

## ANTICORPOS ANTI-ENTEROTOXINA TERMOLÁBIL DE ESCHERICHIA COLI E ANTI-FATOR DE COLONIZAÇÃO EM COLOSTRO HUMANO (1)

J. MARTINS FILHO (2), A. F. PESTANA DE CASTRO (3), M. B. SERAFIM (3) e J. A. GOMES (3)

### RESUMO

Em virtude da importância crescente que tem sido dada aos colibacilos enterotoxigênicos e os chamados fatores de colonização, o objetivo principal de nossa pesquisa foi detectar a presença de anticorpos anti-enterotoxina termolábil (anti-LT) e anti-fator de colonização (anti-CF), em amostras de colostros coletadas de parturientes da cidade de Campinas, SP, Brasil. Foram examinadas 56 amostras de colostro agrupadas duas a duas, tendo sido encontradas apenas 2 amostras capazes de inibir o fator de permeabilidade (PF). A presença de anticorpos por inibição da aglutinação de hemácias frente a uma suspensão de colibacilos portadores de antígeno CF foi demonstrada em 4 amostras. O teste de hemaglutinação passiva forneceu maior número de resultados positivos com 11 amostras reagentes com títulos que variaram de 1:20 a 1:160. Em apenas uma das amostras de colostro foi observada simultaneamente a presença de anticorpos anti-LT e anti-CF. A atividade da enterotoxina ST não foi neutralizada por nenhuma das amostras de colostro. Os resultados por nós obtidos com nossas amostras de colostro situaram-se em nível intermediário àqueles relatados para parturientes paquistanesas e suecas ou norte-americanas. O teste de hemaglutinação passiva com hemácias sensibilizadas com antígeno CF pareceu-nos bastante sensível na detecção de anticorpos anti-fator de colonização. Em virtude destes resultados nós acreditamos que existem agora razões adicionais para se estimular o aleitamento materno, pelo menos no que concerne à prevenção de infecções entéricas causadas por *E. coli*, enterotoxigênicas portadoras do fator de colonização CF.

### INTRODUÇÃO

Nos países em desenvolvimento, durante os primeiros meses de vida a ocorrência de diarreia causada por *Escherichia coli* é uma das principais causas de mortalidade infantil<sup>21</sup>. A virulência desta bactéria, via de regra, está condicionada à produção de duas enterotoxinas: uma termolábil (LT), de natureza proteica, imunogênica e de alto peso molecular; outra, termoestável (ST), provavelmente um polipeptídeo, aparentemente não imunogênica e de baixo peso molecular<sup>4</sup>. Ambas as toxinas, embora por mecanismos diferentes<sup>10,11</sup>, são capazes de estimular o aumento de líquido na luz

intestinal de animais inoculados experimentalmente<sup>5,22</sup>. A enterotoxina-LT pode ser ensaiada em culturas de tecido<sup>4,11,23</sup> ao passo que a enterotoxina ST é normalmente estudada pelo teste do camundongo recém-nascido<sup>3</sup>.

Para as amostras de colibacilos enterotoxigênicos, isolados de suínos e bovinos, tem sido demonstrado ser fundamental para o desenvolvimento de diarreia, a existência de fatores de colonização, representados, respectivamente, pelos antígenos K88<sup>14</sup> e K99<sup>18</sup>. Recentemente, em relação às amostras, de origem humana foi

(1) Trabalho realizado com auxílios da FAPESP (Projeto 204/78) e CNPq (projeto 22220861/77)

(2) Departamento de Pediatria da FCM da UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

(3) Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP.

descrito um fator de colonização, denominado CF (colonization factor) com propriedades semelhantes ao K88 e K99, inclusive no que diz respeito a capacidade de provocar aglutinação de hemácias na presença de D-manose<sup>7,8</sup>.

Experiências realizadas em diversos países<sup>12,13,24</sup> e entre nós<sup>16</sup> tem demonstrado que crianças alimentadas com leite materno sofrem bem menos de distúrbios gastrintestinais do que as amamentadas artificialmente. Devido à capacidade imunogênica da enterotoxina LT deduziu-se que parte deste efeito protetor era devido à presença de anticorpos anti-LT do tipo IgA secretora, a nível intestinal<sup>24</sup>.

Trabalhos neste sentido comprovaram que colostros humanos coletados em regiões onde a diarreia por colibacilos enterotoxigênicos é endêmica, eram capazes de neutralizar a atividade da enterotoxina LT de *E. coli*, ensaiada na alça ligada no intestino de coelho<sup>24</sup> e em cultura de tecido<sup>13</sup>. Considerando-se ainda que a ocorrência de anticorpos anti-CF no colostro, à semelhança do que ocorre com antígeno K88 entre os suínos<sup>19</sup> pode estar envolvida na proteção conferida pelo leite materno, o propósito de nosso trabalho foi averiguar esta possibilidade em colostros humanos coletados em Campinas, SP, Brasil. Paralelamente, procurou-se também detectar, nestes materiais, a ocorrência de anticorpos anti-LT de *Escherichia coli* e uma possível neutralização da atividade da enterotoxina ST.

## MATERIAL E METODOS

### Coleta de colostros e separação de imunoglobulinas

Foram examinadas 56 amostras de colostros coletadas de parturientes hospitalizadas na Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, durante o período de março a maio de 1978. Como, via de regra, a quantidade de material era insuficiente, estes foram misturados 2 a 2 e procedeu-se a separação das imunoglobulinas, dos colostros (IgGC) utilizando-se a técnica recomendada por OLIVEIRA LIMA & SILVA<sup>15</sup>. Os materiais assim obtidos foram absorvidos com hemácias de carneiro, inativados a 56°C por 30min. e mantidos a -70°C até o momento do uso.

### Amostras bacterianas

Foram utilizadas as seguintes amostras de *E. coli*: amostra 3, sorotipo 0128: H?, produtora de enterotoxina ST e isolada de um caso de diarreia infantil em Campinas, SP.; amostra 10407, sorotipo 078:H11, produtora de enterotoxina LT, portadora de fator de colonização CF e gentilmente cedida pelo Dr. D. J. EVANS Jr. (Texas Medical Center at Houston, University of Texas, U.S.A.); amostra 10407 P, obtida em laboratório a partir da amostra precedente e destituída de CF e finalmente a amostra 711 nal (*E. coli* K12) cedida pelo Dr. C.L. GYLES (University of Guelph, Ontario, Canada).

### Preparo e ensaio de enterotoxinas

Para o preparo das enterotoxinas LT e ST em meio de CAYE<sup>6</sup>, foram utilizadas respectivamente as amostras 10407 e 3, procedendo-se conforme recomendado por EVANS & col.<sup>6</sup>. O ensaio da enterotoxina LT foi feito através do fator de permeabilidade vascular, (PF)<sup>6</sup> e da enterotoxina ST pelo teste do camundongo recém-nascido<sup>3</sup>.

### Preparo do antígeno CF

Utilizou-se técnica semelhante à descrita para o antígeno K99<sup>17</sup>, com algumas modificações que consistiram em se omitir o uso do tampão acetato pH 4,0, sendo feitas apenas precipitações repetidas em ácido acético diluído, até atingir o referido pH. O precipitado resultante de cinco tratamentos repetidos foi ressuspenso em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,2 e após diálise contra o mesmo tampão, foi mantido a -70°C até o uso.

### Preparo do anti-soro CF

Este anti-soro foi preparado pela imunização de coelhos adultos com suspensões da cultura 10407 obtidas a partir do crescimento em ágar peptonado a 2%. As doses e esquema de imunização, foram idênticas aos recomendados por EVANS & col.<sup>9</sup>. A absorção do anti-soro resultante com culturas vivas e mortas de *E. coli* 10407 P foi suficiente para remover as aglutininas contra outros antígenos que não CF. O título aglutinante do anti-soro CF absorvido em lâmina, frente às suspensões bacterianas

padronizadas (tubo 10 da escala de MAC FARLAND) da amostra 10407 foi de 1:8. O mesmo anti-soro examinado pela técnica de hemaglutinação passiva deu um título de 1:5120.

#### Neutralização da atividade da enterotoxina ST

Para cada 0,5 ml de colostro foi adicionado igual volume de enterotoxina ST. As misturas colostro e antitoxina foram incubadas a 37°C por 2 horas, adicionando-se em seguida 1 a 2 gotas de azul de EVANS a 2% em solução fisiológica 0,3M. Em seguida, o estudo de possível neutralização da atividade de ST pelas amostras de colostro foi feito pelo teste do camundongo, recém-nascido<sup>3</sup>. Estes resultados foram comparados com os obtidos com inoculação de enterotoxina apenas e misturas de colostros com sobrenadantes de uma cultura não enterotoxigênica (711 nal).

#### Neutralização da atividade da enterotoxina LT

O estudo da neutralização da atividade de LT foi feito pelo teste do PF<sup>6</sup>. Inicialmente determinou-se a diluição de enterotoxina LT capaz de provocar, na pele depilada de coelhos adultos albinos, uma zona de endureção e posterior formação de uma área de coloração azul, devido a injeção de azul de EVANS, de 64 mm<sup>2</sup> ou aproximadamente 4,5mm de raio. Convencionamos esta medida como sendo representativa de 1 dose que ocasiona o aparecimento da área azulada (IDA). Para a realização do teste de neutralização, 0,5ml de IgGC foi incubado a 37°C, por 1 hora, com igual volume de enterotoxina contendo 2DA por 0,1. Após incubação, 0,1ml das misturas foram inoculadas na pele depilada de coelhos, procedendo-se então conforme recomendado por EVANS & col.<sup>6</sup> Para cada mistura de IgGC e enterotoxina foram utilizados 4 animais, sendo feitos para cada um deles os seguintes controles: enterotoxina contendo 2 DA/0,1ml e igual quantidade de água fisiológica; meio de CAYE e IgGC também em quantidades iguais (0,5 ml) e enterotoxina contendo 2DA/0,1ml e soro anticólera (Dr. CARL E. MILLER, National Institutes of Health) diluído 1:10. Reações onde ocorreram diminuições das áreas azuladas iguais ou menores que a metade das obtidas com controle de enterotoxina e solução fisiológica foram consideradas como neutralização

parcial. Relações sem endureção ou cor azul, semelhantes ao controle colostro e meio de CAYE ou enterotoxina e soro anticólera foram consideradas como neutralização total.

#### Pesquisa de anticorpos anti-CF pela inibição da aglutinação de hemácias humanas

Considerando-se que em testes preliminares (dados não publicados) o soro anti-CF foi capaz de, em diluições baixas (1:16), impedir aglutinação de hemácias humanas por suspensões bacterianas com antígeno CF, procurou-se com os preparados de IgGC verificar se estes eram capazes de reproduzir o fenômeno.

Para tal, o crescimento de uma cultura em placa de Petri com meio de ágar peptonado a 2% foi ressuspensão em solução fisiológica 0,3M e em seguida padronizado de modo a conter 10<sup>10</sup> unidades formadoras de colônias por ml (UFC/ml). A partir desta suspensão foram feitas diluições razão 2, até a diluição 1:128. Volumes de 0,2ml de cada diluição foram misturados com igual quantidade de solução fisiológica 0,3M e incubados a 37°C por 30 minutos. Reações de aglutinação em lâmina foram então feitas misturando-se volumes de 0,02ml das suspensões bacterianas e igual volume de uma suspensão a 1%, em solução fisiológica com 0,5% de D-manose, de hemácias humanas do tipo O Rh. A utilização de sangue humano do tipo O se deveu ao fato de que alguns preparados de IgGC, provavelmente pela presença de isoanticorpos, foram capazes de aglutinar hemácias humanas do tipo B, que tem sido normalmente por nós utilizada para a detecção do antígeno CF. A diluição da suspensão bacteriana, que dentro de 1 a 2 minutos, em leitura microscópica (80x), era capaz de provocar a aglutinação de aproximadamente 50% das hemácias foi considerada como título da reação. Em repetidos testes verificou-se, que este valor era representado pela diluição 1:32.

A avaliação da possível atividade inibidora da capacidade de hemaglutinação pelas suspensões das culturas de *E. coli* 10407 em contacto com as IgGC foi feita incubando-se a 37°C por 30 min. volumes de 0,2ml destas IgGC com igual quantidade de suspensão bacteriana da amostra de *E. coli* 10407, diluída a 1:32. Após este tempo, procedeu-se a inibição da reação de hemaglutinação, conforme descrito acima.

### Pesquisa de anticorpos anti-CF pela hemaglutinação passiva com hemácias taninizadas

A pesquisa de anticorpos anti-CF pela técnica de hemaglutinação passiva com hemácias taninizadas foi feita de acordo com CRUICKSHANKS<sup>2</sup>. A padronização do antígeno CF a ser usado na sensibilização das hemácias foi realizada verificando-se qual a diluição de antígeno com que se obtinha maior título na reação frente ao anti-soro CF. Observou-se, desse modo, que a diluição ótima de antígeno CF a ser utilizada na sensibilização, dos glóbulos vermelhos era de 1:8. Outros detalhes referentes ao preparo e padronização de hemácias taninizadas, demais reagentes e técnica da reação foram idênticos ao descrito por aquele Autor<sup>2</sup>.

### RESULTADOS

As relações entre peso dos intestinos e peso das carcaças dos camundongos inoculados com as misturas de colostro e sobrenadante da cultura de *E. coli* 711 nal deram sempre valores inferiores a 0,085, compreendidos entre 0,050 e 0,072, com média  $\bar{x}=0,061 \pm 0,004$  (média  $\pm$  1 erro padrão da média). As relações, entre peso dos intestinos e peso das carcaças dos camundongos inoculados com as misturas dos colostros com enterotoxina ST deram valores compreendidos entre 0,104 e 0,157, com média  $\bar{x}=0,118 \pm 0,004$ . Camundongos inoculados apenas com enterotoxina ST diluída 1:2 em solução fisiológica deram valores de 0,121  $\pm$  0,038. A comparação destas duas medidas pelo test t, revelou ser  $p > 0,05$ , portanto, não significativa.

No estudo da avaliação da neutralização da atividade de LT, verificamos que os controles funcionaram satisfatoriamente, salvo algumas pequenas diferenças quantitativas observadas em um dos coelhos. Os resultados obtidos com as IgGC misturadas ao meio de CAYE e enterotoxina LT (2DA/0,1ml) adicionada ao soro anticólera diluído 1:10 foram negativos. Dentro do critério por nós estabelecido, verificamos que das 28 amostras de IgGC examinadas, 4, identificadas pelos números 3, 5, 6 e 10, inibiram parcialmente a atividade de PF da enterotoxina utilizada. Três amostras, identificadas pelos números 15, 19 e 28, foram capazes de inibir totalmente a enduração e a cor azul

característica do teste de PF, contrastando com as demais IgGC que não provocaram qualquer diminuição do valor observado para o controle positivo.

Na pesquisa de anticorpos anti-CF pelo teste de hemaglutinação passiva com hemácias taninizadas, 17 preparações de IgGC foram negativas: Outras 11 amostras positivas apresentaram títulos que variaram entre 1:20 e 1:160. As preparações de IgGC identificadas pelos números 10 e 28 corresponderam a colostros que foram capazes de neutralizar o efeito de PF da enterotoxina LT de *E. coli*. Apenas quatro amostras, 14, 17, 21 e 28 que deram títulos de 1:160 na hemaglutinação passiva, foram capazes de retardar a aglutinação de hemácias humanas em presença de suspensões bacterianas com antígeno CF. Quando a leitura microscópica foi realizada após 2 minutos verificou-se que alguns aglomerados de hemácias começaram a aparecer tornando difícil a interpretação do teste. Com relação ao preparado de IgGC de número 16, que na hemaglutinação passiva dera um título de 1:80, obteve-se algum retardamento, mas o resultado foi duvidoso.

Os resultados dos testes de hemaglutinação passiva e sua correlação com a inibição da aglutinação de hemácias humanas, frente a suspensões de colibacilos com antígenos CF e a inibição da atividade de PF se acham representados na Tabela I.

### DISCUSSÃO

Os lactentes alimentados com leite materno apresentam em relação aos amamentados artificialmente maior resistência às doenças infecciosas, em especial as que afetam o trato gastrointestinal<sup>12,13,24</sup>. Sabe-se hoje que na maior parte das vezes as imunoglobulinas IgA secretora são as efectoras desta imunidade conferida pelo leite materno<sup>24</sup>.

No presente trabalho, no que concerne a possível neutralização da atividade de ST pelo colostro não vimos necessidade em se recorrer a um processo de separação das imunoglobulinas, como foi feito para as demais provas. Verificamos que os colostros misturados aos sobrenadantes de cultura de *E. coli* 711 nal (não enterotoxigênica) não modificaram os resultados que normalmente são obtidos com preparados destituídos de atividade, havia o interesse de

T A B E L A I

Preparações de gamaglobulinas de colostros (IgGC) que reagiram no teste de hemaglutinação passiva para detecção de anticorpos anti-CF. Correlação com testes de inibição da aglutinação de hemácias humanas e de inibição do PF por anticorpos anti-LT

Amostras do IgGC	Títulos de anticorpos anti-CF pelo teste de hemaglutinação passiva	Inibição da aglutinação de hemácias humanas por colibacilo com antígeno CF	Inibição de PF por anticorpos anti-LT presentes nas preparações de IgGC
20	1:20	—	—
24	1:20	—	—
25	1:20	—	—
10	1:40	—	+
12	1:40	—	—
22	1:40	—	—
16	1:80	—	—
14	1:160	+	—
17	1:160	+	—
21	1:160	+	—
28	1:160	+	+

+ e — vide texto

se averiguar se outras atividades relacionadas a presença de fatores inibidores seriam capazes de inativar de algum modo a enterotoxina ST, neutralizando a dilatação e acúmulo de líquido nas alças intestinais de camundongos. Os resultados por nós obtidos em relação a uma possível neutralização de enterotoxina ST pelos colostros foram negativos. De certo modo estes achados eram esperados uma vez que a enterotoxina ST tem sido considerada como não imunogênica<sup>21</sup>. Embora, recentemente, com preparados purificados e através de processos de imunização com estes preparados ligados a antígenos proteicos se tenha conseguido induzir a formação de anticorpos específicos para ST<sup>1</sup>, os títulos obtidos foram baixos, sendo bem provável que em condições naturais não ocorra nenhuma resposta imune do tipo humoral.

Embora existam citações da presença no colostro de anticorpos contra antígenos somáticos de alguns sorotipos de *E. coli* enteropatogênicos, tais como 0111 e 055, existem dúvidas de que este fato seja suficiente para matar estas bactérias ou mesmo eliminá-las do trato intestinal<sup>24</sup>. Idênticas considerações poderiam ser feitas com relação a ocorrência no colostro de anticorpos dirigidos contra diferentes sorotipos de *E. coli*, entre os quais é mais comum a pro-

dução de enterotoxina ST (dados não publicados).

Se por um lado o colostro não foi capaz de proteger contra a enterotoxina ST, os preparados de IgGC de alguns colostros neutralizaram parcial ou totalmente a enterotoxina LT, quando examinada pelo teste de inibição de PF. Resultados semelhantes já foram relatados por outros Autores utilizando o teste da alça ligada do intestino de coelho<sup>24</sup> e o ensaio na linhagem y-1 de tumor de adrenal<sup>13</sup>.

Supondo-se que nos preparados de IgGC, apenas um dos colostros era reagente, verificamos que a ocorrência de 12,5% de resultados positivos é bem inferior ao relato por HOLM-GREEN & col.<sup>13</sup> que, trabalhando com colostro de mães paquistanesas, observou 83% de colostros com anticorpos anti-LT. Uma vez que nos colostros obtidos de mães suécas e norte-americanas a taxa de proteção contra os efeitos biológicos de enterotoxina LT foi nula, verifica-se que os valores obtidos na presente pesquisa situam-se numa faixa intermediária. Considerando-se que nestes países, e em especial nos Estados Unidos, a distribuição de colibactérios enterotoxigênicos é insignificante ou mesmo nula<sup>12</sup>, pode-se sugerir que a frequência de anticorpos anti-LT nas amostras de colostros de uma população possa ser um parâmetro pa-

ra se avaliar a distribuição *E. coli* LT+ entre os indivíduos que a compõe.

Tem sido demonstrado que a presença de anticorpos anti-K88 no colostro de suínos tem um envolvimento direto na proteção à diarreias causadas por colibacilos enterotoxigênicos portadores de antígenos K88<sup>19</sup>. Nas amostras de *E. coli* enterotoxigênicas de origem humana tem se dado muita importância ao antígeno CF. Existem evidências que outros antígenos não relacionados sorologicamente ao CF possam ocorrer (Dr. D. J. EVANS Jr., comunicação pessoal), porém, como amostras de *E. coli* enterotoxigênicas, portadoras deste fator CF já foram observadas entre nós (TRABULSI & col., dados não publicados) seria interessante saber-mos se as amostras de colostro por nós examinadas conteriam anticorpos anti-CF. A semelhança do observado por EVANS & col.<sup>8</sup> verificamos que o anti-soro específico contra o antígeno CF era capaz de impedir a aglutinação manose-resistente de hemácias humanas quando em contacto com uma suspensão de *E. coli* 10407. Todavia, quando tentamos realizar este teste com os colostros observamos que apenas 4(7,1%) deles possuíam a capacidade de inibir a reação. Esta neutralização, contudo, era parcial e instável, uma vez que, era limitada pelo tempo. Em um caso a reação foi duvidosa e em virtude dos resultados obtidos com o teste de hemaglutinação passiva, achamos que o teste de inibição da aglutinação de hemácias frente à suspensão de bactérias com antígeno CF deve ser encarado com reservas. Não há dúvidas que este último teste é bem menos sensível, sendo provável que a baixa concentração, de anticorpos, ainda que se utilize uma suspensão diluída de bactérias não seja suficiente para neutralizar através da reação antígeno-anticorpo todas as fímbrias do tipo CF, existentes no corpo da bactéria. O uso de hemácias tannizadas, sensibilizadas pelo antígeno CF, já foi bem mais animador, ou seja, 11 amostras (19,6%), se adotarmos o mesmo critério utilizado para o cálculo da neutralização de LT foram reagentes. Embora em alguns casos, os títulos observados tenham sido relativamente baixos, há que se considerar que em experimentos semelhantes realizados em animais vacinados com o antígeno K88 os valores achados não foram muito superiores<sup>19</sup>.

O encontro de apenas duas amostras de colostro com anticorpos anti-LT e anti-CF cor-

responde de certo modo ao que se tem encontrado na prática, isto é, tem-se observado que várias amostras de *E. coli* produtoras de LT não possuem concomitantemente o antígeno CF (TRABULSI & col., dados não publicados). Lembrando-se que estas características são codificadas por plasmídeos diferentes<sup>7,8,9</sup>, compreende-se a razão de determinadas amostras apresentarem ambas propriedades ou apenas uma. Como a resposta imune dos indivíduos de uma determinada população é consequência do contacto que estas tem com os antígenos nela distribuídos, entende-se porque alguns colostros conteriam apenas anticorpos anti-LT ou anti-CF.

Considerando-se que o antígeno CF já foi também observado em culturas de *E. coli*, produzindo apenas enterotoxina ST<sup>20</sup>, podemos inferir que anticorpos existentes no colostro, dirigidos contra antígenos CF ou outros antígenos de aderência similares, possam também impedir no lactente a colonização de colibacilos produtores de ST. Deste modo, o aparecimento de diarreia causada por amostras de colibacilos produtores de ST seria indiretamente controlada através de anticorpos anti-adesinas que estas amostras possuíssem.

Em consequência de nossos achados, nós acreditamos que existem agora razões adicionais, baseadas na experimentação científica, para se estimular constantemente o aleitamento materno, pelo menos no que concerne à prevenção de infecções entéricas ocasionadas por amostras enterotoxigênicas de *E. coli* portadoras do fator de colonização CF.

## SUMMARY

### Anti-thermolabile *Escherichia coli* enterotoxin and anti-colonization factor antibodies found in human colostrum

Due to the increasing importance of enterotoxigenic colibacilli and the respective colonization factor present in these strains very often, the main objective of this research was to detect the occurrence of antibodies against thermolabile enterotoxin (anti-LT) and against the colonization factor CF (anti-CF) among samples of colostrum collected from parturients in the city of Campinas, SP, Brazil. Fifty-six samples of colostrum were paired

and examined. Two samples were able to inhibit the permeability factor (PF). The presence of antibodies detected by the inhibition of hemagglutination by bacterial suspensions harbouring the CF antigen was demonstrated in four samples. The test of passive hemagglutination using sheep red blood cells sensitized with the CF antigen gave 11 positive results with titers ranging from 1:20 to 1:160. Only one sample of colostrum showed simultaneously the presence of antibodies against LT enterotoxin and CF. The activity of ST enterotoxin was not neutralized by any sample of colostrum. The results obtained with our samples of colostrum were placed in an intermediate level when compared with those reported for either paquistanese or sweden and American parturients. The test of passive hemagglutination seemed to be very sensitive for the detection of anti-CF antibodies. On account of these findings we believe that there is now further reasons for stimulating breast-milk feeding, at least as prevention against enteric infections caused by enterotoxigenic *E. coli* harbouring the colonization factor CF.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALDERETE, J. F. & ROBERTSON, D. C. — Purification and properties of Ent+ *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. 13th Joint Conference on cholera. The United States-Japan Cooperative Medical Science Program p.p. 19-31, 1977.
2. CRUICKSHANK, R. — *Medical Microbiology*. London, E. & S. Livingstone Limited, Ed., 1969.
3. DEAN, A. G.; CHING Y-C.; WILLIAMS, R. G. & HARDEN, L. B. — Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.* 125: 407-411, 1972.
4. DONTA, 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.
5. EVANS, D. G.; EVANS Jr., D. J. & 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.
6. EVANS Jr., D. G.; EVANS, D. G. & GORBACH, S. L. — Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect. & Immun.* 8: 725-730, 1973.
7. EVANS, D. G.; EVANS Jr., D. G. & DUPONT, H. L. — Virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 136: S118-S123, 1977.
8. EVANS, D. G.; EVANS Jr., D. G. & TIJOA, W. S. — 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.
9. EVANS, D. G.; EVANS Jr., D. G.; TIJOA, W. S. & DUPONT, H. J. — Detection and characterization of colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea. *Infect. & Immun.* 19: 727-736, 1978.
10. FIELD, M.; SAIRD, W. J.; GRAF Jr., L. H.; SMITH, P. L. & GILL, D. M. — Purification and mode of action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. 13th Joint Conference on cholera. The United States-Japan Cooperative Medical Science Program 13: 127-136, 1977.
11. GUERRANT, R. L.; BRUNTON, L. L.; SCHNAITMANN, T. C.; REBHUN, L. & GILMAN, A. G. — Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary cell morphology: a rapid sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect. & Immun.* 10: 320-327, 1974.
12. HANSON, L. A. & WINBERG, J. — Breast milk and defence against infection in the newborn. *Arch. Dis. Childh.* 47: 845-851, 1977.
13. HOLMGREEN, J.; HANSON, L. A.; CARLSON, B.; LINDBLAND, B. S. & RAHIMTOOLA, J. — Neutralising antibodies against *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* enterotoxins in human milk from a developing country. *Scand. J. Immunol.* 5: 867-871, 1976.
14. JONES, G. W. & RUTTER, J. M. — Role of the K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by *Escherichia coli* in piglets. *Infect. & Immun.* 6: 918-927, 1972.
15. LIMA, O. A. & SILVA, W. D. — *Imunologia, Imunopatologia e Alergia — Métodos*. 1.ª Edição. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 1970, 34-35.
16. MARTINS F.º, J. — *Contribuição ao estudo do aleitamento materno em Campinas*. [Tese de Livre Docência]. Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, 1976.
17. MORRIS, G. A.; STEVENS, A. E. & SOJKA, W. J. — Preliminary characterization of cell-free K99 antigen isolated from *Escherichia coli* B41. *J. Gen. Microbiol.* 99: 353-357, 1977.
18. ORSKOV, I.; ORSKOV, 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. *Acta Path. Scand.* 83: 31-37, 1975.
19. RUTTER, J. M.; JONES, G. W.; BROWN, G. T. H.; BURROWS, M. R. & LUTHER, P. D. — Antibacterial

- activity in colostrum and milk associated with protection of piglets against enteric diseases caused by K88 positive *Escherichia coli*. *Infect. & Immun.* 13: 667-676, 1976.
20. RYDER, R. W.; WACHSMUTH, I. K.; BUXTON, A. E.; EVANS, D. G.; DUPONT, H. L.; MASON, E. & BARRET, F. P. — Infantile diarrhea produced by heat-stable enterotoxigenic *Escherichia coli*. *N. Engl. J. Med.* 295: 849-853, 1976.
21. SACK, R. B. — Human diarrhea disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Microbiol.* 29: 333-353, 1975.
22. SMITH, H. W. & HALLS, S. — Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. *J. Path. Bact.* 93: 531-543, 1967.
23. SPEIRS, L. T.; STRAVIC, S. & KONOWALCHUK — Assay of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins with VERO cells. *Infect. & Immun.* 16: 617-622, 1977.
24. STOLIAR, O. A.; PRELLEY, R. P.; GREEN-KANIECKI, E.; KLAUS, M. H. & CARPENTER, C. C. J. — Secretory IgA against enterotoxins in breast-milk. *Lancet* 1: 1258-1261, 1976.

Recebido para publicação em 1/3/1979.