estacionárias, não justificariam a necessidade de um elevado investimento na aquisição de incubadoras com agitação, tornando-se pois admissível que laboratórios mais modestos possam lançar mão deste tipo de ensaio para a detecção de enterotoxina LT.

b. Avaliação do teste da SRIH na detecção de enterotoxina LT, em sobrenadantes de culturas tratados ou não pela polimixina

A polimixina B é um antibiótico facilmente conseguido, como cortesia das indústrias farmacêuticas que a produzem (WELLCOME RESEARCH LABORATORIES), entretanto pode representar uma dificuldade a mais para os laboratórios que queiram adotar o teste da SRIH para a detecção de enterotoxina LT, utilizando sobrenadantes de culturas tratados por este antibiótico. Era pois importante verificarmos se a adição de polimixina, como método de extração da enterotoxina LT era dispensável. Os resultados por nós obtidos neste particular, demonstraram que na inviabilidade de se realizar o teste da SRIH, adicionando-se polimixina no preparo das toxinas a serem examinadas, o ensaio pode ser feito omitindo-se esse tratamento, provavelmente sem prejuízo

significante dos resultados a serem obtidos (Tabelas 8 e 9).

#### 4.3 - Comentários finais

Resumidamente, esta prova, conforme se pôde verificar na metodologia descrita, é simples, sensível e permite que diversas amostras de *E. coli* possam ser examinadas por dia.

Qualquer auxiliar de laboratório, de nível médio, suficientemente treinado pode se incumbir da realização deste teste que, por sua vez, não requer nenhum equipamento especial, como por exemplo o espectrofotômetro. A padronização das hemácias de carneiro utilizadas na prova também não é feita espectrofotometricamente e a quantidade dos reagentes utilizados é baixa, conforme já comentamos com relação a antitoxina colérica.

A maior crítica que se poderia fazer ao teste seria a necessidade de se utilizar a agarose que, como é do conhecimento geral, é bastante cara. Acreditamos, todavia, que o ágar-noble ou ágar comum, que não funcionaram a contento em alguns dos experimentos preliminares realizados, poderão eventualmente substituí-lo. Aliás, já existem relatos na literatura da utilização de ágar-noble como reagente no teste da SRIH, para outros sistemas (24).

Ainda que a utilização de ágar não fosse possível, achamos que o teste, mesmo usando agarose, seria vantajoso, sob o ponto de vista econômico. Assim sendo, com

500 gramas de agarose, seria possível a realização de 50 ensaios por dia, podendo-se com esta quantidade de gel trabalhar quase dois anos.

Com uma simples leitura macroscópica pode-se identificar uma amostra de *E. coli* enterotoxigênica, bem como ter-se uma idéia de potência da enterotoxina produzida pela mesma. Desde que utilizado como descrito, o teste não mostrou nenhuma reação falso-positiva e apresentou total concordância com o teste da PIH já referido, sendo ambos mais sensíveis do que o ensaio em células Y-1.

Finalmente, apesar de não estarmos informados sobre as condições dos laboratórios menos equipados, nos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, acreditamos que o teste descrito no presente trabalho, será, sem dúvida, útil na identificação de colibacilos produtores de enterotoxina LT, porque, conforme já afirmamos, é relativamente barato, eficiente, específico e não necessita de nenhum equipamento sofisticado para sua realização.

## 5. RESUMO

Com o objetivo de oferecer a laboratórios menos equipados, e, portanto, sem infraestrutura para realizar a detecção de colibacilos enterotoxigênicos produtores de enterotoxina termolábil (LT), fêz-se uma avaliação da prova de Imunohemólise Radial (SRIH) para este fim.

Os principais resultados e conclusões obtidos a partir deste estudo podem ser assim resumidos:

5.1 - Utilizando diferentes diluições de sobrenadantes de culturas provenientes da amostra de *E. coli* 40T (incluída no grupo I, fortemente enterotoxigênica) frente a diferentes diluições de antitoxina colérica, realizou-se um estudo comparativo entre os testes da SRIH e da Imunohemólise Passiva (PIH). Verificou-se, através deste estudo, que o teste da SRIH é tão sensível quanto o da PIH, para a detecção de enterotoxina LT, quando se correlacionou o diâme-

tro (em mm) do halo de hemólise com a absorvância, a 420 nm, ou com a quantidade de hemoglobina liberada ( $\mu\text{g/ml}$ ), sendo que os valores de  $r$ , para  $n = 25$ , foram, respectivamente, 0,748 e 0,755.

Pode-se considerar como resultado positivo, no teste da SRIH, valores dos diâmetros dos halos de hemólise, superiores a 12,43 mm; valores negativos, aqueles inferiores a 11,33 mm; e duvidosos, aqueles compreendidos entre 11,33 e 12,43 mm, conforme estabelecido pelo cálculo do intervalo de Confiança.

O teste não apresentou nenhuma reação falso-positivo nas diluições de antitoxina colérica maiores (1:40 e 1:80), sendo, portanto, específico. Em diluições menores de antisoro (1:10 e 1:20), observou-se no controle negativo alguns halos, nunca superiores a 8 mm de diâmetro. É possível que estas reações se devam a anticorpos contidos na antitoxina colérica e dirigidos contra componentes extracelulares da *E. coli* K<sub>12</sub>, que se fixaram nas hemácias.

Embora os diâmetros dos halos de hemólise tenham sido maiores nos testes realizados com antitoxina colérica difundindo por 48 horas, verificou-se que o título final da reação era o mesmo. Nessas condições, julgamos desnecessário que se prolongue além de 24 horas o tempo de difusão da antitoxina colérica.

5.2 - Nos estudos realizados com a finalidade de se obter um maior rendimento e eficiência do teste, sem dimi-

nuir a sensibilidade do mesmo, visando, conseqüentemente, uma economia de reagentes e equipamentos, verificou-se que:

5.2.1 - A utilização de hemácias sensibilizadas, numa concentração final de 0,5%, permitiu que a leitura dos diâmetros dos halos de hemólise, fosse feita com maior facilidade, o que não aconteceu quando se utilizou uma concentração menor de glóbulos vermelhos.

5.2.2 - O ensaio pode ser realizado com a toxina não diluída, visto que fenômenos de prozona foram observados somente com os sobrenadantes de culturas provenientes de amostras fortemente toxigênicas, não sendo suficiente porém para tornar o teste negativo.

5.2.3 - No caso do lote de antitoxina colérica estudado (lote 2/67B) a diluição recomendada, para não se obter reações inespecíficas, e ao mesmo tempo, aumentar a sensibilidade do teste, foi de 1:40. Esta, apesar de ser aparentemente baixa, permite que sejam realizadas cerca de 800 reações com apenas 1 ml de antitoxina.

5.2.4 - O reagente mais caro requerido pela técnica é a agarose. Esta necessidade, contudo, não invalida esta prova, desde que utilizando-se este gel na concentração de 1%, com 500 gramas do mesmo pode-se proceder a realização de cerca de 50 exames diários por um período de quase dois anos.

5.2.5 - Demonstrou-se, ainda, que laboratórios sem condições de adquirir incubadoras com agitação,



podem recorrer a esta prova, para detecção de enterotoxina LT, utilizando sobrenadantes de culturas estacionárias. Por outro lado, o antibiótico polimixina B requerido para a extração da enterotoxina LT também pode ser dispensado, sem prejuízo dos resultados.

5.3 - Concluindo, com base nos resultados por nós obtidos, podemos afirmar que o teste da SRIH apresenta bom rendimento sendo tão ou mais sensível que os ensaios realizados em culturas de tecido com a finalidade de detectar a enterotoxina LT. Desde que devidamente padronizado, quanto a diluição de antitoxina colérica a ser utilizada, o teste é específico.

Graças a pequenas modificações introduzidas, tais como a observação de que a adição de polimixina não é necessária para o preparo dos extratos a serem examinados; a não necessidade de se utilizar incubadoras com agitação e, finalmente, a facilidade com que se pode obter a antitoxina colérica e complemento, somos da opinião que o teste poderá permitir que laboratórios mais modestos possam utilizar a técnica em questão com o propósito da detecção de enterotoxina LT.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ALDERETE, J.F. & ROBERTSON, D.C. Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxygenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 19:1021-1030, 1978
02. BANWELL, J.G. & SHERRY, H. Effect of bacterial enterotoxins on the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 65:467-497, 1973.
03. BRAMUCCI, M.G. & HOLMES, R.K. Radial passive immune hemolysis assay for detection of heat-labile enterotoxin produced by individual colonies of *Escherichia coli* or *Vibrio cholerae*. *J. clin. Microbiol.*, 8:252-255, 1978.
04. BRILL, B.M.; WASISLAUSKAS, B.L. & RICHARDSON, S.H. Adaptation of the staphylococcal coagglutination techni-

- que for detection of *Escherichia coli*. *J. clin. Microbiol.*, 9:49-55, 1979.
05. CASTRO, A.F.P.; SERAFIM, M.B.; GOMES, J.A. & GATTI, M. S.V. Improvements in the passive immune hemolysis test for assaying enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. clin. Microbiol.*, 12:714-717, 1980.
06. CLEMENTS, J.D. & FINKELSTEIN, R.A. Immunological cross-reactivity between a heat-labile enterotoxin(s) of *Escherichia coli* and subunits of *Vibrio cholerae* enterotoxin. *Infect. Immun.*, 21:1036-1039, 1978.
07. CLEMENTS, J.D. & FINKELSTEIN, R.A. Demonstration of shared and unique immunological determinants in enterotoxin from *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 22:709-713, 1978.
08. CLEMENTS, J.D.; YANCEY, R.J. & FINKELSTEIN, R.A. Properties of homogeneous heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 29:91-97, 1980.
09. DONTA, S.T. Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. *Science*, 133:334-335, 1974.
10. DUPONT, H.L.; FORMAL, S.B.; HORNICK, R.B.; SNYDER, M. J.; LIBONATI, J.P.; SHEAHAN, D.G.; LA BREC, E.H. & KALAS, J.P. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *New Engl. J. Med.*, 285:1-9, 1971.

11. EVANS, D.G.; EVANS, D.J., Jr.; PIERCE, N.F. Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 7:873-880, 1973.
12. EVANS, D.G.; SILVER, R.P.; EVANS, D.J.; CHASE, D.G. & GORBACH, S.L. Plasmid-Controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. *Infect. Immun.*, 12:656-667, 1975.
13. EVANS, D.G.; EVANS, D.J., Jr.; & WEILIE, T. Hemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor. *Infect. Immun.*, 18:330-337, 1977.
14. EVANS, D.G.; EVANS, D.J., Jr.; & DuPONT, H.L. Virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 136:118-123, 1977.
15. EVANS, D.J., Jr.; CHEN, L.C.; CURLIN, G.T. & EVANS, D. G. Stimulation of adenyl cyclase by *Escherichia coli* enterotoxin. *Nature New Biol.*, 236:137-138, 1972.
16. EVANS, D.J., Jr.; EVANS, D.G. & GORBACH, S.L. Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect. Immun.*, 8:725-730, 1973.

17. EVANS, D.J., Jr. & EVANS, D.G. Direct serological assay for the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*, using passive immune hemolysis. *Infect. Immun.*, 16: 604-609, 1977.
18. FORGER, J.M., III & GILFILLAN, R.F. Single-radial hemolysis as a cost-effective determinant of rubella antibody status. *J. clin. Microbiol.*, 9:115-119, 1979.
19. FRANCESCHI, A.P.; CASTRO, A.F.P. de; SERAFIM, M.B. & PUSTIGLIONE, L. NETTO. Estudos comparativos entre o teste de alça ligada do intestino do coelho e do camundongo recém-nascido na detecção da enterotoxina termoestável (ST) produzida por *Escherichia coli*. *Rev. Microb. São Paulo*, 8:123-128, 1977.
20. GIANNELLA, R.A. & DRAKE, W. Effect of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin on intestinal cyclic nucleotide metabolism and fluid secretion. *Infect. Immun.*, 24:19-23, 1979.
21. GREEMBERG, H.B.; SACK, D.A.; RODRIGUES, W.; SACK, R.B.; WYATT, R.; KALICA, A.R.; HORSWOOD, R.L.; CHANOCK, R. M. & KAPIKIAN, A.Z. Microtiter solid-phase radioimmunoassay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* 17:541-545, 1977.
22. GUERRANT, R.L. & BRUNTON, L.L. Characterization of the chinese hamster ovary cell assay for the enterotoxin of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* and for

- antitoxin: differential inhibition by gangliosides, specific antisera, and toxoid. *J. Infect. Dis.*, 135: 720-728, 1977.
23. GYLES, J.M.; SO, M. & FALKOW, S. The enterotoxin plasmids of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 130:40-49, 1974.
24. HIRAMOTO, R.N.; MCGHEE, J.R.; HURST, D.C. & HAULIN, N. M. A study of the single radial hemolysis in gel system - I. Factors affecting the model. *Immunochemistry*, 8:335-365, 1971.
25. HUGHES, J.M.; MURAD, F.; CHANG, B. & GUERRANT, R. L. Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Nature*, 271:755-756, 1978.
26. MAYER, M.M.; OSLER, A.G.; BIER, O. & HEIDELBERGER, M. Quantitative studies of complement fixation. I. A method. *J. Immunol.*, 59(2):195, 1948.
27. SACK, R.B.; GORBACH, S.L.; BAUWELL, J.G.; JACOBS, B.; CHATTERJEE, B.D. & MITRA, R.C. Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with severe cholera-like disease. *J. Infect. Dis.*, 123:378-385, 1971.
28. SACK, R.B. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *A.Rev. Microbiol.*, 29:333-

353, 1975.

29. SACK, D.A.; KAMINSKI, D.C.; SACK, R.S.; WAMDLA, I. O.; ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I.; SLACK, R.C.B.; ARTHUR, R. R. & KAPIKIAN, A.Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea of travellers: A prospective study of american peace corps volunteers. *John Hopkins Med. J.*, 141:63-70, 1977.
30. SANTOS, D.; PALCHANDHURI, S. & MAAS, W.K. Genetic and physical characteristics of an enterotoxin plasmid. *J. Bacteriol.*, 124:1240-1247, 1975.
31. SCHILD, G.C.; PEREIRA, M.S.; CHAKRAVERTY, P. Single radial-haemolysis: a new method for the assay of antibody to influenza haemagglutinin. *Bull. Wld Hlth Org.*, 52:43-50, 1975.
32. SERAFIM, M.B.; CASTRO, A.F.P.; REIS, M.H.L. & TRABULSI, L.R. Passive immune hemolysis for detection of heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli* isolated from different sources. *Infect. Immun.*, 24: 606-610, 1979.
33. SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. *Statistical Methods*. 6. ed. Iowa, State University Pr, 1969 vol. 1 p. 159.
34. SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S. & KONOWALCHUK, J. Assay of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with VERO

- cells. *Infect. Immun.*, 16:617-622, 1977.
35. STIRM, S.; ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I. & BUCH-ANDERSON, A. Episome carried surface antigen K<sub>88</sub> of *E. coli*. III. Morphology. *J. Bacteriol.*, 93:740-748, 1967.
36. TEUNEY, J.H.; SMITH, T.F. & WASHINGTON, J.A. II. Sensitivity, precision & accuracy of the Y-1 adrenal cell enterotoxin assay. *J. clin. Microbiol.*, 9:197-199, 1979.
37. YOLKEN, R.H.; GREEMBERG, H.B.; MERSON, M.H.; SACK, R.B. & KAPIKIAN, A.L. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J. clin. Microbiol.*, 6:439-444, 1977.
38. WEILER, E.; MELLETZ, E.W. & BREUNINGER-PECK, E. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 54:1310, 1975.