

Presença de substâncias fisiològicamente ativas em culturas de E. Coli isolados das fezes de pacientes alérgicos pela técnica de Heist-Cohen

por

João Canali Corrêa F.^o * — Oswaldo Tarcisio Godoy **

Em 1893 GILBERT demonstrou a existência de substâncias tóxicas solúveis nas culturas de *Escherichia coli*.

VICENT (1925) distinguiu duas toxinas, uma neurotrópica e outra enterotrópica. ACKERMANN (1910) assinalava a possibilidade de formação de histamina no transcurso da putrefação microbiana pela descarboxilização da histidina. KOESSLER & HANKE (1922) verificaram que a *E. coli* em meio ácido era capaz de produzir quantidade apreciável de histamina a fim de neutralizar o meio. Êstes trabalhos posteriormente foram confirmados pelas experiências de GALE (1940-1941) que verificaram a formação de histamina pela *E. coli* a partir da histidina pela descarboxilização dêste amino-ácido, observações estas, executadas por meio do aparelho de WARBURG. HALPERN & WALTHERT (1945) verificaram que o pH ótimo para a formação de histamina era de 5.

De um modo geral a formação de substâncias fisiològicamente ativas nas culturas de *E. coli* mereceu a atenção de numerosos investigadores e em nosso meio os trabalhos de XAVIER & PACHECO (1938 e 1939) verificaram que a toxicidade das culturas de *E. coli* corriam inversamente à formação de substâncias fisiològicamente ativas.

Dada a importância que representa a formação de histamina por parte dos germes intestinais como bem ficou evidenciado pelas experiências de LABORDE, PARROT, URQUIA (1953) na gênese das manifestações alérgicas, executamos as presentes experiências com amostras de *E. coli*, isoladas com a técnica de Heist-Cohen nas fezes de pacientes portadores de manifestações alérgicas diversas, com a finalidade de verificarmos si as mesmas eram ou não dotadas de atividade fisiológica,

* Bolsista do Instituto Oswaldo Cruz.

** Auxiliar de pesquisas do Instituto Oswaldo Cruz.

posto que KOESSLER-HANKE restringiram esta atividade a somente algumas amostras. Assim é que das 29 amostras utilizadas por estes autores, somente 6 foram capazes de produzir histamina a partir da histidina.

Nos pacientes estudados em nossas experiências, foram excluídos de participação tanto quanto possível, outros alérgenos endógenos e exógenos a exceção da *E. coli*. Os pacientes em questão apresentavam as seguintes histórias clínicas sumarizadas: 564 — Sexo masculino, branco, 31 anos de idade. Colite há seis meses. Os ascendentes não eram portadores de manifestações alérgicas. A prova de Heist-Cohen nas fezes foi positiva para o *E. coli*. 719 — Sexo feminino, branca, 17 anos de idade. Urticárias há um mês. Os ascendentes não eram portadores de manifestações alérgicas. Prova de Heist-Cohen nas fezes positiva para *E. coli*. 734 — Sexo feminino, branca, 69 anos de idade. Eczema generalizado há um ano sujeito a remissões. Climatério aos 54 anos. Os ascendentes não eram portadores de manifestações alérgicas. Prova de Heist-Cohen nas fezes positiva para *E. coli*. 570 — Sexo masculino, branco, 40 anos de idade. Colite com surtos de urticárias há vários anos. Os ascendentes não eram portadores de manifestações alérgicas. Prova de Heist-Cohen nas fezes positiva para *E. coli*.

TÉCNICA

As amostras de *E. coli* isoladas pela técnica de Heist-Cohen (Segundo KOLMER e BOERNER 1938) das fezes dos pacientes acima referidos, foram semeadas em um meio de seguinte composição definida:

Água	100 cm ³
K ₂ HPO ₄	0.2 grs.
Extrato de levedo Difco	0.5 grs.

Os germes semeados foram incubados por 7 dias a 37°C findo os quais procedeu-se a centrifugação das culturas cujos sobrenadantes posteriormente foram ensaiados sobre a preparação de ileo de cobaio, segundo técnica de Cohnheim-Magnus, modificada por LOHMAN (1912), conforme descrição abaixo:

Cobaio macho de 340 grs. de peso, com 24 hs. de jejum, foi sacrificado no momento da experiência. Imediatamente após a morte do animal a cavidade abdominal foi aberta largamente e das primeiras porções do intestino delgado foi excisada uma alça com ca. de 10 cm. de comprimento, logo imersa em líquido de Tyrode.

Um segmento de intestino de 4 cms. de comprimento era então suspenso em solução de Tyrode convenientemente oxigenada e mantida à temperatura constante (38°C), durante todo o tempo da experiência. Esta preparação servia a vários ensaios, renovando-se de cada vez após um intervalo de 5 minutos a solução de Tyrode por meio de um frasco

de reserva, no qual o Tyrode era mantido também em temperatura constante (38°C). Em cada ensaio o sobrenadante do centrifugado de cultura era adicionado à solução de Tyrode na qual já estava imersa a preparação. Os resultados eram registrados por meio de alavanca, em cilindro enfumaçado deslocando-se lentamente. A alavanca estava aparelhada para inscrição lateral e ampliava as contrações de 7 vezes. Cada cm. da abcissa do traçado corresponde a 10 segundos.

Dada a grande concentração de substâncias fisiologicamente ativas no meio, foi o mesmo diluído em Tyrode na proporção de 1 cm³ do sobrenadante para 9 cm³ de Tyrode, e desta diluição de 1 cm³ de cada uma das amostras era colocada sobre preparação. A capacidade da cuba em que estava imersa a preparação era de 10 cm³.

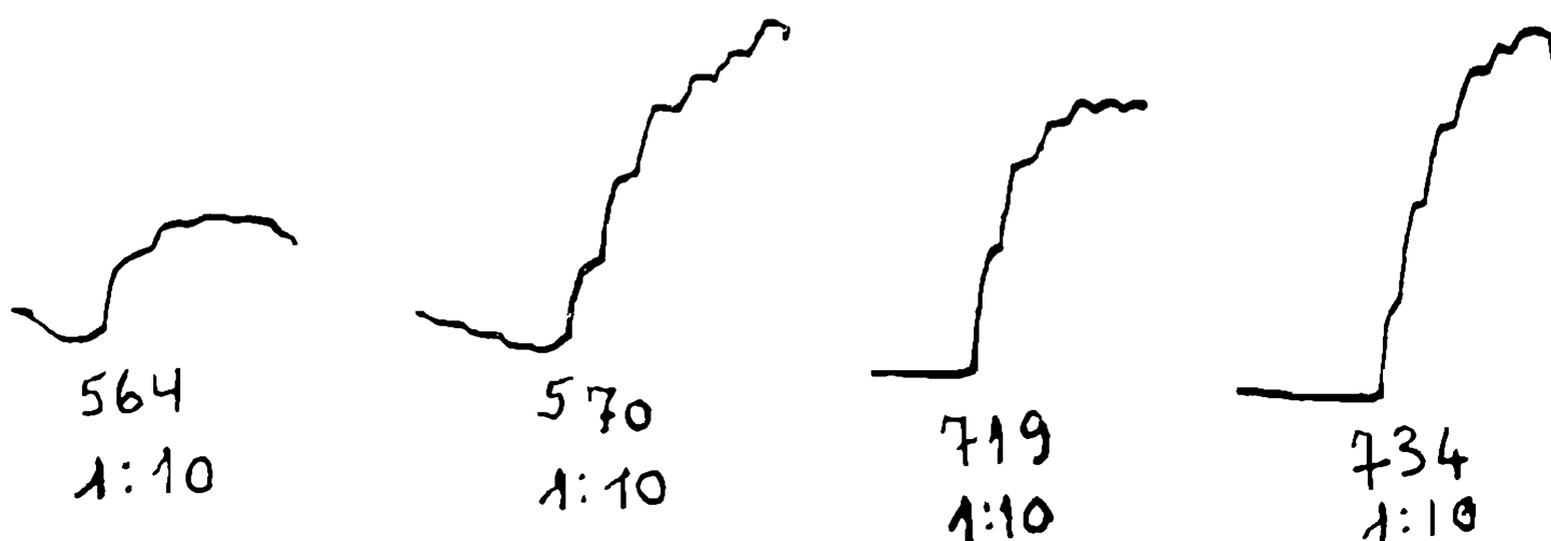


Fig. 1

Analogamente em outra oportunidade, 10 amostras diferentes de *E. coli* escolhidas ao acaso da coleção do Instituto Oswaldo Cruz e semeadas em meio idêntico ao mencionado, e incubadas durante 7 dias a 37°C foram ensaiadas segundo a técnica acima descrita.

RESULTADOS

Tôdas as amostras ensaiadas de *E. coli*, isoladas pela técnica de Heist-Cohen das fezes de indivíduos portadores de manifestações alérgicas, foram capazes de produzir contração do ileo de cobaio conforme se pode ver na Fig. 1. O meio de cultura utilizado e que foi ensaiado na mesma ocasião, não demonstrou possuir nenhuma atividade sobre a preparação.

Das 10 outras amostras de *E. coli* escolhidas ao acaso, somente 3 demonstraram possuir atividade fisiológica evidência esta, que vem confirmar as experiências de KOESSLER-HANKE que em 29 amostras experimentadas encontraram somente 6 amostras dotadas de atividade fisiológica.



Fig. 2 — W. A. 33 anos de idade. Branco. Sexo masculino (24-4-1952). Eczema crônico há 6 anos, de uma das mãos. Prova de Heist-Cohen nas fezes positivas para *E. coli*.

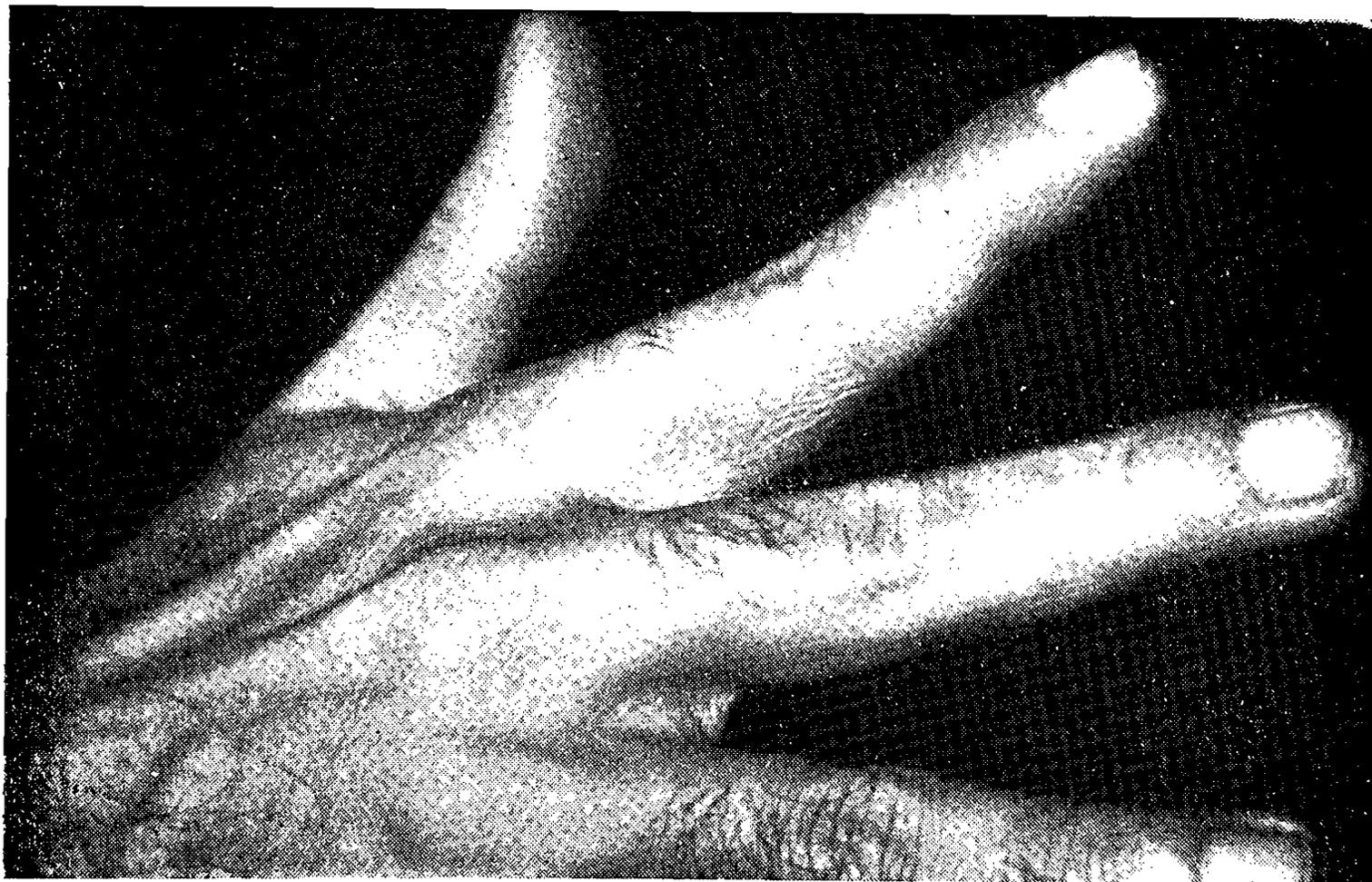


Fig. 3 — Aspecto tomado após o uso de Terramicina (250 mg) cada 6 h durante 6 dias.

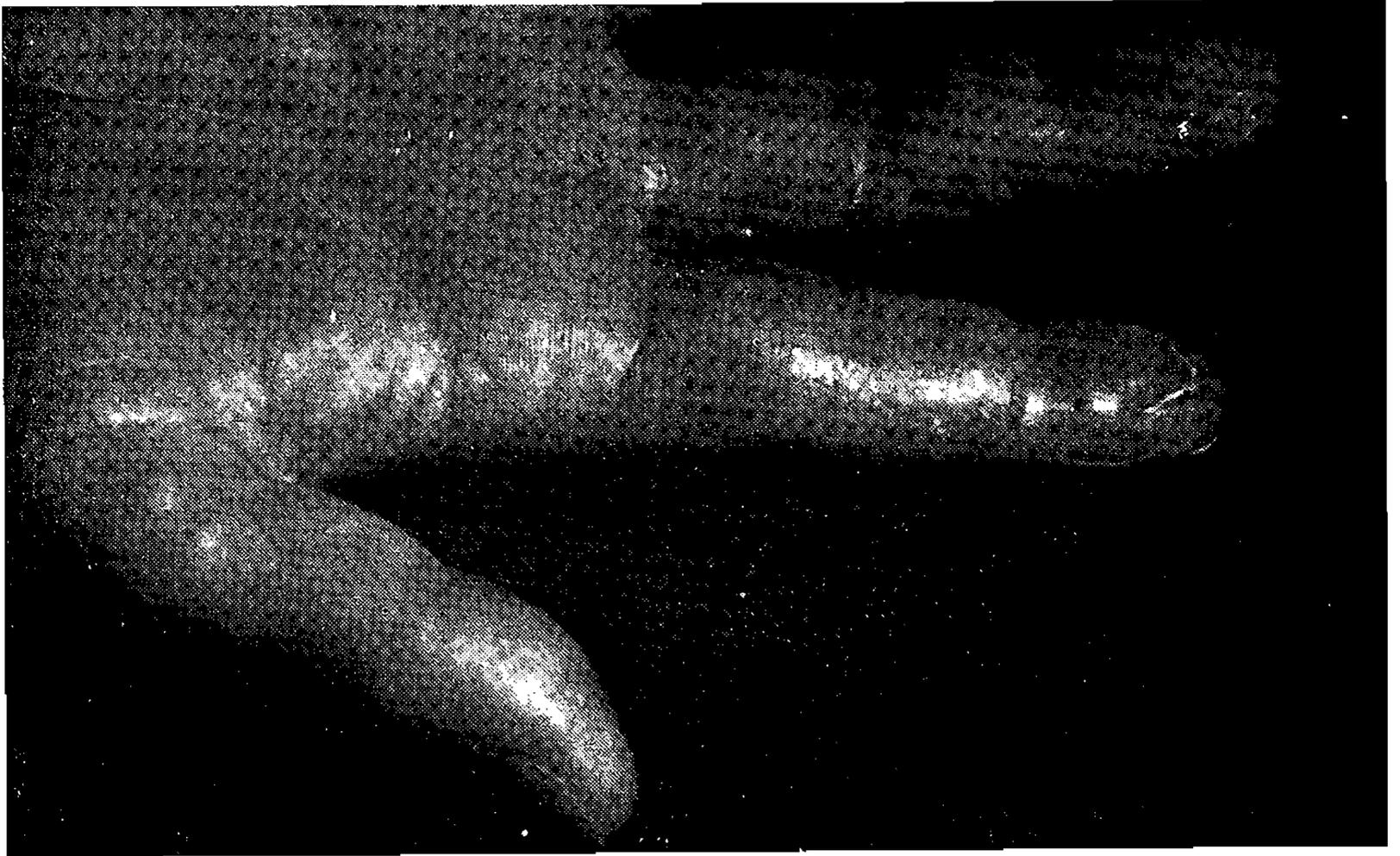


Fig. 4 — O mesmo eczema visto por outro ângulo.



Fig. 5 Aspecto tomado após o uso de Terramicina visto através o mesmo ângulo que a Fig. 4.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A importância da formação de histamina por parte de elementos da flora intestinal na produção de manifestações alérgicas, ficou bem evidenciada pelas experiências de LABORDE e colaboradores (1953).

KOESSLER e HANKE demonstraram que o *E. coli* é o principal elemento da flora intestinal na produção de histamina, porém, demonstraram também que nem tôdas as amostras de *E. coli* desfrutavam dêste atributo assim é que de 29 amostras experimentadas sòmente 6 apresentaram esta propriedade.

Os resultados acima consignados, sugere-nos muito embora o número de casos em aprêço fosse pequeno, que a reação de Heist-Cohen levada a efeito nas fezes foi capaz de isolar amostras de *E. coli* dotadas de atividade fisiológica, ocorrência esta, que veio demonstrar que as manifestações alérgicas apresentadas por êste grupo de pacientes, afastadas outras causas possíveis, eram decorrentes de duas ações ou sejam: por um lado a sensibilização ao germe indicada pela positividade da reação de Heist-Cohen como querem HARLEY (1952), SOLIS-COHN (1936) e URBACH (1943) e por outro lado a produção de histamina por parte dêstes mesmos germes.

De acôrdo com as ações acima referidas como causadoras das manifestações alérgicas, podemos concluir que nos casos estudados, uma dessensibilização específica ao germe não é suficientemente rápida para que traga um alívio imediato aos pacientes. A nosso ver, e de acôrdo com que um de nós teve oportunidade de observar, o emprêgo de antibióticos (Terramicina) antecedendo a dessensibilização específica, tem proporcionado alívio relativamente rápido e eficaz em outros casos semelhantes. Um exemplo dêste tratamento pode ser visto nas Figs. 2, 3, 4 e 5.

SUMMARY

PRESENCE OF SUBSTANCES WITH PHYSIOLOGICAL ACTIVITY IN CULTURES OF *E. COLI* ISOLATED FROM STOOLS IN ALLERGIC PATIENTS BY THE HEIST-COHN PATHOGEN SELECTIVE METHOD

Four patients with several allergic symptoms have been studied.

Heist-Cohn pathogen selective method was positive in feces of all these patients for *E. coli*. Other causes that could be responsible for the allergic symptoms were discarded.

Samplers after seeding in a medium physiologically inactive have been tested in guinea pig ilea following Cohnheim-Magnus technique.

It was demonstrated that all samples isolated by the Heist-Cohn technique were physiologically active. (Fig. 1).

Ten other strains of *E. coli* taken at random from the collection of I.O.C. and tried according similar technique, brought evidence that only three samples possessed such activity. This confirms the works of KOESSLER-HANKE (1922).

In order to obtain a quick relief from allergic symptoms, one of us had employed in some others, identical cases an antibiotic (Terramycin, Chas Pfizer) before the specific desensitization was done. (Figs. 2, 3, 4, 5).

Such method were choice since LABORDE, PARROT, and URQUIA (1953) have demonstrated the importance of production of histamine, from components of the bowel's flora in the production of allergic symptoms.

Deixamos aqui consignado os nossos agradecimentos aos Doutores ANTÔNIO AUGUSTO XAVIER e OSWALDO CRUZ FILHO pelo valioso auxílio técnico dispensado.

BIBLIOGRAFIA

- ACKERMANN, D., 1910, *Hoppe Seyler's Zeitschr. f. physiolog. Chem.*, 65 : 504.
GALE, E.F. 1940, *Biochem. J.* 34 : 392.
GALE, E.F., 1941, *Biochem. J.*, 35 : 66.
GILBERT, A., 1893, *C. R. Soc. Biol.*, 45 : 214.
HALPERN, B.N. & WALTHERT, C., 1945, *C. R. Soc. Biol.*, 139 : 365.
HARLEY, D., 1952, *Fortschritte der Allergielehre*. S. Karger.
KOLMER, J.A. & BOERNER, F., 1938, *Approved Laboratory Technic*.
KOESSLER, K.K. & HANKE, M.T.J., 1922, *Biol. Chem.* 50 : 131.
LABORDE, C., PARROT, J.L. & URQUIA, D.A., 1953, *Presse Méd.* 61 : 1151 e 1267.
LOHMANN, A., 1912, *Zeitschr. f. Biol. Technik u. Methodik*, 2 : 272.
SOLIS-COHEN, 1936, *Lancet*, 11 : 1447.
URBACH, E., 1943, *Allergy*, Grune Stratton, N.Y.
VINCENT, H., 1928, *C. R. Acad. Sc.* 187 : 787.
XAVIER, A.A. & PACHECO, G., 1938, *Mem. I. O. C.* 35 : 63.
XAVIER, A.A. & PACHECO, G., 1939, In L. de H. Profs. Alvaro e Miguel Ozorio de Almeida.