

APARECIDA CELLI DE ALMEIDA SAID

Este exemplar corresponde à redação final da
tese defendida pela aluna Aparecida Celli de Al-
meida Said e aprovada pela comissão julgadora
Grau: = "Excelente"

1109/86

Marlene Graeflin

AVALIAÇÃO DOS TESTES DE IMUNOHEMÓLISE PASSIVA (IHP) E BIKEN
NA DETECÇÃO DE ENTEROTOXINA TERMOLÁBIL (LT) EM AMOSTRAS
DE *Escherichia coli* DE DIFERENTES ORIGENS

Tese de Mestrado
apresentada ao Cur-
so de Pós-Gradua-
ção em Imunologia
da Universidade Es-
tadual de Campinas
(UNICAMP) para ob-
tenção do grau de
Mestre

CAMPINAS

1986

U N I C A M P

Aos meus pais
e ao Amir

Profa. Dra. MARLENE BRAIDE SERAFIM

Orientadora

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas.

Para a sua realização nos foi concedida bolsa de mestrado pela Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Auxílio financeiro ao projeto foi também concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando
Pestana de Castro que muito
contribuiu nesta tese, meus
agradecimentos.

À Dária e ao Luís minha
gratidão pela amizade.

AGRADECIMENTOS

Profa. Dra. Marlene Braide Serafim

Profa. Dra. Regina F. de Toledo

Prof. Dr. Tomomasa Yano

Prof. Dr. Fawzi A. M. Dawood

Prof. Dr. José de Carvalho

Dr. Armando Conagin

Profa. Lucila Costallat Ricci

Profa. Maria Sílvia Viccari Gatti

Izildinha Greggio Colli

Maria Helena Seabra Soares de Britto

Lim Hui Lien

Norma Said

Colegas e funcionários do Departamento de Microbiologia

e Imunologia da UNICAMP

ÍNDICE

	Página
I- INTRODUÇÃO	1
II- MATERIAL E MÉTODOS	8
1. Amostras	8
2. Meios de cultura	9
2.1. Meio de "Brain Heart Infusion" (BHI)	9
2.2. Meio de Mundell	9
2.3. Meio de "Casamino Acids Yeast Extract" (CAYE)	9
2.4. Meio de Biken	10
3. Soluções tampão	11
3.1. Tampão TEAN (tris hidroximetil-ami- nometano, ácido etilenodiaminotetra cético, azida sódica e NaCl)	11
3.2. Tampão fosfato salina 0,04 M pH 6,7	11
3.3. Tampão tris HCl 0,01 M NaCl 0,9% ..	12
3.4. Tampão trietanolamina	12
4. Outros reagentes e soluções utilizados ..	12
4.1. Solução de polimixina B (para uso no teste de IHP)	12
4.2. Solução de polimixina B (para uso no texto de Biken)	13

	Página
4.3. Hemácias de carneiro	13
4.4. Complemento	13
5. Extração da enterotoxina LT pela poli- mixina	13
6. Purificação da enterotoxina LT	14
7. Obtenção dos antissoros	18
8. Titulação dos antissoros	21
9. Teste de Imunohemólise Radial Modificado (IHR)	21
10. Teste de Imunohemólise passiva (IHP)	23
11. Teste de Biken	25
III. RESULTADOS	26
1. Purificação da enterotoxina LT	26
2. Titulação dos antissoros	27
3. Comparação entre os testes de IHP e Biken na detecção de amostras de <u>Escherichia</u> <u>coli</u> produtoras de LT	29
3.1. Amostras de origem suína	30
3.2. Amostras de origem humana	32
3.3. Amostras de alimentos	33
3.4. Amostras de água de rio	33
IV- DISCUSSÃO	42
V- RESUMO E CONCLUSÕES	52
VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

I- INTRODUÇÃO

A Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC) é um importante agente etiológico de doenças diarréicas que acometem o homem e animais de várias espécies (28, 50, 52).

Essa ação patogênica decorre da elaboração simultânea, ou não, de duas enterotoxinas distintas, uma termolábil e por isso designada LT e a outra termoestável conhecida como ST.

Para que estas toxinas exerçam a sua ação a nível intestinal, com conseqüente produção de diarréia, é necessário que as células bacterianas possuam estruturas capazes de fixá-las a receptores específicos localizados nos enterócitos da mucosa intestinal do hospedeiro.

As estruturas responsáveis pela aderência da ETEC aos receptores intestinais são antígenos localizados na superfície da célula bacteriana, que tem a estrutura de fímbria. Estas fímbrias são denominadas fatores de colonização, adesinas ou antígenos de aderência. Foram inicialmente identificados em amostras de ETEC patogênicas para suínos e receberam a denominação de K88 (36, 37), sendo atualmente conhecidas as

variedades K88 ab, K88 ac e K88 ad. Em 1977, foi descrito o antígeno P987, também identificado em amostras originárias de suínos(35). O antígeno K99(41, 43, 46), inicialmente relatado para amostras de E. coli de origem bovina e ovina, foi posteriormente identificado como sendo importante em amostras de origem suína(42). Em 1982, foi descrito o antígeno F41(21), encontrado em amostras de origem bovina e suína. Em amostras de Escherichia coli de origem humana, até hoje foram caracterizados os antígenos CFA/I(13,14), CFA/II(12), e E8775(61). Recentemente, Yano et alii (62) descreveram um novo antígeno (F42) encontrado em amostras de Escherichia coli de origem suína.

Outros antígenos de aderência têm sido ultimamente descritos em amostras de Escherichia coli de origem humana, porém, não está ainda definida a importância desses antígenos no processo de colonização do intestino do hospedeiro(22). Com exceção da fímbria P987, a produção de antígenos de aderência assim como a de enterotoxinas, são codificadas por genes presentes no DNA extra-cromossômico (plasmídios) (30, 53).

A enterotoxina ST, uma das responsáveis pela produção de diarreia, é um peptídeo de baixo peso molecular (1000-6000), resistente ao aquecimento a 100°C por 30 min e imunogênica somente quando acoplada a uma proteína carreadora(11, 26).

Existem pelo menos dois tipos de ST: a STa ou STI, solúvel em metanol e ativa em camundongos recém-nascidos e

leitões de um a três dias de idade(2), e a STb ou STII, insolúvel em metanol e com atividade somente em alça ligada de leitões já desmamados (7 a 9 semanas) (2). Ambas são antigênicas e geneticamente diferentes(20, 55).

A atividade biológica da STa é devido a sua ligação a receptores, aparentemente de natureza proteica, localizados nas células epiteliais da mucosa intestinal(11). Uma vez acoplada a esses receptores, ela ativa a enzima guanilciclase, que promove a elevação dos níveis de GMP cíclico, o que resulta em um aumento da secreção intestinal com produção de diarreia(26). O mecanismo de ação de STb é desconhecido e parece não envolver aumento nos níveis de nucleotídeos cíclicos(19).

Para a detecção da enterotoxina STa, o teste rotineiramente empregado é o teste de Dean, conhecido como teste do camundongo recém-nascido(9). A técnica de alça ligada de intestino de coelho(42) foi a primeira a ser utilizada na detecção dessa enterotoxina, porém, os resultados obtidos através desse método parecem ser bastante inconsistentes(18). Outros métodos "in vitro", como radioimunoensaio(20) e a técnica de hibridização de colônias(44), também tem sido empregados, porém, não na rotina laboratorial.

Por outro lado, a enterotoxina LT produzida por amostras de Escherichia coli enterotoxigênica, é uma proteína de alto peso molecular(91.000), termolábil e imunogênica, e assemelha-se à toxina colérica em inúmeros aspectos(6, 7).

Estruturalmente, a toxina colérica e a LT, são constituídas por duas subunidades, A e B, sendo A formada por uma única cadeia polipeptídica, que pode ser desdobrada nos fragmentos A₁ e A₂ após tratamento enzimático, e B disposta sob a forma de cinco cadeias polipeptídicas(24).

Quanto ao mecanismo de ação, esse também é idêntico tanto para a LT como para a toxina colérica, sendo a subunidade B a responsável pela ligação da toxina ao seu receptor, o gangliosídeo GM1, localizado na superfície de enterócito. A seguir, ocorre a penetração da subunidade A na célula da mucosa intestinal, que provoca a ativação da adenilciclase levando ao acúmulo de AMP cíclico intracelular, propiciando o aumento de líquido no lúmen intestinal e aparecimento de diarréia(23).

As relações antigênicas entre a enterotoxina termolábil LT de Escherichia coli e a toxina produzida pelo Vibrio cholerae foram inicialmente estudadas por Gyles & Barnum(29), que demonstraram a neutralização da atividade da LT suína, em alça ligada de intestino de porco, usando antissoro contra Vibrio cholerae.

Na mesma época Smith & Sack(54) também mostraram a existência de similaridades antigênicas entre a LT e a enterotoxina colérica, usando o teste de alça ligada de intestino de coelho.

Em 1978, Clements & Finkelstein demonstraram que a identidade antigênica, entre as duas toxinas, reside em ambas

as subunidades, A e B(4). Posteriormente, estes autores de monstraram que a LT não só tem determinantes antigênicos em comum com a toxina colérica, como também que as duas toxinas possuem determinantes antigênicos únicos(5).

Os primeiros métodos descritos para a detecção da enterotoxina LT foram baseados na sua atividade biológica, como o teste em alça ligada de intestino de coelho(42) e de outros animais(39, 51), e o teste de permeabilidade capilar(16).

Posteriormente, foram realizados ensaios em cultura de tecidos utilizando-se células de ovário de hamster chinês (CHO) (27), células tumorais de adrenal de camundongos (Y-1)(10, 47), e células tumorais de rim de macaco (VERO) (56).

Com base nas similaridades antigênicas existentes entre as toxinas LT e colérica, foram desenvolvidos inúmeros testes sorológicos para a detecção de LT, que utilizam a antitoxina colérica em lugar da antitoxina LT.

Assim sendo, em 1977, Evans & Evans(15) e mais tarde Serafim et alii(49) desenvolveram o teste de imunohemólise passiva (IHP), no qual hemácias de carneiro são sensibilizadas com a enterotoxina LT, sem necessidade de qualquer ligante, e posteriormente expostas à antitoxina colérica e complemento, observando-se então a reação entre o antígeno e seu anticorpo específico, com o rompimento da hemácia e liberação de hemoglobina, pela ação do complemento de cobraia adicionado

em excesso na reação.

Posteriormente, Castro et alii(3) introduziram modificações que aumentaram a sensibilidade do teste, principalmente na detecção de amostras enterotoxigênicas de Escherichia coli, originárias de suínos.

A seguir, outras reações de imunohemólise decorrentes do teste de IHP, tais como imunohemólise radial(48) e imunohemólise radial modificada(63), foram desenvolvidas. Como esses testes ainda requerem alguma infra-estrutura, esforços tem sido feitos no sentido de se estabelecerem provas laboratoriais mais simples e igualmente eficientes na detecção de amostras de Escherichia coli produtoras de LT.

Com isso, inúmeras técnicas tem sido propostas como a hemaglutinação passiva reversa(38), coaglutinação por estafilococos(1), teste imunoenzimático (ELISA) (58) e radioimunoensaio(25), mas todas elas apresentam inconvenientes, tais como a utilização de equipamentos sofisticados ou o uso de reagentes de alto custo, não sendo portanto indicadas para uma rotina laboratorial, principalmente por parte de laboratórios pouco equipados.

Em 1981, Honda et alii(32) adaptaram o teste de ELEK para a detecção da enterotoxina LT, denominando-o teste do Biken. Este método pareceu identificar amostras de Escherichia coli produtoras de LT de uma maneira simples e eficaz, eliminando, inclusive, o uso de aparelhos para leitura dos resultados. Segundo seus idealizadores, o teste de

Biken, mostrou-se bastante adequado para ser utilizado em laboratórios com poucos recursos. Além disso, esse teste possibilitava uma investigação das relações antigênicas entre as diferentes LTs.

Diferenças antigênicas, entre as LTs de origem humana e suína, já haviam sido observadas nos trabalhos de Serafim et alii(49).

Recentemente Honda et alii(33, 34, 60) demonstraram que as LTs suína e humana, embora estejam relacionadas antigenicamente, não são idênticas, e aprofundando seus estudos propuseram um esquema antigênico para as três enterotoxinas: colérica, LT de origem humana e LT de origem suína(59).

Tendo em vista a facilidade com que o teste de Biken pode ser realizado em laboratórios menos equipados, tivemos como objetivo nesse trabalho analisar essa prova como meio de identificação de amostras de Escherichia coli produtoras de LT, comparando-a com o teste de imunohemólise passiva, rotineiramente usado por nós na detecção da LT.

1. Amostras

Foram estudadas 64 amostras de Escherichia coli, sendo 40 de origem suína, produtoras de LT e pertencentes ao Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP. As demais amostras, de origem humana (17 amostras), de alimentos (4 amostras) e de água de rio (3 amostras), também produtoras de LT, foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. L.R. Trabulsi, da Escola Paulista de Medicina. Utilizamos como controle negativo a amostra padrão de Escherichia coli K 12, não enterotoxigênica e de origem humana. Como controles positivos foram usadas as amostras, 40T e 0149/8, produtoras de LT, sendo a primeira de origem humana e a segunda de origem suína. Nos processos de purificação da LT humana e suína, as amostras escolhidas foram: H-10407 (humana) e 0149/32 (suína).

Durante toda realização do trabalho as amostras em estudo foram mantidas a -20°C no meio de Brain Heart Infusion (BHI) com 15% de glicerol.

2. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados eram originários da DIFCO ou BBL, enquanto que os demais reagentes procediam da MERCK, CARLO ERBA, REAGEN ou SIGMA.

2.1. Meio de "Brain Heart Infusion" (BHI)

2.2. Meio de Mundell (45)

Glicose	0,25%
Casaminoácidos	2%
Extrato de levedura	0,6%
Cloreto de sódio	0,25%
Fosfato de potássio bibásico	0,671%
Solução de sais (Cloreto de manganês 0,5%; Cloreto férrico 0,5%; H ₂ SO ₄ 0,0001 N)	0,1%
Água destilada q.s.p.	1000 ml

O pH do meio foi ajustado para 8,5, com hidróxido de sódio 1N, sendo o meio esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, adicionou-se assepticamente cloridrato de lincomicina (UPJOHN) na concentração de 90 ug/ml (40).

2.3. Meio de "Casamino Acids Yeast Extract" (CAYE) (17)

Casaminoácidos	2%
Extrato de levedura	0,6%
Cloreto de sódio	0,25%

Solução de sais (Sulfato de magnésio 5%; Cloreto de manganês 0,5%; Cloreto férrico 0,5% em H ₂ SO ₄ 0,0001 N)	0,1%
Água destilada q.s.p.	1000 ml

O pH do meio foi ajustado para 8,5 com hidróxido de sódio 1N e o meio esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

2.4. Meio de Biken (32)

Casaminoácidos	2%
Extrato de levedura	1%
Fosfato de potássio bibásico	1,5%
Glicose	1,5%
Cloreto de sódio	0,25%
Ágar "Noble"	1,5%
Solução de sais (Sulfato de magnésio 5%; Cloreto de cobalto 2%; Cloreto férrico 0,5% em água destilada)	0,1%
Água destilada q.s.p.	1000 ml

O pH do meio de cultura, quando necessário, foi ajustado para 7,4 com hidróxido de sódio 1N. Após esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos, foi acrescentado assepticamente, ao meio já resfriado, cloridrato de lincomicina (40) na concentração de 90 ug/ml.

3. Soluções tampão

Os sais utilizados e demais reagentes eram de fabricação MERCK, SIGMA, REAGEN ou CARLO ERBA.

3.1. Tampão TEAN (tris hidroximetil-aminometano, ácido etilenodiaminotetracético, azida sódica e NaCl) (4)

Trizma base	6,057 g
EDTA	0,3362 g
Azida sódica	0,19506 g
Cloreto de sódio	11,69 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

O pH do tampão foi ajustado para 7,4 com ácido clorídrico 1N.

3.2. Tampão fosfato salina 0,04M pH 6,7

Solução de fosfato de sódio mono-básico 0,2M	22,6 ml
Solução de fosfato de sódio bibásico 0,2M	17,4 ml
Cloreto de sódio	1,8 ml
Água destilada q.s.p.	200 ml

3.3. Tampão tris HCl 0,01M NaCl 0,9%

Trizma base	1,2114 g
Solução de Cloreto de sódio 3M	50 ml
Água destilada q.s.p.	1000 ml

O pH do tampão foi ajustado para 8,6 com ácido clorídrico 0,1N.

3.4. Tampão trietanolamina

Sulfato de magnésio	1,232 g
Cloreto de cálcio	0,2 g
Cloreto de sódio	75 g
Trietanolamina	28 ml
Água destilada q.s.p.	1000 ml

O pH do tampão foi ajustado para 7,4 com ácido clorídrico 1N. Para ser usado no teste de imunohemólise passiva (IHP) o tampão foi diluído 10 vezes em água destilada, acrescentando-se 0,05% de gelatina.

4. Outros reagentes e soluções utilizados

4.1. Solução de polimixina B (para uso no teste de IHP)

Sulfato de polimixina (Welcome Burroughs, England)	0,220 g
Tampão fosfato salina 0,04M pH 6,7	100 ml

- 4.2. Solução de polimixina B (para uso no teste de Biken)
- | | |
|--|--------|
| Sulfato de polimixina (Welcome Burroughs, England) | 1 g |
| Água destilada q.s.p. | 100 ml |

4.3. Hemácias de carneiro

O sangue de carneiro foi coletado em solução estéril de Alsever, volume a volume, por punção da veia jugular do animal.

Foi em seguida distribuído em alíquotas de 5 ml, que foram mantidas a 4°C e utilizadas dentro de um prazo máximo de 45 dias.

4.4. Complemento

Como fonte de complemento foi utilizada uma mistura de soros provenientes de 30 cobaias adultas normais, que foram sangradas por punção cardíaca.

O complemento foi estocado em alíquotas de 1 ml mantidas a -20°C até o momento do uso.

5. Extração da enterotoxina LT pela polimixina

A extração da enterotoxina LT pela polimixina foi realizada segundo o método descrito por Evans et alii(17).

As amostras em estudo foram semeadas em Erlenmeyers de 125 ml contendo 10 ml de meio de CAYE, e incubadas a 37°C em estufa com agitação (150 rpm), por 18 horas. A cada cultura foi adicionado 1 ml de uma solução de polimixina B na concentração final de 0,22 mg/ml de meio, incubando-se novamente a 37°C, em estufa com agitação (150 rpm) por mais de 15 minutos. As culturas foram então centrifugadas a 3000 rpm por 40 minutos a 4°C.

Os sobrenadantes de cultura, assim obtidos, foram cuidadosamente retirados com pipetas Pasteur e conservados a -20°C até o momento da realização do teste de IHP.

6. Purificação da enterotoxina LT

Essa técnica foi realizada de acordo com o método descrito por Clements & Finkelstein (6).

Inicialmente amostras de Escherichia coli produtoras de LT, de origem humana e suína, foram tituladas pelo teste de IHP, com soro antitoxina colérica diluído 1:40.

A escolha das amostras com as quais se prepararam os extratos de LT para a purificação, recaiu sobre aquelas que forneceram um título elevado (superior a 1:64) no teste de IHP. A amostra de origem suína ou humana selecionada foi cultivada em

15 ml de meio de Mundell e incubada por 6 horas a 37°C.

Essa pré-cultura foi semeada num microfermentador de bancada (Microferm Fermentor - MF 114 - New Brunswick Scientific Co. Inc.) contendo 3000 ml de meio de Mundell, e incubada a 37°C com aeração vigorosa (15 psi) a 200 rpm, por 18 horas. Após uma hora de incubação, foi acrescentada ao cultivo, 90 ug/ml de uma solução de cloridrato de lincomicina.

Completado o tempo de incubação, a cultura foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C, sendo o seu sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspenso em 100 ml de tampão tris - HCl 0,01M, NaCl 0,9%. Essa preparação foi mantida em banho de gelo e submetida a ultra-som (Heat Systems Ultrasonics, Inc. - W 185 - Branson Sonic Power Co.) com 50 watts de voltagem por 18 minutos, em três períodos interrompidos de seis minutos cada um.

Após a sonicação, foi realizada nova centrifugação a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado do sedimento que foi dispensado, e ao sobrenadante, imerso em banho de gelo e sob agitação constante, foi adicionado lentamente sulfato de amônia, até atingir uma concentração de 60%.

Esse material foi então mantido por 2 horas a 4°C, sendo a seguir centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C, eliminando-se o sobrenadante e ressuspendendo-se o sedimento em 80 ml de tampão TEAN.

Esse preparado foi dialisado contra 10 volumes do mesmo tampão, numa temperatura de 4°C, com agitação, até a eliminação total do sulfato de amônia (aproximadamente 48 horas), que foi verificada adicionando-se algumas gotas do reativo de Nessler no tampão da diálise.

Posteriormente, em coluna (90 X 2 cm) de Bio Gel A5m (Bio Rad Laboratories - Richmond, California) equilibrada com tampão TEAN e mantida constantemente a 4°C, aplicou-se 80 ml do material dialisado.

A eluição desse material procedeu-se com 250 ml de tampão TEAN, sendo feito um controle de eluição das proteínas não adsorvidas à coluna, através de leitura espectrofotométrica (espectrofotômetro Carl Zeiss - PMQ II - cubeta de quartzo caminho ótico 1 cm) a 280 nm, das frações coletadas.

A etapa seguinte foi a lavagem da coluna com mais 250 ml de tampão TEAN, porém, agora acrescido de D-galactose 0,3M, para que a LT adsorvida

ao gel fosse eluída.

O volume coletado por tubo foi de 5 ml, sendo o conteúdo de cada tubo analisado quanto a presença de LT por leitura espectrofotométrica (espectrofotômetro Carl Zeiss - PMQ II - cubeta de quartzo caminho ótico 1 cm) a 280 nm e pelo teste de imunohemólise radial modificado (IHR).

Utilizou-se esse teste na detecção da enterotoxina LT nas frações coletadas durante a purificação, porque o número de frações a serem examinadas era muito grande, e o teste de IHR modificado além de ser de fácil execução não necessita do uso de aparelhos para leitura dos resultados, permitindo o exame rápido de um grande número de frações.

As frações nas quais detectou-se LT foram reunidas e concentradas até 2 ml por ultrafiltração em membrana AMICON PM-10 (Amicon Corp., Lexington, Mass.), a uma pressão de nitrogênio de 70-80 psi.

Quando necessário, essa preparação foi estocada a -20°C e posteriormente aplicada a uma coluna (9,5 X 1,3 cm) de Sephacryl S-200, mantida a 4°C e equilibrada com tampão TEAN.

O material foi eluído com 250 ml desse mesmo tampão, e as frações coletadas automaticamente (coletor de frações LKB-2070 Ultrarac - Sweden) foram lidas no espectrofotômetro (Carl Zeiss - PQM II

- cubeta de quartzo caminho ótico 1 cm) a 280 nm, e analisadas no teste de IHR quanto à presença de LT.

As frações contendo LT foram identificadas e reunidas para concentração até 2 ml por ultrafiltração em membrana AMICON PM-10 (Amicon Corp., Lexington, Mass.), a uma pressão de nitrogênio de 70-80 psi.

A LT purificada foi então conservada a -20°C para posterior verificação de sua atividade através de eletroforese em gel de poliacrilamida (8) e teste de IHR modificado.

7. Obtenção dos antissoros

Os antissoros anti-LT humano (anti-LTh), anti-LT suíno (anti-LTs), anti-toxina colérica (anti-TC) e anti-coleragenóide (anti-Cg), foram obtidos através da imunização dos animais com LT humana e LT suína purificadas, de acordo com Honda et alii (33).

O soro anti-LTh foi obtido inoculando-se intramuscularmente em coelhos adultos (de 2 kg aproximadamente) 25 ug de toxina LT humana purificada, diluída em 1 ml de PBS 0,01M (pH 7,4) e emulsionada com igual volume de adjuvante completo de Freund (DIFCO).

O teor de proteína da toxina foi previamente dosado pelo método de Lowry modificado (31).

Nos 25º e 50º dias, os animais receberam por via intramuscular, novas doses de 25 ug de toxina emulsionadas em adjuvante incompleto de Freund (DIFCO). A sangria de prova foi realizada no 60º dia.

Foi considerado como título do soro, a maior diluição do mesmo, capaz de causar uma hemólise correspondente à $A_{420} = 0,17$ no teste de IHP.

O soro anti-LTs foi obtido seguindo-se esse mesmo esquema de imunização, porém, com a toxina LT suína purificada.

Para obtenção de soro anti-TC, inoculou-se em um cavalo, por via intramuscular, 200 ug de toxina colérica purificada (gentilmente cedida pelo Dr. Carl E. Miller, Enteric Diseases Program Officer, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA), diluída em 1 ml de solução salina 0,15M e emulsionada no mesmo volume de adjuvante completo de Freund (DIFCO).

Após 25, 50 e 75 dias foram administradas novas doses de 150 ug emulsionadas em adjuvante incompleto de Freund (DIFCO).

O animal foi sangrado para prova, por punção da veia jugular 15 dias após a última inoculação.

ção, e o soro obtido titulado pelo teste de IHP.

Conseguindo-se um título superior a 1:80, realizava-se a sangria final, obtendo-se de 1000 a 1500 ml de sangue.

Caso o título estivesse abaixo de 1:80 o animal recebia uma dose de reforço de 150 ug de toxina, emulsionada em adjuvante incompleto de Freund.

Vinte dias após esta inoculação era feita nova sangria de prova, e o soro titulado pelo teste de IHP. Confirmado o nível de antitoxina mencionado acima, procedia-se a sangria.

O cavalo para esta finalidade tem sido mantido pelo Jockey Club de São Paulo, em seu haras de Campinas, e através de doses de reforço constantes (a cada 6 meses - 1 ano) nos tem suprido com antitoxina colérica para os nossos trabalhos, inclusive o presente.

O soro anti-Cg, que foi obtido inoculando-se a subunidade B da toxina colérica em animais, nos foi cedido pelo Dr. Carl E. Miller.

8. Titulação dos antissoros

Os antissoros anti-LTh, anti-LTs, anti-TC e anti-Cg, antes de serem utilizados na detecção de LT em amostras de Escherichia coli de diferentes origens, foram titulados no teste de Biken frente as amostras padrões 40T e 0149/8.

As mesmas titulações foram realizadas no teste IHP, frente aos extratos brutos das amostras 40T e 0149/8. No teste de Biken os soros foram diluídos até 1:16, enquanto que no teste de IHP foram feitas diluições até 1:1024.

9. Teste de imunohemólise radial modificado (IHR)

O teste de imunohemólise radial modificado foi realizado de acordo com Yano et alii (63).

À uma solução de agarose (Sigma Chemical Co.) a 1% em tampão trietanolamina, adicionou-se uma suspensão de hemácias de carneiro a 5% no mesmo tampão, para se obter uma concentração final de 0,5%. A mistura foi agitada até ficar completamente homogênea e vertida sobre placas de plástico retangulares (10 x 16 cm), sendo deixadas a

temperatura ambiente para solidificação.

Orifícios de 4 mm de diâmetro foram escavados no suporte de agarose, colocando-se em cada um deles 0,02 ml dos extratos de cultura a serem examinados.

As placas foram incubadas em câmara úmida a temperatura ambiente ou a 4°C por aproximadamente 12 horas, quando então foram colocados nos orifícios 0,02 ml de soro anti-TC, incubando-se novamente as placas em câmara úmida a 37°C ou a temperatura ambiente por 4 a 5 horas.

A seguir, complemento de covaia diluído 1:10 em tampão trietanolamina foi colocado sobre toda a superfície da placa de agarose e feita incubação em câmara úmida a 37°C por 4 horas.

Após esse tempo, o excesso de complemento foi removido das placas, e realizada a leitura através da medida dos diâmetros dos halos de hemólise.

10. Teste de Imunohemólise Passiva (IHP)

O teste de IHP foi realizado, seguindo-se as indicações de Serafim et alii(49) e Castro et alii(3).

A única alteração introduzida por nós foi a substituição do tampão veronal, cujos reagentes são de difícil aquisição, pelo tampão trietanolamina, o que em nada influi na eficiência do teste, para a detecção de amostras produtoras de LT.

Hemácias de carneiro foram lavadas 3 vezes com tampão trietanolamina, fazendo-se a seguir uma suspensão das mesmas a 5% nesse tampão. Essa suspensão foi padronizada de tal maneira que, quando diluída 1:20 em água destilada, e lida em espectrofotômetro (Micronal-B295 II) em cubetas de 13 X 130 a 550 nm, desse uma absorbância de 0,42, o que corresponderia a 2×10^9 células por ml.

Os soros anti-LTs, anti-LTh, anti-TC e anti-Cg, de acordo com resultados preliminares foram utilizados nas diluições 1:80, 1:10, 1:80 e 1:20, respectivamente.

Tubos em duplicata, contendo 0,05 ml de tampão trietanolamina, com igual volume de extrato de cultura e mais 0,1 ml de suspensão padronizada de hemácias de carneiro, foram incubados em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Adicionou-se a seguir 0,1 ml de antissoro,

e incubou-se novamente em banho-maria a 37°C por 30 minutos.

Após esse tempo, foram adicionados 0,1 ml de complemento diluído 1:10 em tampão trietanolamina e mais 3,6 ml do mesmo tampão, incubando-se os tubos em banho-maria a 37°C por 60 minutos.

Findo esse tempo, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C. A leitura dos sobrenadantes foi realizada em espectrofotômetro (Micronal - B 295 II) em cubetas de 13 X 130, a 420 nm.

Consideraram-se positivas aquelas reações cuja liberação de hemoglobina foi igual ou maior que 30 ug/ml, o que significa uma absorbância igual ou maior a 0,17.

Os seguintes controles foram utilizados nesse teste:

- a) Controle da toxina extraída pela polimixina (extrato da cultura, hemácias de carneiro, tampão).
- b) Controle de antissoro (hemácia de carneiro, antissoro, complemento, tampão).
- c) Controle do complemento (extrato da cultura, hemácias de carneiro, complemento, tampão).

11. Teste de Biken

O teste de Biken foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Honda et alii (32).

Em placas de Petri (90 X 15 mm) contendo o meio de Biken numa espessura de aproximadamente 5 mm, foram semeadas as amostras de Escherichia coli em estudo. A semeadura foi feita em duplicata, e as amostras foram posicionadas lado a lado, formando-se um círculo com quatro amostras. Após incubação a 37°C por 48 horas, um disco de papel de filtro estéril (CECON) de 7 mm de diâmetro e saturado com 20 ul de solução de polimixina, foi colocado sobre cada uma das áreas de crescimento, e feita nova incubação a 37°C por 4 a 5 horas.

A seguir em orifícios localizados centralmente em relação às áreas de crescimento das amostras semeadas, foram colocados 0,02 ml de antissoro, e as placas mantidas a 37°C por 48 horas.

Todas as amostras foram examinadas frente aos soros anti-LTs, anti-LTh, anti-TC e anti-Cg não diluídos.

As leituras foram realizadas com 24 e 48 horas sendo que as amostras produtoras de LT apresentaram linha de precipitação entre a zona de crescimento bacteriano e o orifício contendo antissoro.

III- RESULTADOS

1. Purificação da Enterotoxina LT

Conforme descrito em material e métodos 80 ml de extrato bruto de enterotoxina LT de origem humana ou suína, foram aplicados em uma coluna de BIO GEL A5m. A eluição desses materiais no que concerne às proteínas adsorvidas à coluna, foi feita com tampão TEAN, seguindo-se nova eluição com o mesmo tampão, contendo agora 0,3 M de D-galactose, para que a toxina LT adsorvida ao gel de agarose pudesse ser eluída.

Todas as frações foram lidas em espectrofotômetro a 280 nm, e o resultado padrão desta cromatografia pode ser visto na figura 1. Das frações obtidas, a partir da sexagésima, todas foram examinadas pela técnica de IHR, utilizando-se a antitoxina colérica na identificação da enterotoxina LT. De maneira geral, a presença da mesma, quer de origem humana ou suína, esteve compreendida entre as frações 115 a 130.

Após concentração das frações positivas, por ultrafiltração em membrana Amicon PM-10, um volume final de 2 ml quer da LT de origem suína, quer da de origem humana,

foram aplicados em uma coluna de Sephacryl S-200, procedendo-se a eluição desses materiais com tampão TEAN.

O resultado padrão da cromatografia em Sephacryl S-200 pode ser visto na figura 2.

A identificação da enterotoxina LT nas frações coletadas nessas cromatografias foi realizada, principalmente, através de sua análise antigênica pelos testes de IHR modificado, uma vez que a densidade ótica de algumas frações coletadas era muito baixa, apesar da presença de LT.

A determinação de quantidade de proteínas, pelo método de Lowry modificado, para as enterotoxinas LT humana e LT suína, assim purificadas, revelou que foi possível obter 1,15 mg de proteína para LT humana e 0,980 mg para LT de origem suína.

A comprovação desta purificação foi feita através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, na qual obtivemos uma única banda correspondendo a holo-toxina purificada.

2. Titulação dos antissoros nos testes de IHP e Biken

Honda et alii tem afirmado em alguns trabalhos (33, 34), que o teste de Biken seria tão sensível quanto o teste de IHP na detecção de amostras enterotoxigênicas de Escherichia coli, porém, não fazem menção à con-

centração dos antissoros anti-LTh, anti-LTs, anti-TC e anti-Cg a ser utilizada nesse teste.

Então, passamos a investigar a concentração dos antissoros a ser utilizada nos testes de IHP e Biken verificando que esta variava consideravelmente.

De um modo geral, na realização do teste de Biken, os antissoros em questão foram utilizados em diluições muito baixas, para que pudessem fornecer resultados positivos.

Contrariamente, no teste de IHP foi possível utilizarem-se os antissoros em diluições mais altas, sem que isso interferisse nos resultados.

Assim sendo, nossa primeira preocupação, antes da realização dos testes de IHP e Biken para detectar amostras de Escherichia coli enterotoxigênica, foi verificar qual a maior diluição dos antissoros a ser utilizada nesses testes, que ainda daria resultados positivos.

No teste de Biken, trabalhamos com as amostras padrão de Escherichia coli: 40 T e 0149/8, constatando que os melhores resultados eram obtidos com os antissoros puros, isto é, não diluídos. Quando em diluições mais altas, ou seja, 1:2 e 1:4, os resultados apresentavam-se inconstantes.

Para nós era fundamental que, no teste de Biken, os antissoros fossem capazes de reagir com as amostras 40 T e 0149/8, altamente toxigênicas, uma vez que em estudos posteriores examinaríamos amostras de toxige-

nicidade variável.

Idêntico procedimento foi adotado com relação ao teste de IHP, no qual os antissoros foram titulados frente aos extratos brutos, não diluídos, das amostras 40 T e 0149/8. Em alguns casos, nas reações homólogas obtivemos títulos maiores do que com as reações heterólogas. Por exemplo, o soro anti-LTh diluído 1:20 foi capaz de reagir com extrato da amostra 40 T (produtora de LTh), ao passo que com o extrato da amostra 0149/8 (produtora de LTs) foram obtidas reações apenas com o soro anti-LTh diluído 1:10.

Nesses casos, a nossa conduta na escolha dos melhores títulos dos antissoros, foi utilizar a menor diluição capaz de reagir com as amostras heterólogas.

Sendo assim, os soros anti-LTh, anti-LTs, anti-TC e anti-Cg foram utilizados, no teste de IHP nas diluições 1:10, 1:80, 1:80 e 1:20, respectivamente, não importando a origem da amostra em estudo.

3. Comparação entre os testes de IHP e Biken na detecção de amostras de Escherichia coli produtoras de LT

Tivemos aqui, como principal objetivo avaliar os testes de IHP e Biken na detecção da enterotoxina LT em amostras de Escherichia coli de diferentes origens (suínas, humanas, de ali

mentos e de água de rio). Para isso utilizamos os antissoros anti-LTh, anti-LTs, anti-TC e anti-Cg, analisando o desempenho de cada um deles na detecção dessas amostras. Sabíamos, como já citado anteriormente, que a toxigenicidade das amostras era variável, pois as mesmas haviam sido examinadas no teste de IHP frente à anti-TC (dados não apresentados).

3.1. Amostras de origem suína

Verificamos pela Tabela 1 que as amostras de origem suína independentemente do antissoro utilizado, nas diluições por nós convencionadas, foram todas positivas no teste de IHP. Em contrapartida, no teste de Biken, mesmo usando antissoros não diluídos, o comportamento das amostras LT positivas foi variado. Neste último teste, os soros anti-TC e anti-Cg detectaram apenas 19 (47,5%) de quarenta amostras e 6 (15,3%) de 39 amostras, respectivamente. Quando foram utilizados os antissoros anti-LTs e anti-LTh verificamos que o antissoro anti-LTh foi capaz de detectar 31 (77,5%) de 40 amostras LT positivas, enquanto que o soro anti-LTs detectou 26 (65%) das mesmas 40 amostras examinadas.

Sem considerarmos por ora os parâmetros origem das amostras e soros utilizados, a análise da variância determinou que o teste de IHP foi muito mais sensível que o teste de Biken na detecção de enterotoxina LT. Por outro lado, uma análise dos resultados obtidos no teste de Biken com estas amostras frente aos antissoros anti-LTs e anti-LTh, pelo teste de X^2 , através de uma tabela de contingência 2x2, verificamos que para grau de liberdade igual a 1, o valor de p foi $> 0,05$, portanto, não significativo. Ainda com relação ao teste de Biken, verificamos que a comparação dos antissoros anti-Cg e anti-TC frente às mesmas amostras suínas, conforme se pode depreender da Tabela 1, deu resultado altamente significativo, ou seja, o valor de $p < 0,01$.

Comparações semelhantes, realizadas entre os antissoros anti-LTh e anti-Cg, anti-Cg e anti-LTs forneceram também resultados altamente significativos ($p < 0,01$), já com os antissoros anti-TC e anti-LTs foi obtido resultado não significativo ($p > 0,05$).

3.2. Amostras de origem humana

Todas as amostras de origem humana, assim como as de origem suína, quando submetidas ao teste de IHP, mostraram-se positivas com qualquer um dos antissoros já mencionados. O mesmo não ocorreu no teste de Biken, no qual foram detectadas porcentagens variáveis de amostras LT positivas, com os diferentes antissoros. Nesse teste, os antissoros anti-LTs, anti-LTh, anti-TC e anti-Cg, revelaram, respectivamente, como LT positivas 9 (52,9%), 14 (82,3%), 10 (58,8%) e 7 (41,1%) das 17 amostras examinadas (Tabela 2). No grupo de amostras humanas, o antissoro anti-LTh foi capaz de detectar um número maior de amostras que o antissoro anti-LTs. Uma análise, pelo teste do χ^2 , dos resultados obtidos com estes dois antissoros mostrou diferença significativa ($p < 0,05$). Entretanto, as diferenças entre os antissoros anti-Cg e anti-TC, anti-TC e anti-LTs, anti-TC e anti-LTh, não foram significativas ($p > 0,05$).

Somente para as comparações entre os soros anti-Cg e anti-LTh, anti-LTs e anti-LTh, os resultados mostraram-se significativos ($p < 0,01$).

3.3. Amostras de alimentos

As amostras de Escherichia coli originárias de alimentos foram todas detectadas no teste de IHP pelos antissoros anti-LTs, anti-TC e anti-Cg. O antissoro anti-LTh detectou apenas 25% das amostras positivas (Tabela 3).

Examinando as amostras de alimentos no teste de Biken, observou-se que os antissoros anti-LTs e anti-TC detectaram 3 (75%) amostras positivas, o anti-Cg, 2 (50%) amostras positivas, enquanto que o anti-LTh não detectou nenhuma amostra positiva.

Em virtude do baixo número de amostras examinadas ($n < 5$), seguindo recomendação do Dr. Armando Conagin (Instituto Agronômico de Campinas), foi utilizado o Teste Exato de Fisher para tabela de contingência 2X2, tendo sido obtidas para as comparações entre os antissoros, valores de p não significativos.

3.4. Amostras de água de rio

Apenas 3 amostras de água de rio foram examinadas nos testes de IHP e Biken, sendo todas elas detectadas no teste de IHP com os antissoros utilizados.

No teste de Biken, assim como ocorreu em outros grupos de amostras, a porcentagem de positividade, com cada um dos antíssoros, foi variável (Tabela 4). Nesse teste, os soros anti-LTs, anti-TC e anti-Cg detectaram, respectivamente, 2 (66,6%), 1 (33,3%) e 2 (66,6%) amostras positivas. O antíssoro anti-LTh não detectou nenhuma amostra produtora de LT.

Da mesma forma que no grupo anterior, por causa do número baixo de amostras pesquisadas, foi usado o Teste Exato de Fisher para tabela de contingência 2X2, que mostrou não serem as variações observadas no teste de Biken significativas.

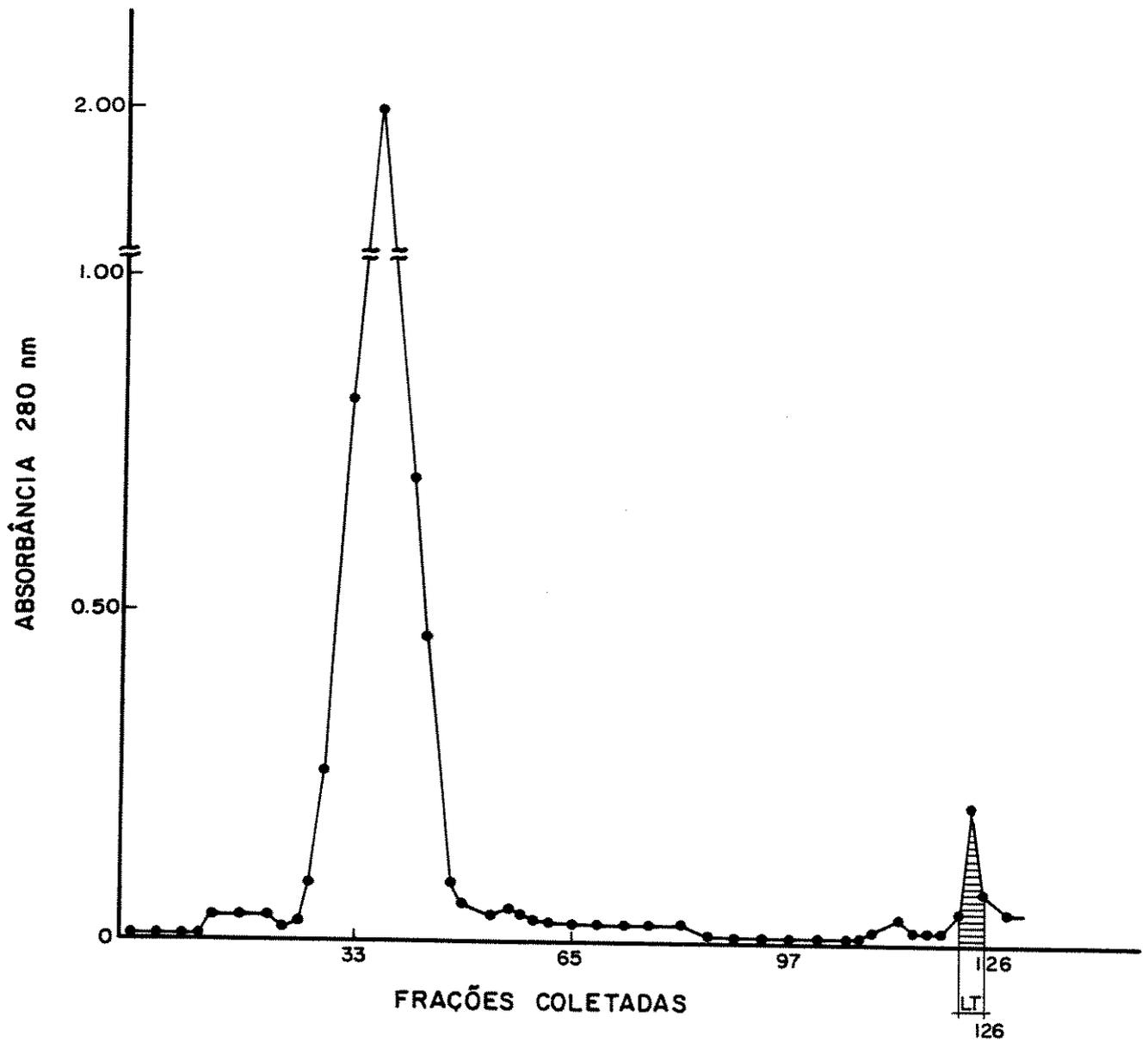


FIGURA 1 - Purificação da enterotoxina LT de origem suína através de cromatografia em Bio Gel A5 m

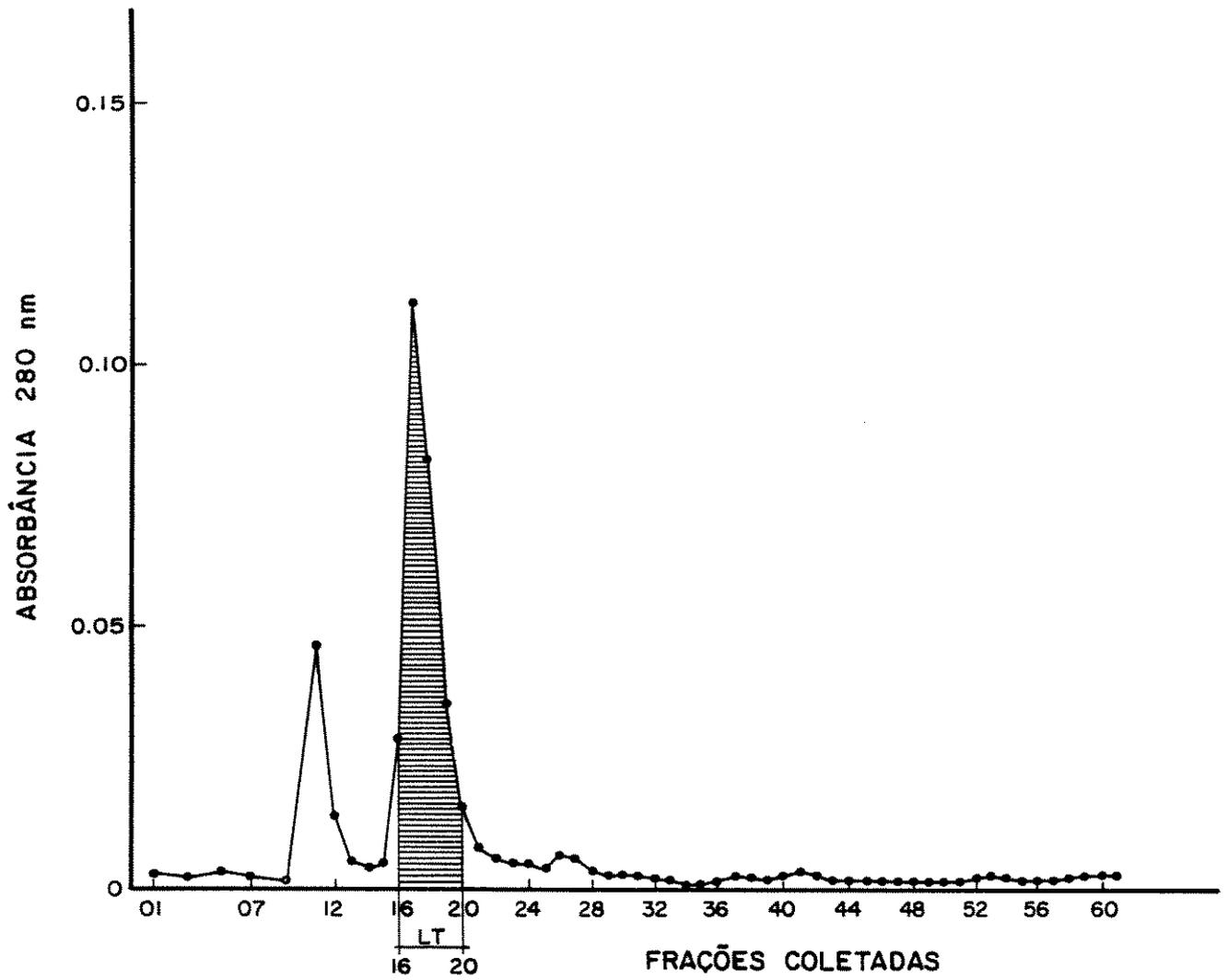


FIGURA 2 - Purificação da enterotoxina LT de origem suína através de cromatografia em Sephacryl S-200

TABELA 1

COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES DE IHP E BIKEN NA DETECÇÃO DA ENTEROTOXINA LT EM AMOSTRAS DE Escherichia coli DE ORIGEM SUÍNA

Total de Amostras	Antissoros Utilizados	Nº (%) de amostras positivas nos testes	
		IHP	Biken
40	anti-LTs ^a	40 (100%)	26 (65%)
40	anti-LTh ^b	40 (100%)	31 (77,5%)
40	anti-TC ^c	40 (100%)	19 (47,5%)
39	anti-Cg ^d	39 (100%)	6 (15,3%)

Significância dos resultados no teste de Biken frente aos antissoros usados:

a vs b - $\chi^2_1 = 2,19$ ($p > 0,05$) - não significativo

a vs c - $\chi^2_1 = 3,25$ ($p > 0,05$) - não significativo

a vs d - $\chi^2_1 = 22,28$ ($p < 0,01$) - altamente significativo

b vs c - $\chi^2_1 = 9,01$ ($p < 0,01$) - altamente significativo

b vs d - $\chi^2_1 = 33,14$ ($p < 0,01$) - altamente significativo

c vs d - $\chi^2_1 = 10,95$ ($p < 0,01$) - altamente significativo

TABELA 2

COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES DE IHP E BIKEN NA DETECÇÃO DA ENTEROTOXINA LT EM AMOSTRAS DE Escherichia coli DE ORIGEM HUMANA

Total de Amostras	Antissoros Utilizados	Nº (%) de amostras positivas nos testes	
		IHP	Biken
17	anti-LTs ^a	17 (100%)	9 (52,9%)
	anti-LTh ^b	17 (100%)	14 (82,3%)
	anti-TC ^c	17 (100%)	10 (58,8%)
	anti-Cg ^d	17 (100%)	7 (41,1%)

Significância dos resultados no teste de Biken frente aos antissoros usados:

a vs b	-	$\chi^2_1 = 4,83$	($p < 0,05$)	significativo
a vs c	-	$\chi^2_1 = 0$	$p = 0,99$	não significativo
a vs d	-	$\chi^2_1 = 1,06$	($p > 0,05$)	não significativo
b vs c	-	$\chi^2_1 = 3,54$	($p > 0,05$)	não significativo
b vs d	-	$\chi^2_1 = 7,97$	($p < 0,01$)	altamente significativo
c vs d	-	$\chi^2_1 = 1,88$	($p > 0,05$)	não significativo

TABELA 3

COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES DE IHP E BIKEN NA DETECÇÃO DA ENTEROTOXINA LT EM AMOSTRAS DE Escherichia coli ORIGINÁRIAS DE ALIMENTOS

Total de Amostras	Antissoros Utilizados	Nº (%) de amostras positivas nos testes	
		IHP	Biken
4	anti-LTs	4 (100%)	3 (75%)
	anti-LTh	1 (25%)	0
	anti-TC	4 (100%)	3 (75%)
	anti-Cg	4 (100%)	2 (50%)

Significância dos resultados no teste de Biken frente aos antissoros usados:

Em virtude do baixo número de amostras examinadas (n 5), seguindo recomendação do Dr. Armando Conagin (Instituto Agronômico de Campinas), foi utilizado o Teste Exato de Fisher para tabela de contingência 2X2, tendo sido obtido para todas as comparações entre os antissoros, valores de p não significantes.

TABELA 4

COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES DE IHP E BIKEN NA DETECÇÃO DA ENTEROTOXINA LT EM AMOSTRAS DE Escherichia coli ORIGINÁRIAS DE ÁGUA DE RIO

Total de Amostras	Antissoros Utilizados	Nº (%) de amostras positivas nos testes	
		IHP	Biken
3	anti-LTs	3 (100%)	2 (66,6%)
	anti-LTh	3 (100%)	0
	anti-TC	3 (100%)	1 (33,3%)
	anti-Cg	3 (100%)	2 (66,6%)

Significância dos resultados no teste de Biken frente aos antissoros usados:

Em virtude do baixo número de amostras examinadas (n = 5), seguindo recomendação do Dr. Armando Conagin (Instituto Agronômico de Campinas), foi utilizado o Teste Exato de Fisher para tabela de contingência 2X2, tendo sido obtido para todas as comparações entre os antissoros, valores de p não significantes.

TABELA 5

COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES DE IHP E BIKEN NA DETECÇÃO DA ENTEROTOXINA LT EM AMOSTRAS DE Escherichia coli DE DIVERSAS ORIGENS (SUÍNA, HUMANA, DE ALIMENTO, DE ÁGUA DO RIO)

Total de Amostras	Antissoros Utilizados	Nº (%) de amostras positivas nos testes	
		IHP	Biken
64	anti-LTs	64 (100%)	40 (62,5%)
64	anti-LTh	64 (100%)	45 (70,3%)
64	anti-TC	64 (100%)	33 (51,5%)
63	anti-Cg	63 (100%)	17 (26,9%)

IV- DISCUSSÃO

Existem atualmente inúmeros testes para a detecção da enterotoxina LT, porém, todos eles apresentam inconvenientes para uso por parte de laboratórios menos equipados (1, 10, 15, 16, 25, 27, 42, 58). Esses inconvenientes seriam a necessidade de equipamentos, de pessoal técnico especializado e de reagentes de alto custo.

Tendo em vista estas dificuldades, procuramos avaliar nesse trabalho, o teste de Biken proposto por Honda et alii (32), que é uma prova de fácil realização e que não requer o uso de nenhuma aparelhagem especial. De acordo com estes pesquisadores, o teste de Biken é tão eficiente na detecção de amostras de Escherichia coli produtoras de LT quanto o teste de IHP, que embora seja de fácil execução, exige leitura espectrofotométrica.

Também Sutton et alii (57), em trabalho recente, para o qual contaram com a participação de cinco diferentes laboratórios na identificação de amostras produtoras de LT, sendo todas elas de origem humana, isoladas em Osaka, Japão, avaliaram o teste de Biken, comparando-o com seis outros testes,

inclusive o IHP, utilizado na rotina de um dos laboratórios envolvidos nesta pesquisa. Os resultados obtidos nesta investigação demonstraram que o teste de Biken poderia ser usado como técnica eficiente na detecção da enterotoxina LT, principalmente por parte de laboratórios de países em desenvolvimento.

Tivemos então, como objetivo principal neste trabalho, reavaliar o teste de Biken, comparando-o ao teste de IHP na detecção da enterotoxina LT.

Considerando-se a experiência acumulada em nosso laboratório em relação a sensibilidade e especificidade do teste de IHP na detecção da LT, e, levando-se em conta as vantagens apontadas por Sutton et alii(57) e Honda et alii(32) no que diz respeito ao teste de Biken, achamos que seria altamente recomendável uma reavaliação dessas duas técnicas, utilizando amostras de ETEC de diferentes origens.

Em seus trabalhos a respeito das relações antigênicas entre a enterotoxina LT de origem humana e de origem suína, Honda et alii(33, 34) utilizaram os antissoros anti-LTs, anti-LTh e anti-TC. Embora não pretendessemos realizar um estudo a respeito das relações antigênicas entre as diferentes toxinas, analisamos não só o comportamento de amostras de Escherichia coli provenientes dessas duas fontes, como também de alimentos e água de rio, frente aos mesmos antissoros já mencionados, além do anti-Cg, avaliando principalmente a sensibilidade dos testes Biken e IHP.

A inclusão deste último antissoro, neste trabalho, deveu-se ao conhecimento de que as diferenças antigênicas entre a TC, LTh e LTs residem não somente na subunidade A como também na subunidade B (5, 33, 34, 60). Desta forma, a utilização do anti-Cg poderia permitir, ainda que superficialmente, avaliar as relações antigênicas entre as subunidades B das toxinas LTs, LTh. e TC.

Para a realização deste trabalho, era essencial que dispuséssemos dos antissoros específicos contra a TC, LTh, LTs e Cg. Tanto a TC purificada, como o anti-Cg nos foram doados pelo Dr. Carl E. Miller (Enteric Diseases Program Officer - National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA). A purificação das LTh e LTs foi realizada de acordo com metodologia já descrita(6), nos permitindo obter quantidades suficientes de LTh e LTs purificadas para imunização de coelhos. A única modificação introduzida em relação a técnica original, foi o uso da IHR, ao invés da dupla difusão em gel na detecção da LT nas frações coletadas durante a purificação, uma vez que a IHR é muito mais sensível do que a dupla difusão em gel na detecção de pequenas quantidades de LT ou toxina colérica (dados não publicados).

Quanto à análise dos resultados obtidos nos testes de IHP e Biken, temos que, com relação às amostras de origem suína (Tabela 1), o teste de IHP apresentou uma eficiência de 100% na detecção da enterotoxina LT nessas amostras, independentemente do antissoro utilizado.

Já no teste de Biken, obtivemos resultados bastante variáveis, conforme o antissoro empregado.

Analisando estatisticamente os resultados do teste de Biken, para as amostras de Escherichia coli de origem suína frente ao antissoro anti-Cg, vimos que as diferenças observadas entre esse antissoro e os demais, são altamente significativas ($p < 0,01$), com muitas amostras ETEC apresentando resultados negativos. Também na comparação entre os antissoros anti-TC e anti-LTh, obtivemos resultados altamente significativos ($p < 0,01$), com melhor desempenho do anti-LTh, que detectou 77,5% das amostras, enquanto que o anti-TC detectou 47,5%.

Os resultados das comparações entre os antissoros anti-LTs e anti-LTh e também anti-LTs e anti-TC não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$) e portanto não serão comentados.

As amostras enterotoxigênicas de Escherichia coli de origem humana, foram também 100% detectadas no teste de IHP, independentemente do antissoro empregado. Já no teste de Biken, muitas delas deixaram de ser detectadas como produtoras de LT, na dependência do antissoro que foi utilizado (Tabela 2). Mais uma vez, como o teste de IHP mostrou uma eficiência de 100% na detecção da enterotoxina LT, foram analisados estatisticamente apenas os resultados obtidos no teste de Biken frente aos diferentes antissoros.

Neste último teste, comparando-se os antissoros anti-LTs e anti-LTh, observamos diferenças significativas entre

os dois, com o anti-LTh detectando 82,3% das amostras humanas, enquanto que o anti-LTs detectou apenas 52,9% das mesmas amostras. As diferenças nos resultados entre os antissoros anti-Cg e anti-LTh também foram significativas, com melhor desempenho do anti-LTh. Quanto à comparação entre os antissoros anti-LTh e anti-TC, embora o resultado não fosse significativo ($\chi^2_1 = 3,54$; $p > 0,05$), este esteve muito próximo do nível de significância ($\chi^2_1 = 3,84$; $p = 0,05$). As diferenças observadas entre os antissoros anti-LTs e anti-TC, anti-LTs e anti-Cg, anti-LTh e anti-TC e finalmente anti-TC e anti-Cg, não foram significativas ($p > 0,05$).

Os resultados obtidos, no teste de Biken, com esses dois grupos de amostras, nos permitiram observar algumas vezes relações antigênicas entre a LT de origem humana e suína. Exemplificando, para as amostras de origem suína, o antissoro anti-LT humano foi capaz de detectar um maior número de amostras que o anti-TC. Esses resultados demonstram, que o anti-TC não deve ser utilizado no teste de Biken com a finalidade de detectar produção de LT por amostras de origem suína. Embora o antissoro anti-LTh detectasse mais amostras suínas que o anti-LTs, esses resultados não foram estatisticamente significativos. Já entre as amostras de origem humana, o antissoro que melhor desempenho teve na detecção dessas amostras foi o anti-LTh, e nesse caso a expectativa de que os diferentes antissoros apresentassem maior especificidade nas reações homólogas foi confirmada. Tendo em vista, os resultados obti

dos com as amostras suínas e humanas no teste de Biken, estes são concordantes com as fórmulas antigênicas propostas por Takeda et alii (59), para as três toxinas: LTs, LTh e TC. Esses autores, trabalhando com as três toxinas purificadas e suas respectivas antitoxinas, propuseram as seguintes fórmulas antigênicas:

$$TC = [C1] [C2-H2-P2] [C3-H3]$$

$$LTh = [H1] [C2-H2-P2] [C3-H3] [P4-H4]$$

$$LTs = [P1] [C2-H2-P2] [P4-H4]$$

Os antígenos específicos para cada uma dessas toxinas, são representados pelo índice 1, ao passo que o epítipo comum às três toxinas está representado pelo índice 2, enquanto que o índice 4 representa um epítipo comum à toxina LT humana e à toxina LT suína, porém, ausente na toxina colérica.

Tomando-se como base as fórmulas antigênicas apresentadas, podemos concluir que a LTs embora relacionada antigenicamente a LTh e a TC, tem mais semelhanças com a LTh do que com a TC.

Tanto para as amostras de origem suína, como para as de origem humana, o antissoro menos eficiente em detectar a enterotoxina LT no teste de Biken, foi o anti-Cg. A explicação que temos para esse achado, considerando que o soro anti-Cg é dirigido unicamente contra a subunidade B da toxina

colérica, é que ele seria incapaz de detectar a subunidade A, presente quando ocorre a liberação de LT pela amostra, diminuindo a sensibilidade do teste.

Por outro lado, como o anti-Cg foi capaz de detectar no teste de Biken um número maior de amostras humanas (41,4%) do que suínas (15,3%), esses resultados sugerem a semelhança do que já comentamos em relação às holotoxinas TC, LTh e LTs, que as relações antigênicas da subunidade B da TC estejam mais próximas da subunidade B da LTh, do que da respectiva subunidade da LTs.

No que se refere às amostras de Escherichia coli originárias de alimentos e de água de rio (Tabela 3 e 4), fica difícil tirarmos conclusões, devido ao pequeno número de amostras analisadas nesses dois grupos. Entretanto, é curioso notar que o teste de IHP quando realizado com o antissoro anti-LTh, detectou entre as amostras de alimentos, apenas uma amostra LT positiva, enquanto que o teste de Biken realizado com esse mesmo antissoro não foi capaz de detectar nenhuma amostra produtora de LT dessa origem. Por outro lado nota-se na Tabela 3, que melhor desempenho do teste de Biken foi obtido com o antissoro anti-LTs. Esse resultado nos sugeriria, que as amostras de Escherichia coli isoladas de alimentos poderiam ser provavelmente de origem suína, uma vez que deixaram de reagir com o antissoro anti-LTh, reagindo com o antissoro anti-LTs. Contudo, o antissoro anti-TC também detectou no teste de Biken o mesmo número de amostras que o anti-LTs.

Entretanto, esta aparente eficiência do anti-TC com as amostras de alimentos, que poderiam ser de origem suína, fica difícil de ser analisada, devido ao pequeno número de amostras examinado.

Com relação às amostras de Escherichia coli isoladas de água de rio, todas foram detectadas no IHP, independentemente do antissoro utilizado. Poderíamos supor, que estas amostras seriam provavelmente de origem humana, provenientes talvez de água de esgoto. Contudo, os resultados obtidos no teste de Biken, não foram compatíveis com essa suposição, pois o soro anti-LTh não detectou nenhuma amostra de ETEC isolada de água de rio, ao contrário do anti-LTs, que foi capaz de detectar 66,3% das amostras.

No teste de Biken, assim como ocorreu com os outros grupos de amostras analisados, os resultados frente aos diferentes antissoros foram variáveis. Entretanto, essas variações não foram estatisticamente significativas.

Por todos os resultados observados neste trabalho, podemos concluir que o teste de IHP foi mais sensível que o de Biken na detecção de amostras ETEC de diferentes origens, independentemente do antissoro utilizado.

Considerações Gerais

Analisando agora conjuntamente, os resultados obtidos com os diferentes grupos de amostras, frente aos antissoros anti-LTs, anti-LTh, anti-TC e anti-Cg, nos testes de IHP e Biken, comentaremos dois aspectos já mencionados e aparentes em nossos resultados, mais julgados relevantes no que tange a:

- 1) O comportamento dos diferentes antissoros nos testes de IHP e Biken, na detecção de enterotoxina LT de amostras de Escherichia coli de diferentes origens.
- 2) A comparação global dos testes de IHP e Biken na detecção da enterotoxina LT em amostras de Escherichia coli de diversas origens.

Quanto ao primeiro aspecto, podemos concluir que no teste de IHP, todos os antissoros apresentaram um bom desempenho, independentemente da sua potência. Já no teste de Biken, além da potência dos antissoros, uma maior sensibilidade do teste parece estar na dependência de uma maior relação antigênica entre a origem da LT pesquisada e o antissoro utilizado no teste, sendo desaconselhável a utilização do anti-TC e do anti-Cg.

Com relação ao segundo aspecto, ou seja, a comparação propriamente dita do teste de Biken com o teste de IHP, independentemente da origem das amostras, fica muito clara a superioridade do teste de IHP com relação ao teste de Biken no que diz respeito a detecção da enterotoxina LT (Tabela 5).

Através do teste de IHP foi possível detectar enterotoxina LT em amostras de Escherichia coli de qualquer origem, sem que uma menor toxigenicidade dessas amostras tenha influenciado no desempenho do teste. Com relação ao Biken, ficou aparente que esta maior ou menor toxigenicidade das amostras em estudo teria influência nos resultados a serem obtidos por este teste, estando também este teste na dependência do antissoro a ser empregado.

Os nossos resultados são discrepantes com relação aqueles obtidos por Sutton et alii (57), porque provavelmente as amostras estudadas por esses pesquisadores em seu trabalho fossem mais toxigênicas do que as nossas, além do mais a comparação feita por esses autores entre o teste de Biken e principalmente o IHP fica prejudicada, por não terem os mesmos trabalhosado com a enterotoxina LT de diferentes origens (suína e humana), hoje sabidamente não idênticas sob o ponto de vista antigênico.

Trabalhamos com 64 amostras Escherichia coli, já sabidamente produtoras de enterotoxina termolábil (LT), provenientes de diversas fontes, (humanas, suínas, alimentos e água de rio).

Essas amostras foram examinadas nos testes de imunohemólise passiva (IHP) e ELEK modificado (Biken), procurando-se comparar o desempenho desses dois testes na detecção de LT, utilizando-se para isso os antissoros: anti LT humano (anti-LTh); anti-LT suíno (anti-LTs); antitoxina colérica (anti-TC) e anti-coleragenóide (anti-Cg).

As toxinas LT de origem humana (LTh) e de origem suína (LTs), necessárias para obtenção dos respectivos antissoros, foram purificadas segundo o método de Clements & Finkelshtein (6), e posteriormente inoculadas em coelhos seguindo-se o esquema de imunização proposto por Honda et alii (33). Já o soro anti-Cg, e a toxina colérica purificada nos foram dados, sendo o soro anti-TC obtido através de inoculação da mesma em cavalo, seguindo-se o mesmo esquema de imunização utilizado para a obtenção dos antissoros anti-LTh e anti-LTs (33).

Os antissoros foram então titulados nos testes de IHP e Biken, frente as amostras padrão de Escherichia coli produtora de LT, de origem humana e de origem suína. Uma vez conhecidos os títulos dos mesmos, passamos ao exame das 64 amostras com cada um dos antissoros, em ambos os testes, IHP e Biken.

Os principais resultados e respectivas conclusões a que chegamos foram as seguintes:

- 1) Todas as amostras de Escherichia coli estudadas, independentemente da sua origem foram identificadas no teste de IHP como produtoras de LT, ao passo que no teste de Biken os resultados positivos para a detecção desta enterotoxina foram variáveis. A comparação de ambos os testes revelou resultados altamente significativos, que mostraram uma maior sensibilidade do IHP sobre o teste de Biken.
- 2) O teste de Biken apresentou resultados positivos somente com os antissoros não diluídos, enquanto que no teste de IHP obtivemos resultados positivos utilizando os antissoros diluídos; em razão disso o consumo de antissoro neste último teste foi menor do que no teste de Biken.
- 3) O soro anti-TC não deve ser utilizado no teste de Biken para a detecção de enterotoxina LT em amostras de Echerichia coli de origem suína.

- 4) O soro anti-Cg não deve ser utilizado no teste de Biken na detecção da enterotoxina LT em amostras de qualquer origem.
- 5) Os resultados no teste de Biken apresentaram variações, na dependência da maior ou menor toxigenicidade das amostras examinadas, sofrendo influência também da potência do antissoro usado no teste. Contrariamente, o teste de IHP foi capaz de detectar a enterotoxina LT em amostras de baixa toxigenicidade, mesmo quando foram utilizados antissoros menos potentes.
- 6) Uma vez que o teste de IHP detectou a enterotoxina LT em 100% das amostras estudadas, enquanto que o teste de Biken não foi capaz de detectar LT em todas as amostras, apresentando resultados falsos negativos, o mesmo não deve ser recomendado como teste de rotina para detecção de LT, a não ser quando o objetivo for apenas a triagem de amostras LT positivas.

1. BRILL, B.M.; WASILAUSKAS, B.L. & RICHARDSON, S.H. - Adaptation of the staphylococcal coagulation technique for detection of heat-labile enterotoxin of Escherichia coli. J. Clin. Microbiol., 9: 49-55, 1979.
2. BURGESS, M.N.; BYWATER, R.J.; COWLEY, C.M.; MULLAN, N.A., & NEWSOME, P.M. - Biological evaluation of a methanol - soluble, heat-stable Escherichia coli enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits and calves. Infect. Immun., 21: 526-531, 1978.
3. de 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.
4. CLEMENS, 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.

5. CLEMENTS, J.D., & FINKELSTEIN, R.A. - Demonstration of shared and unique immunological determinants in enterotoxins from Vibrio cholerae and Escherichia coli. Infect. Immun., 22: 709-713, 1978.
6. CLEMENTS, J.D., & FINKELSTEIN, R.A. - Isolation and characterization of homogeneous heat-labile enterotoxins with high specific activity from Escherichia coli cultures. Infect. Immun., 24: 706-769, 1979.
7. CLEMENTS, J.D.; YANCEY, R.J., & FINKELSTEIN, R.A. - Properties of homogeneous heat-labile enterotoxin from Escherichia coli. Infect. Immun., 29:91-97, 1980.
8. DAVIS, B.J. - Disc electrophoresis II. Method and application to human serum protein. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121: 404-407, 1964.
9. DEAN, A.G.; CHING, Y.C.; WILLIAMS, R.G., & HARDEN R.B. - Test for Escherichia coli enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. J. Infect. Dis., 125: 407-411, 1973.
10. DONIA, S.T.; MOON, H.W. & WHIPP, S.C. - Detection of heat-labile Escherichia coli enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. Science: 183: 334-336, 1974.

11. EIDELS, R.; PROIA, R.L., & HART, D.A. - Membrane receptors for bacterial toxins. *Microbiol. Rev.*, 47: 596-620, 1983.
12. EVANS, D.G., & EVANS, D.J., Jr., - New surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic Escherichia coli of serogroups 06 and 08. *Infect. Immun.*, 21: 638-647, 1978.
13. EVANS, D.G.; EVANS, D.J., Jr., & TJOA, W. - Hemmagglutination 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.; TJOA, W.S., & DUPONT, R.L. - Detection and characterization of colonization factor of Escherichia coli isolated from adults with diarrhea. *Infect. Immun.*, 19: 727-736, 1978.
15. EVANS, D.J., Jr., & EVANS, D.G. - Direct serological assay for the heat-labile enterotoxins of Escherichia coli using passive immunohemolysis. *Infect. Immun.*, 16: 604-609, 1977.

16. EVANS, D.J. Jr.; EVANS, D.G., & GORBACK 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., & GORBACK S.L. -
Polymixin B - induced realease of low-molecular weight heat-labile enterotoxin from Escherichia coli. Infect. Immun., 10: 1010-1017, 1974.
18. FRANCESCHI, A.P.; PESTANA de CASTRO, A.F.; SERAFIM, M.B. & PUSTIGLIONE, L.N. - Estudos comparativos entre o teste da alça ligada de intestino de coelho e do camundongo recém-nascido na detecção da enterotoxina termoestável (ST) produzida por Escherichia coli. Rev. Microb., 8: 123-128, 1977.
19. FRANTZ, J.C.; FRIEDMAN-JASO, L., & ROBERTSON, D.C. - Bindings of Escherichia coli heat-stable enterotoxin to rat intestinal cells and brush-border membranes. Infect. Immun., 43: 622-630, 1984.

20. FRANTZ, J.C., & ROBERTSON, D.C. - Immunological properties of Escherichia coli heat-stable enterotoxins: development of a radioimmunoassay specific for heat-stable enterotoxins with suckling-mouse activity. *Infect. Immun.*, 33: 193-198, 1981.
21. de GRAAF, F.K., & ROORDA, I. - Production, purification and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from the calf enteropathogenic Escherichia coli. *Infect. Immun.*, 36: 751-758, 1982.
22. GAASTRA, W., & de GRAAF, F.K. - Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic Escherichia coli strains. *Microbiol. Rev.*, 46: 129-161, 1982.
23. GEMMEL, C.G. - Comparative study of the nature and biological activities of bacterial enterotoxins. *J. Med. Microbiol.*, 17: 217-235, 1984.
24. GILL, D.M.; CLEMENTS, J.D.; ROBERTSON, D.C., & FINKELSTEIN, R.A. - Subunit number and arrangement in Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.*, 33: 677-682, 1981.

25. GREENBERG, H.B.; SACK, D.A.; RODRIGUEZ, W.; SACK, R.B.; WYATT, R.G.; KALICA, A.R.; HORSWOOD, R.L.; CHANOCK, R. M., & KAPIKIAN, A.Z. - Microtiter solid-phase radio-immunoassay for detection of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.*, 17: 541-545, 1977.
26. GREENBERG, R.N., & GUERRANT, R.L. - E. coli heat-stable enterotoxin. *Pharmacol. Ther.*, 13: 507-531, 1982.
27. GUERRANT, R.L.; BRUNTON, L.L.; SCHNAITMAN, T.C.; REBHUN, T., & GILMANN, A.G. - Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary cell morphology: a rapid sensitive in vitro assay for the enterotoxin of Vibrio cholerae and Escherichia coli. *Infect. Immun.*, 10: 320-327, 1974.
28. GYLES, C.L.; - Heat-labile and heat-stable forms of the enterotoxin from Escherichia coli enteropathogenic for pigs. *Ann, N.Y. Acad. Sci., U.S.A.*, 176: 314-322, 1971.
29. GYLES, C.L., & BARNUM, D.A. - A heat-labile enterotoxin from strains of Escherichia coli enteropathogenic for pigs. *J. Infect. Dis.*, 120: 419-426, 1969.
30. GYLES, C.L.; SO, M., & FALKOW, S. - The enterotoxin plasmide of Escherichia coli. *J. Infect. Dis.*, 130: 40-49, 1974 .

31. HARTREE, E. - Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analyt. Biochem.*, 48: 422, 1972.
32. HONDA, T.; TAGA, S.; TAKEDA, Y., & MIWATANI, T. - Modified Elek test for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic Escherichia coli. *J. Clin. Microbiol.*, 13: 1-5, 1981.
33. HONDA, T.; TAKEDA, Y., & MIWATANI, T. - Isolation of special antibodies which react only with homologous enterotoxins from V. cholerae and enterotoxigenic Escherichia coli. *Infect. Immun.*, 34: 333-336, 1981.
34. HONDA, T.; TSUJI, T.; TAKEDA, Y., & MIWATANI, T. - Immunological nonidentity of heat-labile enterotoxins from human and porcine enterotoxigenic Escherichia coli. *Infect. Immun.*, 34: 337-340, 1981.
35. ISAACSON, R.E.; NAGY, B., & MOON, H.W. - Colonization of porcine small intestine by Escherichia coli colonization and adhesion factors of pig enteropathogens which lack K88. *J. Infect. Dis.*, 135: 531.
36. JONES, G.W., & RUTTER, J.M. - Role of the K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by E. coli in piglets. *Infect. Immun.*, 6: 918-927, 1972.

37. JONES, G.W., & RUTTER, J.M. - The association of K88 antigen with hemmagglutinating activity of porcine strains of Escherichia coli. J. Gen. Microbiol., 84: 135-144,
38. KUDOH, Y.; YAMADA, S.; MATSUSHITA, S.; OHTA, R., TSUNO, M.; MURAOKA, T.; OHTOMO, N., & OHASHI, M. - Detection of heat-labile enterotoxin of Escherichia coli by reversed passive hemmagglutination test with specific immunoglobulin against cholera toxin. In: Takeya K. Zinnaka Y. (eds) Proceedings of the 14th Joint Conference of the US-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel, Toho University, Tokyo, pp 266-273, 1979.
39. LARIVIÈRE, S.; GYLES, C.L., & BARNUM, D.A. - A comparative study of the rabbit and pig gut loop systems for the assay of Escherichia coli enterotoxin. Can. J. Comp. Med., 36: 319-327, 1972.
40. LEVNER, M.; WIENER, F.P., & RUBIN, B.A. - Induction of Escherichia coli and Vibrio cholerae enterotoxins by an inhibitor of protein synthesis. Infect. Immun., 15: 132-137, 1977.

41. MOON, H.W.; NAGY, B.; ISAACSON, R.E., & Ørskov, T. - Occurrence of K99 antigen on Escherichia coli isolated from pigs and colonization of pig ileum by K99⁺ enterotoxigenic Escherichia coli from calves and pigs. Infect. Immun.; 15: 614-620, 1977.
42. MOON, H.W.; WHIPP, S.C.; ENGSTRÖM G.W., & BAETZ, A.L. - Response of the rabbit ileal to cell-free products from Escherichia coli enteropathogenic for swine J. Infect. Dis., 127: 182-187, 1970.
43. MORRIS, J.A.; STEVENS, A., & SOJKA, W.J. - Preliminary characterization of cell-free K99 antigen isolated from Escherichia coli B41. J. Gen. Microbiol., 99: 353-357, 1977.
44. MOSELEY, S.L.; HUQ, I.; ALIM, A.R.M.A.; SO, M.; SAMADPOUR-MOTALEBI, M., & FALKOW, S. - Detection of enterotoxigenic Escherichia coli by DNA colony hybridization. J. Infect. Dis., 142: 892-898, 1980.
45. MUNDELL, D.H.; ANSELMO, C.R., & WISHNOW, R.M. - Factors influencing heat-labile Escherichia coli enterotoxin activity. Infect. Immun., 14: 383-388, 1976.

46. ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F.; SMITH, H.W., & SOJKA, W.J. -
The establishment of K99, a thermolabile transmissible
Escherichia coli K antigen, previously called "Kco",
possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. Acts.
Pathol. Microbiol. Scand. Sec. B., 83: 31-36, 1975.
47. SACK, D.A., & SACK, R.B. - Test for enterotoxigenic
Escherichia coli using Y1 adrenal cell in miniculture.
Infect. Immun., 11: 334-336, 1975.
48. SERAFIM, M.B.; CASTRO, A.F. PESTANA de.; LEONARDO, M.B.,
& MONTEIRO, A.R. - Single radial immunohemolysis test
for detection of Escherichia coli thermolabile enteroto-
xins. J. Clin. Microbiol., 14: 473-478, 1981.
49. SERAFIM, M.B.; CASTRO, A.F. PESTANA de.; REIS, L.R., &
TRABULSI, R.R. - Passive immunohemolysis for detection
of heat-labile enterotoxin produced by Escherichia coli
isolated from different sources. Infect. Immun., 24:
606-610, 1979.
50. SIVASWAMY, G., & GYLES, C.L. - The prevalence of ente-
rotoxigenic Escherichia coli in feces of calves with
diarrhea. Can. J. Comp. Med., 40: 241-246, 1976.

51. SMITH, H.W. - Neonatal Escherichia coli infections in domestic mammals: transmissibility of pathogenic characteristics. Ciba Foundation Symposium., 45-72, 1976.
52. SMITH, H.W., & HALLS, S. - Observation by the ligated intestinal segment and oral inoculation method on Escherichia coli infection in pigs, calves, lambs and rabbits. J. Path. Bact., 93: 495-529, 1967.
53. SMITH, H.W., & HALLS, S. - The transmissible nature of genetic factor in Escherichia coli that controls enterotoxins production. J. Gen. Microbiol. 52: 319-334, 1968.
54. SMITH, H.W., & SACK, R.B. - Immunologic cross-reactions of enterotoxins from Escherichia coli and Vibrio cholerae. J. Infect. Dis., 127: 164, 1973.
55. SO, M., & MAC CARTHY, B.J. - Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn 1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic Escherichia coli strains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 77: 4011-4015, 1980.
56. SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S., & KONOWALCHUK, J. - Assay of Escherichia coli heat-labile enterotoxins with VERO cells. Infect. Immun., 16: 617-622, 1977.

57. SUTTON, R.G.A.; MERSON, M.; CRAIG, J.P.; Escheverria, P.; MOSELEY, S.L.; ROWE, B.; TRABULSI, L.R.; HONDA, T. & TAKEDA, Y. - Evolution of the Biken test for the detection of LT-producing Escherichia coli In: TAKEDA, Y. & MIWATANI, T., ed. Bacterial Diarrheal Diseases, Tokyo, KTK Scientific, 1985, p. 209-210
58. SVENNERHOLM, A.M.; & HOLMGREN, J. - Identification of Escherichia coli heat-labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM1-ELISA) procedure. Curr. Microbiol., 1: 19-23, 1978.
59. TAKEDA, Y.; HONDA, T.; SIMA, H.; TSUJI, T., & MIWATANI, T. - Analysis of antigenic determinants in cholera enterotoxin and heat-labile enterotoxins from human and porcine enterotoxigenic Escherichia coli, Infect. Immun. 41: 50-53, 1983.
60. TAKEDA, Y.; HONDA, T.; TAGA, S., & MIWATANI, T. - In vitro formation of hybrid toxins between subunits of Escherichia coli heat-labile enterotoxin and those of cholera enterotoxin. Infect. Immun.; 34: 341-346, 1981.
61. THOMAS, L.V.; CRAVIOTO, A.; SCOTLAND, S.M.; ROWE, B. - New fimbrial antigenic type (E8775) that may represent a colonization factor in enterotoxigenic Escherichia co

- li in human. Infect. Immun., 35: 1119-1124, 1982.
62. YANO, T.; LEITE, D.S.; CAMARGO, I.J.B. & de Castro, A.F.P. - A probable new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic Escherichia coli isolated from pigs. Microbiol Immunol., 30: 495-508, 1986.
63. YANO, T.; OLIVEIRA, M.S.; FONTES, C.F.; ALMEIDA, A. C.P. de e CASTRO, A.F. PESTANA de - Detection of heat-labile (LT) enterotoxin of enterotoxigenic Escherichia coli by the radial immune hemolysis test: a modification for clinical use. Med. Microbiol. Immunol., 171: 171-178, 1982.