

LUCILA COSTALLA FICCI

CARACTERIZAÇÃO DE PROPRIEDADES FÍSICO QUÍMICAS E SEMI-PURIFICAÇÃO DA ENTEROTOXINA TERMO-ESTÁVEL (ST) DE Escherichia coli

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

Orientador:

Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro

Departamento de Microbiologia e Imunologia  
Universidade Estadual de Campinas  
São Paulo - Brasil

1980

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

*Aos meus pais, Renato e Bebê,  
a meu esposo, Paulo Eduardo e  
ã minha filha Tatiana.*

Ao

Professor Dr. Humberto de Araujo Rangel, que contribuiu nesta tese como um colaborador precioso, co-orientando os trabalhos práticos, meus agradecimentos pelos conhecimentos científicos, amizade e estímulo que me ofereceu.

Aos meus pais, Roberto e Ruth,  
a meu esposo, Paulo Eduardo  
e minha filha, Mariana.

## AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. A. F. Pestana de Castro

Profa. Dra. Marlene Braide Serafim

Prof. Dr. Jorge A. Guimarães

Prof. Dr. Fawzi Dawood

Prof. Dr. Antonio C. Corsini

Profa. Dra. Julia Prado Franceschi

Margaretti Simões Oliveira

Angela Cristina Rodrigues

Aparecida Celli Paulista de Almeida

Manoel Bernardo da Silva

Geneci Fernandes Davi

Demais colegas e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade de Campinas.

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS.

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

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq.

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR - CAPES.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (Divisão de Imunologia).

BIBLIOTECA REGIONAL DE MEDICINA.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, a autora foi bolsista do CNPq e posteriormente do CAPES nas fases iniciais do mesmo. Externamos nossos agradecimentos a estas instituições.

## SUMÁRIO

CAPÍTULOS	Págs.
I. INTRODUÇÃO .....	1
II. MATERIAL E MÉTODOS .....	6
1. Amostra .....	6
2. Meio de cultura para produção de enterotoxina..	6
3. Preparo da toxina bruta .....	7
4. Ensaio para detecção da enterotoxina ST .....	8
5. Dosagem de proteínas .....	9
6. Estudos das propriedades físico-químicas da en- terotoxina ST .....	9
6.1. Métodos dependentes da solubilidade.....	10
6.1.1. Precipitação por Sulfato de Amônio.	10
6.1.2. Precipitação por Acetona .....	10
6.1.3. Precipitação por TCA e Acetona ....	11
6.2. Métodos dependentes de propriedades hidro- dinâmicas .....	12
6.2.1. Ultrafiltração em PM-10 .....	12
6.2.2. Ultrafiltração em "hollow fibers"..	12
6.2.3. Filtração em Gel .....	13
6.2.3.1. Sephadex G-25 .....	13
6.2.3.2. Sephadex G-15 .....	13
6.3. Métodos dependentes da carga elétrica.....	14
6.3.1. Tampões .....	14
6.3.2. Efeito do pH na atividade de entero- toxina ST .....	14
6.3.3. Cromatografia em permutador Catiôni- co (MERCK) .....	14

CAPÍTULOS

Págs.

6.3.4. Cromatografia em Permutador Aniônico (MERCK) .....	15
6.3.4.1. Estudo de fixação da toxina bruta nos pHs 6, 7 e 8. ....	15
6.3.4.2. Cromatografias nos pHs 9 e 10 .....	15
6.3.4.3. Cromatografia em Permutador Aniônico, pH 9, fluxo lento .....	15
6.3.4.4. Estudo em "batch" para avaliação do tempo de contato toxina/resina .....	16
6.3.4.5. Cromatografia em Permutador Aniônico, pH 9, fluxo rápido .....	16
6.3.5. Cromatografia em DEAE-celulose.....	17
6.3.6. Cromatografias Seriadas .....	17
7. Purificação da enterotoxina ST.....	18
7.1. Permutador Aniônico pH 9 .....	18
7.1.1. Preparação da Resina .....	18
7.1.2. Cromatografia .....	18
7.2. Diálise .....	19
7.3. Filtração em Sephadex G-15 .....	19
7.4. Cromatografia em papel .....	20
III. RESULTADOS .....	21
A - Estudo das propriedades físico-químicas de ST	21
1. Estudo dos métodos dependentes das características de solubilidade .....	21

CAPÍTULOS	Págs.
1.1. Precipitação por Sulfato de Amônio .....	21
1.2. Precipitação por Acetona .....	21
1.3. Precipitação por TCA e Acetona .....	22
2. Estudo dos métodos dependentes de propriedades hidrodinâmicas da enterotoxina ST .....	22
2.1. Ultrafiltração .....	23
2.1.1. Ultrafiltração em PM-10 .....	23
2.1.2. Ultrafiltração em "hollow fibers"..	24
2.2. Filtração em gel .....	24
2.2.1. Sephadex G-25 .....	24
2.2.2. Sephadex G-15 .....	25
3. Estudo dos métodos dependentes da carga elétri- ca .....	25
3.1. Escolha de tampões adequados .....	25
3.2. Efeito do pH na atividade da toxina .....	26
3.3. Cromatografia em Permutador Catiônico.....	27
3.4. Cromatografia em Permutador Aniônico .....	27
3.4.1. Estudo de fixação da toxina bruta nos pHs 6, 7 e 8 .....	27
3.4.2. Cromatografia nos pHs 9 e 10 .....	27
3.4.3. Cromatografia em pH 9, fluxo lento.	28
3.4.4. Estudo em "batch" para avaliação do tempo de contacto toxina/resina....	29
3.4.5. Cromatografia em Permutador Aniôni- co, pH 9, fluxo rápido .....	30
3.5. Cromatografia em DEAE-celulose .....	30
3.6. Cromatografias seriadas .....	31
B - Purificação da enterotoxina ST .....	32

CAPÍTULOS	Págs.
1. Permutador Aniônico .....	27
2. Diálise .....	29
3. Filtração em Sephadex G-15 .....	35
4. Cromatografia em papel .....	35
IV. DISCUSSÃO .....	44
V. RESUMO E CONCLUSÕES .....	53
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56

## INTRODUÇÃO

Embora se saiba de longa data que os colibacilos fazem parte da flora normal do intestino, a partir de 1940, evidências clínicas fizeram com que se suspeitasse de que esta bactéria pudesse estar envolvida em quadros de diarréias no homem e em animais.

Com base nesses achados, a Escherichia coli começou a ser melhor estudada quanto a aspectos bacteriológicos, sorológicos e principalmente no que se refere a sua ação enteropatogênica.

Os colibacilos enteropatogênicos clássicos, tais como os representados pelos sorogrupos 055, 026, 0111, 0119 e outros, envolvidos em casos de diarréia em crianças de até dois anos e meio de idade apresentam mecanismo de patogenicidade ainda não esclarecido. Os demais colibacilos enteropatogênicos possuem alguns fatores de virulência que se encontram bem estudados.

Assim sendo, já se conhece atualmente, que o mecanismo de invasão de células do intestino grosso por alguns colibacilos com características bioquímicas peculiares, é semelhante, se não idêntico, àquele observado com os bacilos disentéricos (50).

Esses colibacilos invasores, a semelhança de Shigella sp, não parecem ocorrer em outros animais que não os primatas. Ao contrário, a produção de enterotoxinas tem sido descrita em amostras de colibacilos isolados de casos de diarreia no homem e animais.

Aliás, grande parte dos estudos iniciais sobre a enteropatógenidade de Escherichia coli foram feitas por pesquisadores veterinários (35, 40, 52), principalmente no que se refere aos ensaios biológicos. Esses estudos e outras pesquisas (53), estabeleceram a existência de pelo menos dois tipos de enterotoxinas que por suas propriedades de resistência ao calor foram denominadas de termo-lábil (LT) e termo-estável (ST), sendo a produção de ambas controladas por plasmídeos (28, 47, 48).

Além da produção de enterotoxinas, tem sido geralmente aceito, que a colonização do intestino, é um pré-requisito para as doenças diarreicas causadas por colibacilos enteropatógenicos (16, 18, 32, 44). As estruturas responsáveis por esta colonização, primeiramente descrita em amostras de origem animal, são antígenos de superfície representados por determinados tipos de fímbria, em sua maioria capazes de aglutinar hemácias na presença de D-manose (4, 32). O antígeno K88 tem sido encontrado em amostras enterotoxigênicas de origem suína, ao passo que o antígeno K99, inicialmente relatado apenas em amostras bovinas, tem sido encontrado também em colibacilos isolados de porcos (51).

Mais recentemente, antígenos semelhantes quanto as suas propriedades de aderência, porém antigenicamente distintos dos acima citados, foram descritos em amostras de colibacilos isoladas do homem (16, 17, 18).

Quanto a enterotoxina LT, graças a uma série de características muito semelhantes a de cólera (27), foi exaustivamente estudada nos últimos anos, embora só recentemente tenham surgido alguns trabalhos sobre sua purificação (7, 9, 10, 49).

Mesmo trabalhando-se com preparados brutos desta enterotoxina, pode-se concluir ser a mesma protéica, de alto peso molecular, não dialisável e imunogênica (46). Propriedades biológicas bastante semelhantes a enterotoxina de Vibrio cholerae foram verificadas em LT, tais como dilatação da alça ligada de animais experimentalmente inoculados, aumento da permeabilidade vascular em testes intradérmicos em coelhos e mais recentemente, alterações morfológicas de algumas linhagens celulares, tais como Y1 (12), CHO (26) e VERO (55).

Quanto ao modo de ação foi verificado também, que ambas ativam o sistema adenil ciclase, aumentando o AMP cíclico intracelular (2, 46), além de se adsorverem ao mesmo receptor celular, o gangliosídeo Gm1 (57).

Essas semelhanças fizeram com que vários pesquisadores estudassem as relações antigênicas entre as toxinas de Vibrio cholerae e a enterotoxina LT de Escherichia coli. Os estudos iniciais nesse sentido, embora demonstrassem uma neutralização "in vivo" da enterotoxina LT pelo antisoro da toxina colérica e vice-versa, apresentaram alguns resultados contraditórios (54).

Estes achados provavelmente podem ser explicados pelo fato de se ter trabalhado na época, com a enterotoxina LT não purificada ou parcialmente purificada. Recentemente, Clement e col. (8), trabalhando com a enterotoxina LT pura, estabeleceram que esta é imunologicamente, estruturalmente e biologicamente semelhante ao "choleragen" ou toxina colérica.

Tais estudos, praticamente dissiparam dúvidas que ainda poderiam existir, quanto a esta similaridade. Entretanto, queremos ressaltar que estes só foram possíveis depois da purificação desta enterotoxina. É bem provável que com a LT purificada, novas semelhanças possam ser estabelecidas.

Fundamentalmente, os fatores que colaboraram para o estudo e análise da purificação da enterotoxina LT estão relacionados a suas características físico-químicas como peso molecular elevado sendo portanto não dialisável e em virtude de existirem já descritos, ensaios biológicos bastante sensíveis como os realizados em culturas de tecido (12, 26, 55). Além do mais, o fato desta enterotoxina ser imunogênica, testes sorológicos tais como imunodifusão em gel e imuno hemólise passiva, puderam ser utilizados na análise de sua purificação (7).

Por outro lado, a falta de uma imunogenicidade comprovada da enterotoxina ST, aliada a outros fatores tais como a escassez de métodos biológicos sensíveis, bem como o seu baixo peso molecular, fizeram com que os trabalhos de purificação desta enterotoxina, embora tentados por vários autores (19, 30, 38), encontrassem grandes dificuldades. Entre os ensaios biológicos, o teste do camundongo recém-nascido (11, 22), tem sido a única prova confiável na detecção da enterotoxina ST para fins de diagnóstico ou para análise de sua purificação, uma vez que o teste da alça ligada de coelho não fornece, via de regra, resultados constantes (21).

Ao contrário da toxina termo-lábil, a ST possui em testes de alça ligada em animais (46), período de latência menor, com efeito menos duradouro, embora o resultado final de ambas, resida num acúmulo de líquido na luz intestinal.

Estas diferenças refletem na realidade, mecanismos diversos a nível molecular como comprovam diversos autores (19, 23, 29), demonstrando um aumento do GMP cíclico após a administração da mesma.

Ao iniciarmos este trabalho, desconhecia-se muitas das características da enterotoxina ST. Durante a fase experimental do mesmo, laboratórios com maiores recursos começaram a relatar os primeiros estudos sobre sua purificação (1, 58).

A continuidade de nossa pesquisa, com base nos trabalhos de Franceschi e col. (21) e Castro e col. (6), onde se evidenciaram diferenças na atividade da enterotoxina ST, respectivamente quanto a sua termolabilidade e susceptividade em diferentes raças isogênicas, levaram-nos a suspeitar que diferentes toxinas termo-estáveis deveriam existir.

Seria pois importante, que se processasse a purificação ou semi-purificação da enterotoxina ST em nosso meio, desenvolvendo nossa própria tecnologia. Somente com preparados concentrados, purificados ou semi-purificados, poderíamos analisar essas diferenças observadas entre as enterotoxinas procedentes de diferentes origens, bem como examinar mais detalhadamente suas propriedades biológicas.

Assim sendo, o objetivo deste trabalho teve como finalidade principal o estudo de algumas características físico-químicas da enterotoxina ST produzida por uma amostra humana, para que se possa com tais resultados, se estabelecer uma seqüência de técnicas para a purificação da mesma.

## II. MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Amostra

Trabalhou-se com a amostra de Escherichia coli 3, exclusivamente produtora de ST, sorogrupo 0128ac, H21, de origem humana, cedida pela Dra. Marlene Braide Serafim, da Universidade Estadual de Campinas. Durante toda a realização do trabalho, a amostra foi conservada em tubos de ágar simples inclinado, tendo sido repicada após passagem por meio seletivo em ágar MacConkey (DIFCO-Laboratories), cada dois meses.

### 2. Meio de cultura para produção de enterotoxina

Para o preparo da toxina, a amostra foi cultivada em meio de CAYE (Casamino Acid Yeast Extract) (14). Este meio de cultura tem a seguinte composição: 0,6% de extrato de levedura, 2% de casamino ácido (DIFCO), 0,25% de NaCl, 0,27% de  $K_2HPO_4$  e 0,1% de uma solução salina contendo 5% de  $MgSO_4$ , 0,5% de  $MnCl_2$ , 0,54% de  $FeCl_3$  e 0,001 M de  $H_2SO_4$ . Após o preparo, o pH do meio foi acertado para 8,5 com NaOH 1M. Procedeu-se a

esterilização do meio pronto, por autoclavação a 121°C, durante 15 minutos.

### 3. Preparo da toxina bruta

Para o preparo da enterotoxina bruta, semeou-se a amostra 3 em tubos contendo 2 ml de caldo simples. A partir de um cultivo de 6 horas, 0,05 ml destas culturas, foram adicionados a Erlenmeyers de 125 ml, contendo 12,5 ml do meio de CAYE. Em seguida, os frascos foram colocados em estufas com agitação (150-200 rpm) e incubados a 37°C durante 18 horas. As culturas foram então centrifugadas a 3.079g durante 30 minutos e os 3/4 superiores dos sobrenadantes obtidos, separados e conservados a -20°C.

Foi preparado um total de 5 litros de sobrenadante de cultura proveniente da mistura de diversos lotes e ao qual foi adicionado mertiolato na proporção 1/10.000 como preservativo.

A mistura dos sobrenadantes foi examinada quanto a presença de enterotoxinas ST e LT pelos testes do camundongo recém-nascido (11) e arredondamento de células Y1 em cultura de tecido (12) respectivamente, reafirmando ser a amostra 3, exclusivamente produtora de ST.

Este preparado de toxina bruta, constituiu o material básico deste trabalho, com o qual foram realizados os testes de caracterização e purificação da enterotoxina ST de Escherichia coli.

#### 4. Ensaio para a detecção da enterotoxina ST

Por ser a enterotoxina ST de E. coli não imunogênica, o único recurso que se pode utilizar para a caracterização da mesma no desenvolvimento deste trabalho, constituiu-se do ensaio biológico em camundongos recém-nascidos, específico para esta toxina (11, 22).

O teste de Dean (11) em camundongos recém-nascidos, avalia a atividade de ST a nível intestinal pelo acúmulo de líquido encontrado dentro das alças, que quando presente, altera a relação peso do intestino/peso da carcaça. Em condições normais, esta relação se situa na faixa de 0,05 a 0,07.

Para a realização do teste de Dean, foram separados lotes de 4 camundongos suíços, com 2 a 4 dias de idade. A cada animal foi administrado no estômago, por injeção percutânea, 0,1 ml de amostra contendo 0,1% de azul de Evans. Após 3 a 4 horas da inoculação, os animais foram sacrificados por inalação com éter sulfúrico e quando o azul de Evans evidenciava a inoculação correta, através da presença do corante na cavidade gástrica, os intestinos eram separados das carcaças. Determinava-se então, a relação peso dos intestinos/peso das carcaças, tendo sido considerados como positivos, os valores maiores ou iguais a 0,085.

No estudo da proporcionalidade entre dose/efeito da toxina, foi verificado que o teste do camundongo, não deve ser usado quantitativamente, com base exclusiva na relação peso do intestino/peso da carcaça. Esta impossibilidade deve-se ao fato de existir um limite nas alterações desta relação de até 0,15 (30), acima da qual, ocorre morte de um ou mais dos quatro camundongos do grupo. Além disso, a injeção direta no es-

tômago do animal, normalmente provoca refluxo, alterando a quantidade de toxina no interior do tubo digestivo. Como, para a análise do trabalho de purificação, era fundamental quantificar a toxina ST nas frações obtidas, padronizou-se como uma unidade tóxica (1 U.T.), a maior diluição numa série com razão de 2, que produza relação peso do intestino/peso da carcaça, maior ou igual a 0,085.

#### 5. Dosagem de proteínas

Algumas dosagens de proteínas foram realizadas pelo método de Lowry (36), utilizando-se o reativo de Folin fenol. Por facilidade de análise, em muitos testes, a determinação das proteínas presentes na amostra, foi avaliada pela absorção das mesmas a 280 nm em espectrofotômetro ZEISS, PMQ II. A atividade específica, que durante o desenvolvimento deste trabalho foi utilizada como critério de purificação, teve seus valores calculados com base no número de U.T./ml encontrados na amostra analisada, por absorção da mesma a 280 nm.

#### 6. Estudo das propriedades físico-químicas da enterotoxina ST

Com o objetivo de se tentar caracterizar as propriedades de ST, métodos dependentes da solubilidade, propriedades hidrodinâmicas e da carga elétrica foram realizados com a toxina bruta.

## 6.1. Métodos dependentes da solubilidade

### 6.1.1. Precipitação por Sulfato de Amônio

A 300 ml de toxina bruta, foram adicionados 198,6 g de sulfato de amônio (MERCK), correspondendo a uma saturação de 90%. A precipitação procedeu-se com o sal pulverizado em gral, tendo sido o mesmo, adicionado lentamente à toxina, sob agitação constante, a 4°C. Após a precipitação, a amostra foi centrifugada a 12.100 g durante 30 minutos. O precipitado foi então ressuspensão em 20 ml de água destilada e dialisado durante 24 horas para eliminação de resíduos do sal.

### 6.1.2. Precipitação por Acetona

À alíquotas de 5 ml de toxina bruta, foi adicionado acetona P.A. até serem alcançadas as concentrações finais de 50, 66, 80, 94 e 96% nas diversas frações. A precipitação procedeu-se a 4°C sob agitação constante, tendo sido a acetona, adicionada lentamente. As misturas permaneceram então, em repouso a 4°C durante 18 horas, após as quais foram centrifugadas a 12.100 g por 30 minutos. Uma vez separados os precipitados, resíduos de acetona foram eliminados por evaporação até a obtenção de um pó seco, que foi ressuspensão em 5 ml de água destilada. Para uma melhor análise da atividade tóxica de ST nos precipitados obtidos, repetiu-se a precipitação com acetona a -20°C, evitando-se desta forma, desnaturação das moléculas da mistura. Assim sendo, a 160 ml de toxina bruta, 320 ml de acetona

tona P.A. foram adicionados lentamente, a  $-20^{\circ}\text{C}$ , sob agitação constante. A mistura permaneceu nesta temperatura em repouso, durante 18 horas, após as quais, o precipitado foi separado nas mesmas condições acima descritas e ressuspensão em 16 ml de tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0.

### 6.1.3. Precipitação por TCA e Acetona

A 100 ml de toxina bruta, adicionou-se o ácido tricloroacético (TCA), na concentração final de 10%. A precipitação procedeu-se lentamente, a  $4^{\circ}\text{C}$  sob agitação constante. Dessa mistura, 10 ml foram separados e permaneceram em repouso sem neutralização durante 18 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ , após os quais foram centrifugados a 12.100 g por 30 minutos. Ressuspendeu-se o precipitado obtido em 1 ml de fosfato dissódico 0,1 N.

O volume restante (90 ml) permaneceu em repouso apenas 30 minutos após a adição do TCA, sendo então neutralizado com NaOH 4N e 1N. Para a separação do precipitado obtido, a amostra foi centrifugada nas mesmas condições anteriores, sendo o mesmo ressuspensão em 9 ml de fosfato dissódico 0,1N.

Ao sobrenadante adicionou-se 90 ml de acetona P.A. sob agitação constante a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A mistura permaneceu em repouso por 18 horas, tendo sido então centrifugada para separação do precipitado, que após eliminação dos resíduos de acetona por evaporação, foi ressuspensão em 9 ml de fosfato dissódico 0,1N.

Paralelamente, para se estudar o efeito simultâneo de TCA e acetona durante 18 horas, a 25 ml de toxina bruta, adicionou-se o ácido tricloroacético na concentração final de 10%

e 25 ml de acetona, sob agitação constante a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após 18 horas em repouso, a mistura foi centrifugada a 12.100 g por 30 minutos e o precipitado, uma vez eliminados resíduos de acetona por evaporação, ressuspense em 2,5 ml de fosfato dissódico 0,1N.

Todos os precipitados obtidos pelos tratamentos acima mencionados, uma vez ressuspensos, tiveram seus pHS acertados para 7,0 e foram ensaiados pelo teste do camundongo recém-nascido.

## 6.2. Métodos dependentes de propriedades hidrodinâmicas

### 6.2.1. Ultrafiltração em PM 10

Cinquenta ml de toxina bruta foram ultrafiltrados em membrana diaflo PM 10 da Amicon. Tanto o concentrado quanto o ultrafiltrado foram examinados pelo teste do camundongo recém-nascido.

### 6.2.2. Ultrafiltração em hollow fibers

Em um aparelho DC-2 da Amicon, "hollow fibers", com capacidade para 2 litros H1P-10, foram ultrafiltrados 1.000 ml de toxina bruta, com fluxo de 30 ml/minuto. O aparelho antes da ultrafiltração foi lavado com água destilada até a eliminação total da azida sódica usada como preservativo. Conseguiu-se um concentrado de 150 ml e um ultrafiltrado de 950 ml. A pro

teína presente no ultrafiltrado e na toxina bruta foi dosada pelo método de Lowry.

### 6.2.3. Filtração em gel

#### 6.2.3.1. Sephadex G-25

A uma coluna de Sephadex G-25 medium (1,3 por 91cm) padronizada com azul de dextran 0,25% e NaCl 1,5M, equilibrada com tampão fosfato de Na 0,05M pH 7,0, foram aplicados 2,5 ml de toxina bruta concentrada 10 vezes. A eluição procedeu-se no mesmo tampão com fluxo de 0,5 ml por minuto. Frações de 2,2ml foram coletadas e suas absorbâncias determinadas a 280 nm.

#### 6.2.3.2. Sephadex G-15

Foram aplicados 2,5 ml de toxina bruta concentrada 10 vezes a uma coluna de Sephadex G-15 (1,3 por 83 cm), padronizada com azul de dextran 0,25% e NaCl 1,5 M, equilibrada com tampão acetato de amônio 0,05 M, pH 7. Procedeu-se a eluição com o mesmo tampão e fluxo de 0,5 ml por minuto. Frações de 2 ml foram coletadas e suas absorbâncias determinadas a 280 nm.

### 6.3. Métodos dependentes da carga elétrica

#### 6.3.1. Tampões

Tendo-se o objetivo de se escolher tampões adequados para análises em resinas de troca iônica, foram realizadas curvas de titulação entre os ácidos fórmico e acético com hidróxido de amônio.

#### 6.3.2. Efeito do pH na atividade da enterotoxina ST

Frações de 5 ml de toxina bruta, tiveram seus pHs acertados com NaOH 0,1M e HCl 0,1M, para os valores 5, 6, 7, 8, 9 e 10. Após terem permanecido nesses pHs a 0°C durante 24 horas, o pH foi acertado para 7 e as frações examinadas quanto a atividade de ST pelo teste do camundongo recém-nascido.

#### 6.3.3. Cromatografia em Permutador Catiônico (MERCK)

A uma coluna da resina Permutador Catiônico (P. C.) (MERCK) (0,7 por 5 cm), equilibrada com tampão acetato de amônio 0,05M, pH 5, foram aplicados 5 ml de toxina bruta com pH acertado para 5 com ácido acético 1M. O material foi eluído com o mesmo tampão, num fluxo de 1 ml por minuto e após a saída da fração não retida pela coluna, tentou-se eluir a fração adsorvida com um gradiente de pH de 6 a 9.

#### 6.3.4. Cromatografia em Permutador Aniônico (MERCK)

##### 6.3.4.1. Estudo de fixação da toxina bruta nos pHs 6, 7 e 8

Frações de 5 ml da resina Permutador Aniônico (P. A.) (MERCK), foram equilibradas separadamente em "batch" com tampão acetato de amônio 0,1M nos pHs 6, 7 e 8. A toxina bruta foi adicionada v/v às resinas, permanecendo em contacto, com leves agitações esporádicas, durante 40 minutos. Os sobrenadantes foram então separados e examinados quanto a atividade de ST.

##### 6.3.4.2. Cromatografia nos pHs 9 e 10

Com a resina Permutador Aniônico foram preparadas colunas de 0,7 por 5 cm, equilibradas com tampão acetato de amônio nos pHs 9 e 10. A cada coluna foram aplicados 5 ml de toxina bruta com pH acertado ao de equilíbrio da mesma. A eluição procedeu-se no mesmo tampão, com fluxo de 1 ml por minuto. Tentou-se eluir o material adsorvido com ácido acético 0,1N.

##### 6.3.4.3. Cromatografia em Permutador Aniônico, pH 9, fluxo lento

A uma coluna de P.A. (2,2 por 39 cm), equilibrada com tampão acetato de amônio 0,01M, pH 9, foram aplicados 140ml de

toxina bruta com pH acertado para 9 com NaOH 1N. A eluição procedeu-se com o mesmo tampão em fluxo de 1,5 ml por minuto.

#### 6.3.4.4. Estudo em "batch" para avaliação do tempo de contacto toxina/resina

Em "batch", foram misturados volume e volume, P.A. equilibrada com tampão acetato de amônio 0,01M pH 9 com toxina bruta em pH 9. Preparou-se dois experimentos isolados, um onde a mistura permaneceu sob agitação constante e outro, onde apenas leves agitações foram realizadas. Após 40 minutos de contacto retirou-se o sobrenadante para testes de atividade tóxica. A resina foi "lavada" ainda uma vez v/v com tampão acetato de amônio 0,01M, pH 9, tentando-se desta forma, recuperar toxina não adsorvida.

#### 6.3.4.5. Cromatografia em Permutador Aniônico, pH 9, fluxo rápido

A uma coluna de P.A. (2,2 por 39 cm), equilibrada com tampão acetato de amônio 0,01M, pH 9, foram adicionados 140 ml de toxina bruta com pH acertado para 9, com NaOH 1N, em fluxo rápido de 10 ml por minuto. A eluição procedeu-se no mesmo tampão.

### 6.3.5. Cromatografia em DEAE-celulose

A resina aniônica DEAE-celulose foi equilibrada com tampão fosfato de potássio 0,05M nos pHs 7, 8 e 9 separadamente em colunas de 4 ml de volume. Novas cromatografias foram desenvolvidas com NaCl 0,02M adicionado ao tampão. Nos experimentos onde não se encontrou a enterotoxina ST na fração não retida pela coluna, tentou-se a eluição da fração adsorvida, com gradiente salino.

A saturação da resina foi determinada pela aplicação de alíquotas consecutivas de toxina bruta a uma coluna de 4 ml, equilibrada em pH 7 com tampão fosfato 0,01M.

### 6.3.6. Cromatografias Seriadas

Quarenta e cinco ml de toxina bruta em pH 9, acertado com NaOH 1M, foram aplicados a uma coluna de P.A. (1,2 por 51 cm), equilibrada com tampão acetato de amônio 0,01M, pH 9. A eluição procedeu-se no mesmo tampão com fluxo de 2 ml por minuto. A fração não retida pela coluna apresentou atividade de ST e os tubos com densidade ótica a 280 nm, acima de 0,5 foram reunidos e aplicados a uma coluna de P.C. (1,1 por 51,5 cm), equilibrada com tampão acetato de amônio 0,1M, pH 4. A eluição nessa segunda cromatografia desenvolveu-se no mesmo tampão utilizado no equilíbrio da resina, com fluxo de 1 ml por minuto.

## 7. Purificação da enterotoxina ST

### 7.1. Permutador Aniônico pH 9

#### 7.1.1. Preparação da resina

A resina Permutador Aniônico (MERCK), foi equilibrada segundo o esquema que se segue:

- 1 - Lavar com água destilada;
- 2 - Lavar com NaCl 3M, durante 30 minutos;
- 3 - Lavar com água destilada;
- 4 - Lavar com ácido acético 0,1M até obtenção de pH 3 estável;
- 5 - Lavar com água destilada;
- 6 - Lavar com hidróxido de amônio 0,1M, até obtenção de pH 10 estável;
- 7 - Lavar com água destilada;
- 8 - Equilibrar com acetato de amônio pH 9, 0,1M;
- 9 - Equilibrar com acetato de amônio pH 9, 0,01M.

#### 7.1.2. Cromatografia

Frações de 140 ml de toxina bruta, com pH acertado para 9 com NaOH 0,1M foram aplicados a colunas de Permutador Aniônico (2,2 por 43 cm), equilibradas com tampão acetado de amônio, pH 9, 0,01M. O material foi eluído no mesmo tampão com

fluxo de 10 ml por minuto. Os tubos com atividade tóxica de ST considerável, foram reunidos em uma só fração, após cada cromatografia.

### 7.2. Diálise

As frações com atividade tóxica obtidas a partir da cromatografia em Permutador Aniônico, foram concentradas por liofilização, ressuspensos em um volume dez vezes menor e dialisadas contra água destilada durante 48 horas sob agitação constante a 4°C. Para que a toxina ST não fosse dialisada, os sacos de diálise foram tratados segundo Graig (25), com uma solução de anidrido acético e piridina (1:1), que por um processo de acetilação reduz o "cut off" dos mesmos. O tratamento foi desenvolvido sob agitação constante durante 10 horas a temperatura ambiente.

### 7.3. Filtração em Sephadex G-15

Depois da diálise, as amostras foram concentradas por liofilização e aplicadas após serem ressuspensas em 2,3 ml de água destilada, a uma mesma coluna de Sephadex G-15 (1,3 por 88 cm) padronizada por uma solução de azul de dextran 0,25% e NaCl 1,5M. O material foi eluído com água destilada em pH 8, acertado com trimetilamina. As frações eluídas foram coletadas e examinadas pelo teste de Dean (11). Os tubos correspondentes aos picos de atividade tóxica das seis cromatografias

realizadas nas condições acima descritas, foram reunidos em uma mesma fração, liofilizados e ressuspensos em um volume dez vezes menor de água destilada.

#### 7.4. Cromatografia em papel

A amostra procedente das filtrações em Sephadex foi estudada em cromatografia descendente em papel Whatman nº 3. Para a análise, foram utilizados os seguintes sistemas de solventes: ácido acético, butanol, água (1:4:5) e etanol, butanol, água (3:3:4). Para a revelação das amostras cromatografadas, utilizou-se ninhidrina 0,25% em acetona.

As cromatografias realizadas com o primeiro sistema de solventes, foram padronizadas para 48 horas, enquanto que para o segundo sistema, tiveram a duração de 21 horas. Para a determinação da atividade de ST nas manchas obtidas com os dois sistemas de solventes, foram desenvolvidas cromatografias onde apenas as aplicações laterais eram reveladas, enquanto que as centrais eram eluídas e examinadas pelo teste do camundongo recém-nascido.

### III. RESULTADOS

#### A - ESTUDO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE ST

##### 1. Estudo dos métodos dependentes das características de solubilidade

###### 1.1. Precipitação por Sulfato de Amônio

Após precipitação da toxina bruta com 90% de saturação em sulfato de amônio, atividade de ST foi encontrada no precipitado. Entretanto, o número de unidades tóxicas recuperadas foi baixo, dando um rendimento ao processo, de apenas 6,25%.

###### 1.2. Precipitação por Acetona

A análise dos precipitados obtidos nos experimentos de precipitação de toxina bruta com acetona nas concentrações finais de 50, 66, 80, 88, 94 e 96%, revelou a presença de ST em todos eles. Repetindo-se a precipitação com acetona 66% a

-20°C, evitando-se portanto, a desnaturação das moléculas presentes na mistura, conseguiu-se recuperar no precipitado final, apenas 0,5 U.T./0,1 ml das 16 U.T./0,1 ml encontradas na toxina bruta. Portanto, apenas 3,1% de rendimento em termos de recuperação de U.T./0,1 ml.

### 1.3. Precipitação por TCA e Acetona

O precipitado obtido após tratamento da toxina bruta por ácido tricloroacético a 10%, durante 30 minutos e 18 horas apresentou atividade de ST. Entretanto, a percentagem de recuperação em unidades tóxicas foi de apenas 0,625% no tratamento durante 30 minutos e de 1,25% após 18 horas (Tabela 1). Devido a essa baixa recuperação, pensou-se na associação do tratamento com TCA a 10%, ao da acetona a 50%. Permitindo-se o efeito de TCA durante 30 minutos e após neutralização do meio, precipitação do sobrenadante por acetona, obteve-se um rendimento de 6,725%. Por outro lado, após o tratamento de toxina bruta com ácido tricloroacético simultaneamente a acetona por 18 horas, não se conseguiu detectar atividade de ST no precipitado obtido.

Tabela 1. Precipitação de Toxina Bruta por TCA e Acetona

Tratamento	Nº de U.T./0,1 ml	Percentagem de recuperação de U.T.*
Toxina Bruta	16	100
TCA 10%, 30 minutos	0,1	0,625
TCA 10%, 18 horas	0,2	1,25
TCA 10%, 30 min. + acetona 50%	1,1	6,725
TCA 10%, 18h. + acetona 50%	.0	0

\* O cálculo da percentagem de recuperação foi realizado com base na relação entre a quantidade de U.T. presentes no material inicial e no final, estando ambos na mesma concentração.

## 2. Estudo dos métodos dependentes de propriedades hidrodinâmicas da enterotoxina ST

### 2.1. Ultrafiltração

#### 2.1.1. Ultrafiltração em PM-10

No processo de ultrafiltração da toxina bruta em membrana diaflo PM 10 da Amicon, foi encontrada atividade de ST, apenas no material ultrafiltrado.

### 2.1.2. Ultrafiltração em "hollow fibers"

Durante o processo de ultrafiltração da toxina bruta através de um aparelho da Amicon DC-2 "hollow fibers", verificou-se que praticamente toda a atividade de ST da amostra original foi recuperada no ultrafiltrado. Na Tabela 2, encontram-se os resultados quanto a atividade de ST e concentração de proteínas no ultrafiltrado e na toxina bruta.

Tabela 2. Ultrafiltração de toxina bruta em um aparelho Amicon DC-2 "hollow fibers"

Amostra	Nº de U.T./0,1 ml	Conc. de Proteínas (36)
Toxina Bruta	16	2,36 mg/ml
Ultrafiltrado	16	2,18 mg/ml

## 2.2. Filtração em gel

### 2.2.1. Sephadex G-25

Toxina bruta concentrada dez vezes, foi cromatografada em uma coluna de Sephadex G-25, com tampão fosfato de Na 0,05M, pH 7. O padrão cromatográfico obtido após leitura da absorção a 280 nm encontra-se na Figura 1, juntamente com a dosagem de

atividade tóxica de ST nos diversos picos. A atividade específica da fração correspondente a maior atividade de ST foi de 220,7, enquanto que a toxina bruta possui uma atividade específica de 13,8.

### 2.2.2. Sephadex G-15

Toxina bruta concentrada dez vezes foi cromatografada em uma coluna de Sephadex G-15 com tampão acetato de amônio 0,05 M, pH 7. O padrão cromatográfico obtido após leitura da absorção a 280 nm, encontra-se na Figura 2, juntamente com a dosagem da atividade de ST nos diversos picos. A atividade específica da fração correspondente a maior atividade de ST encontrada, foi de 84,2 enquanto que a toxina bruta possui uma atividade específica de 13,8, como já mencionado no item anterior.

## 3. Estudo dos métodos dependentes da carga elétrica

### 3.1. Escolha de tampões adequados

Devido a complexidade do meio de CAYE, que dificulta o processo de purificação introduzindo grande número de contaminantes, pensou-se em se utilizar nas cromatografias de troca iônica, tampões voláteis cujos íons poderiam ser facilmente eliminados. Comparando-se as curvas de titulação entre os ácidos acético e fórmico com hidróxido de amônio, optou-se pelo

acetato de amônio para testes subsequentes com resinas de troca iônica, por apresentar zona tampão mais extensa que o formiato de amônio.

### 3.2. Efeito do pH na atividade da toxina

Com o objetivo de se verificar a zona de pH na qual poderiam ser desenvolvidas as cromatografias sem inativação da toxina, foram realizados tratamentos com a toxina bruta, em pHs que variaram de 5 a 10. Os resultados quanto a atividade da enterotoxina ST nesta faixa de pH, encontram-se na tabela 3, onde se observa que a toxina aparentemente não se alterou.

Tabela 3. Influência do pH sobre a atividade da toxina bruta

pH final	Nº de U.T./0,1 ml após tratamento
8,5*	16
5,0	16
6,0	16
7,0	16
8,0	16
9,0	16
10,0	16

\* pH da toxina bruta

### 3.3. Cromatografia em Permutador Catiônico

Atividade de ST foi encontrada na fração não retida pela coluna, obtendo-se aumento na atividade específica de 13,8 para 34. O gradiente de pH utilizado, foi insuficiente para retirar o material adsorvido pela coluna (Figura 3).

### 3.4. Cromatografia em Permutador Aniônico

#### 3.4.1. Estudo de fixação da toxina bruta, nos pHs 6, 7 e 8.

Analisando-se o sobrenadante obtido após mistura da toxina bruta com a resina Permutador Aniônico, encontrou-se atividade de ST igual a inicial, nos 3 pHs examinados. Portanto, nessas condições a enterotoxina ST não estaria se adsorvendo à resina.

#### 3.4.2. Cromatografia nos pHs 9 e 10

Nas cromatografias de toxina bruta em colunas pequenas de P.A. equilibrado em tampão acetato de amônio nos pHs 9 e 10, observou-se em ambos os casos, atividade de ST na fração não retida pela resina. Aplicação de ácido acético 0,1M às colunas, eluiu material sem atividade tóxica de ST (Tabela 4).

O padrão cromatográfico dos dois experimentos, obtido

pela leitura das absorbâncias das frações coletadas a 280 nm, encontra-se nas Figuras 4 e 5.

Tabela 4. Cromatografia de toxina bruta em colunas de P.A. equilibrado nos pHs 9 e 10

Amostra	Absorção a 280nm	Nº de U.T./ml	A. Esp.*
Toxina bruta	11,57	160	13,6
Fração não adsorvida à resina em pH 9	0,62	80	129
Fração adsorvida à resina em pH 9	0,475	0	-
Fração não adsorvida à resina em pH 10	1,0	80	80
Fração adsorvida à resina em pH 10	0,82	0	-

\* Atividade Específica

3.4.3. Cromatografia em Permutador Aniônico, pH 9, fluxo lento

Uma vez que pelos experimentos anteriores ficou demonstrado que a enterotoxina ST não se fixava à resina P.A. equilibrada com tampão acetato de amônio na faixa de pH de 7 a 10, foi escolhido para posteriores cromatografias, o pH 9. Neste

pH, a maioria das proteínas estariam carregadas negativamente, adsorvendo-se a resina, enquanto que a toxina ST como demonstrado, não se fixava a mesma. Por outro lado, no pH 10 o aumento da atividade específica foi menor que no pH 9.

Desta forma, a toxina bruta foi cromatografada em uma coluna de P.A. equilibrada com acetato de amônio 0,01M, pH 9 num fluxo de 1,5 ml por minuto. Entretanto, ao contrário do que se esperava segundo os resultados anteriores, não se detectou atividade de ST na fração não retida pela coluna. O tempo de contacto entre toxina e resina deveria ser fundamental para a adsorção da mesma, favorecendo ou não a competição com outras moléculas pelos sítios da resina. Para que isso fosse analisado, testes onde se variou o tempo de contacto entre toxina bruta e resina, foram desenvolvidos.

#### 3.4.4. Estudo em "batch" para avaliação do tempo de contacto toxina/resina

Os experimentos em "batch", onde foram misturados toxina e resina em condições diferentes, evidenciaram que o tempo de contacto deveria ser reduzido ao mínimo possível, uma vez que sob agitação constante, praticamente não se encontrou atividade de ST no sobrenadante (Tabela 5).

Tabela 5. Influência do tempo de contacto toxina/resina na adsorção da mesma

Contacto toxina/resina	Amostra	Nº de U.T./ml
- -	Toxina bruta	160
Agitações leves	Sobrenadante	40
	"1 <sup>a</sup> lavagem"	10
Agitação constante	Sobrenadante	10
	"1 <sup>a</sup> lavagem"	0

#### 3.4.5. Cromatografia em Permutador Aniônico, pH 9, fluxo rápido

Com base nos experimentos de contacto entre toxina e resina, o fluxo da cromatografia em uma coluna de P.A. das mesmas dimensões da anterior, foi aumentado para 10 ml por minuto. Desta forma, a atividade de ST foi encontrada na fração não retida pela coluna, obtendo-se um rendimento no processo de 71,4% e um aumento na atividade específica de 13,8 para 128.

#### 3.5. Cromatografia em DEAE-celulose

Nas cromatografias em DEAE-celulose equilibrada com tampão fosfato nos pHs 7, 8 e 9, não se encontrou atividade de ST nas frações não retidas pela resina. Por outro lado, adicio-

nando-se cloreto de sódio ao tampão na molaridade de 0,02M, conseguiu-se obter alguma atividade de ST nesta fração. Por esses resultados pode-se concluir que nas condições em que foi equilibrada a resina, a enterotoxina ST estaria sendo adsorvida e que a presença do sal, competiria pelos grupos carregados positivamente da mesma, impedindo uma adsorção total.

Assim sendo, em novo experimento, tentou-se determinar a saturação da resina em relação a adsorção de toxina bruta e a possibilidade de eluí-la através de um gradiente salino. Em uma coluna de DEAE-celulose equilibrada com tampão fosfato de Na 0,01M, pH 7, verificou-se que é possível aplicar-se 1 ml de toxina bruta para cada ml de resina. Conseguiu-se eluição parcial da enterotoxina com tampão fosfato de Na 0,01M, pH 7, acrescido de NaCl 0,3M. A atividade específica nas frações eluídas, aumentou cerca de 12 vezes em relação a toxina bruta e a recuperação de unidades tóxicas foi de aproximadamente 55%.

### 3.6. Cromatografias Seriadas

Logo após os primeiros resultados obtidos com as resinas Permutador Aniônico e Permutador Catiônico, tentou-se desenvolver cromatografias seriadas utilizando-se estas duas resinas em colunas de dimensões médias. Considerando que até então, desconhecia-se ainda a relevância do tempo de contacto entre a resina P.A. equilibrada em pH 9 e a toxina, a primeira cromatografia em P.A. foi desenvolvida com fluxo de 2 ml por minuto. Entretanto, em vista da dimensão da coluna, ainda se conseguiu obter atividade de ST na fração não retida pela mes-

ma. Os tubos desta cromatografia que apresentaram resultado positivo para ST pelo teste do camundongo, foram reunidos em uma mesma fração e aplicados a uma coluna de P.C., equilibrada com tampão acetato de amônio 0,1M, pH4. Através desta sequência de cromatografias, conseguiu-se um aumento de aproximadamente 7 vezes na atividade específica conforme os dados encontrados na Tabela 6.

Tabela 6. Cromatografia de toxina bruta por Permutador Aniônico, pH 9 e P. Catiônico, pH 4

Amostra	Absorção a 280 nm	Nº de U.T./ml	Ativ. Esp.
Toxina bruta	11,57	160	13,8
Fração ativa após P.A.	0,98	80	81,6
Fração ativa após P.C.	0,395	40	101,3

## B - PURIFICAÇÃO DA ENTEROTOXINA ST

### 1. Permutador Aniônico

Foram realizadas 12 cromatografias em colunas de Permutador Aniônico (2,2 por 39), equilibradas em pH 9 com aceta-

to de amônio 0,01M, fluxo de 10 ml por minuto. Nessas condições, como já descrito, a toxina ST não se adsorve a resina. Os tubos com atividade tóxica considerável, foram após cada cromatografia, reunidos em uma só fração examinada também quanto a absorção a 280 nm. A recuperação de Unidades Tóxicas permitiu um rendimento ao processo de aproximadamente 70%. A atividade específica em todas as cromatografias aumentou cerca de 8 vezes. Os resultados referentes a esses experimentos, encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Cromatografias em Permutador Aniônico, pH 9

Experimento	Nº de U.T./ml	Absorção a 280 nm	Ativ. Esp.*
Toxina Bruta	160	11,57	13,8
Nº 15	160	1,25	128
Nº 16	160	1,5	107
Nº 17	160	1,35	119
Nº 18	160	1,5	107
Nº 19	160	1,4	114
Nº 20	160	1,55	103
Nº 26	160	1,35	119
Nº 27	160	1,7	94
Nº 34	160	1,5	107
Nº 35	160	1,45	110
Nº 36	160	1,4	114
Nº 39	160	1,5	107

\* Atividade Específica

## 2. Diálise

Os resultados de 10 experimentos de diálise, desenvolvidas em sacos tratados por piridina e anidrido acético não foram homogêneos, como mostram os dados encontrados na Tabela 8. Cada saco de diálise tratado, pode ser usado apenas em 2 experimentos, após os quais, ocorriam alterações nos mesmos que impediam a obtenção de amostras com características adequadas para que pudessem ser aproveitadas no processo de purificação.

Tabela 8. Diálise das amostras procedentes da cromatografia em P.A.

Experimento	Nº de U.T./ml	Absorção a 280 nm	Ativ. Esp.*	Conc. §
Nº 25	160	1,25	573,5	4,5
Nº 28	160	3,42	280,7	6
Nº 29	80	1,69	187	4
Nº 30	40	1,86	68,9	3,2
Nº 31	160	2,15	186	2,5
Nº 33	160	3,41	156,9	3,3
Nº 37	80	1,52	105,3	2
Nº 38	40	1,44	61,2	2,2
Nº 41	40	1,59	35,1	1,4
Nº 42	160	1,82	219,8	2,5

§ Dados que indicam o número de vezes que a amostra está concentrada em relação à toxina bruta.

\* Atividade Específica.

### 3. Filtração em Sephadex G-15

Após a diálise, as amostras foram reconcentradas por liofilização e aplicadas a uma mesma coluna de Sephadex G-15 padronizada. Os resultados das 6 cromatografias realizadas, encontrados na Tabela 9, revelam um aumento considerável na atividade específica. Por outro lado, demonstram existir uma adsorção da enterotoxina ST à resina de Sephadex, uma vez que os picos de atividade máxima, variaram entre as frações 16, 19 e 20 (Figuras 6 a 11). Para subsequentes passos de purificação, os tubos correspondentes a esses picos, foram reunidos em uma mesma fração, liofilizados e posteriormente ressuspensos em um volume dez vezes menor de água destilada.

### 4. Cromatografia em Papel

Com base no fato de que a enterotoxina ST de E. coli, poderia ser aplicada ao papel de filtro e posteriormente, pelo prazo de 2 meses, eluída sem perda de sua atividade (24), tentou-se introduzir na sequência de purificação, a cromatografia em papel. Testando-se a resistência da toxina ao sistema de solventes ácido acético, butanol, água (1:4:5), verificou-se que a amostra procedente das cromatografias em Sephadex perdia, durante 48 horas de contacto, aproximadamente 1/3 de sua atividade. Esperando que a inativação não ultrapassasse este limite, cromatografias descendentes em papel neste solvente foram desenvolvidas. Diversas manchas foram obtidas, sendo cada uma eluída e examinada quanto a atividade de ST. Esta foi detectada apenas na terceira mancha obtida após o ponto de apli-

cação da amostra. Realizando-se com esta toxina eluída, nova cromatografia no mesmo sistema de solventes, obtivemos apenas uma mancha, revelada pela ninhidrina, cujo Rf foi de 0,11 (Figura 12).

Porém, ao contrário do que se esperava, a recuperação de toxina com atividade detectável pelo teste do camundongo recém-nascido, foi de apenas 5,6%.

Buscando-se condições mais adequadas para a conservação da atividade tóxica de ST, o solvente etanol, butanol, água (3:3:4) foi também analisado em cromatografia descendente em papel. Segundo a Figura 13, observa-se que as diversas substâncias ainda presentes na amostra, demonstram grande solubilidade neste solvente, não permitindo entretanto, que estas fiquem bem separadas.

Pesquisando-se a atividade de ST nas diversas manchas eluídas, conseguiu-se encontrá-la na última mancha obtida em relação ao ponto de aplicação da amostra. Entretanto, a recuperação de U.T. foi novamente baixa, de apenas 11,6%.

Tabela 9 - Filtração em Sephadex G-15

Experimento	AMOSTRA APLICADA				PICO DE ATIVIDADE			
	Conc. S	Nº de U.T./ ml	Absorção a 280 nm	Ativ.* Esp.	Fração de maior atividade	Nº de U.T./ ml	Absorção a 280 nm	Ativ. Esp.*
Nº 31	53,4	2.136	20,8	102,6	20	320	0,9	400
Nº 32	42,17	6.747	40	168,7	16	1.280	1,8	710
Nº 40	71,9	5.752	67,2	85	16	1.280	0,53	508
Nº 43	62,88	5.030	47	107	20	640	1,22	535
Nº 44	53,8	8.608	49,4	174,3	20	640	1,38	467
Nº 47	41	6.560	34,8	138,5	29	640	1,0	840

S Dados que indicam o número de vezes que a amostra está concentrada em relação à toxina bruta.

\* Atividade Específica.

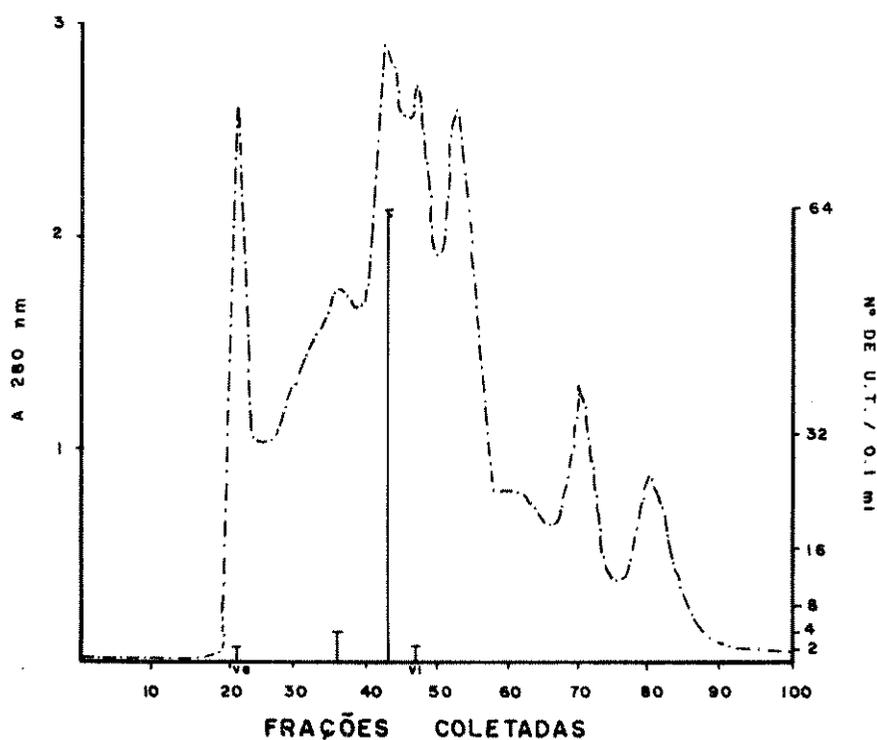


Figura 1. Gel filtração de toxina bruta em Sephadex G-25, medium. Coluna de 1,3 por 91 cm; eluente: fosfato de Na 0,05M pH 7; frações de 2,2 ml. Símbolos: -.- absorção a 280 nm; — nº de U.T./0,1 ml encontradas na fração examinada. V.P. - volume de exclusão; V.I. - volume interno.

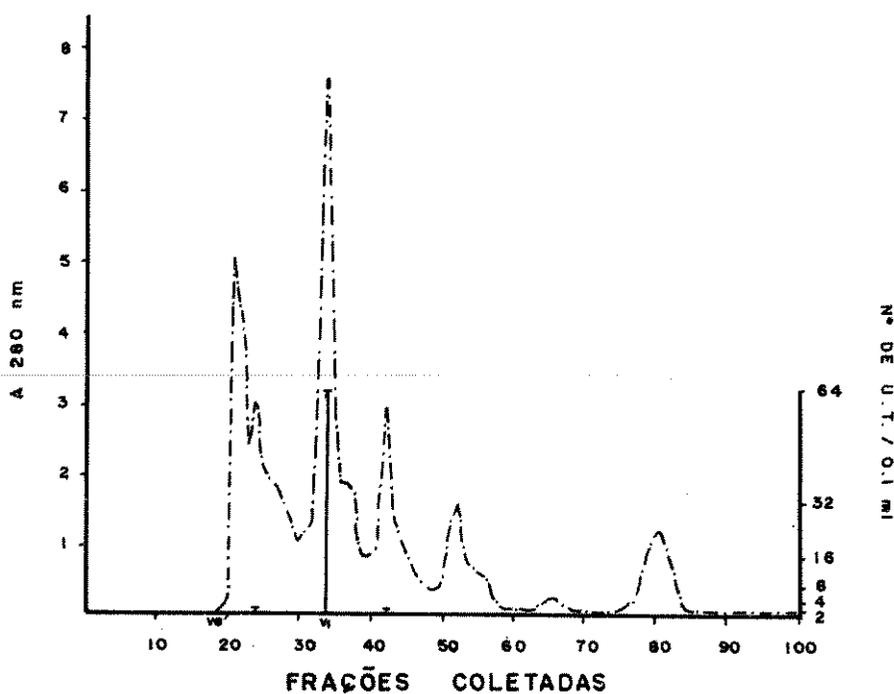
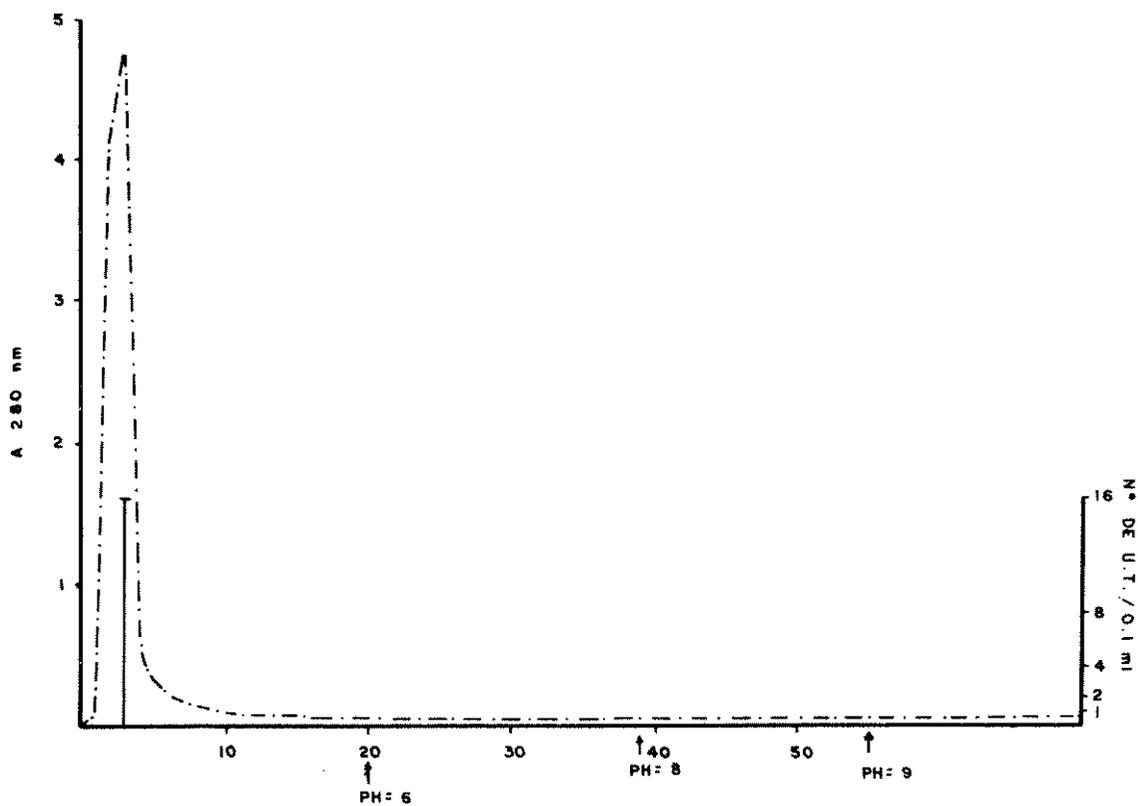


Figura 2. Gel filtração da toxina bruta em Sephadex G-15. Coluna de 1,3 por 83 cm; eluente: acetato de amônio 0,05M pH 7; frações de 2ml. Símbolos: -.- absorção a 280 nm; — nº de U.T./0,1 ml encontradas na fração examinada. V.E. - volume de exclusão; V.I. volume interno.



### FRAÇÕES COLETADAS

Figura 3. Cromatografia de toxina bruta em uma coluna de Permutador Catiônico, equilibrada em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 5. A cromatografia foi desenvolvida conforme o texto.

Símbolos: - . - absorvância a 280nm; — Nº de U.T./0,1 ml encontradas na fração examinada.

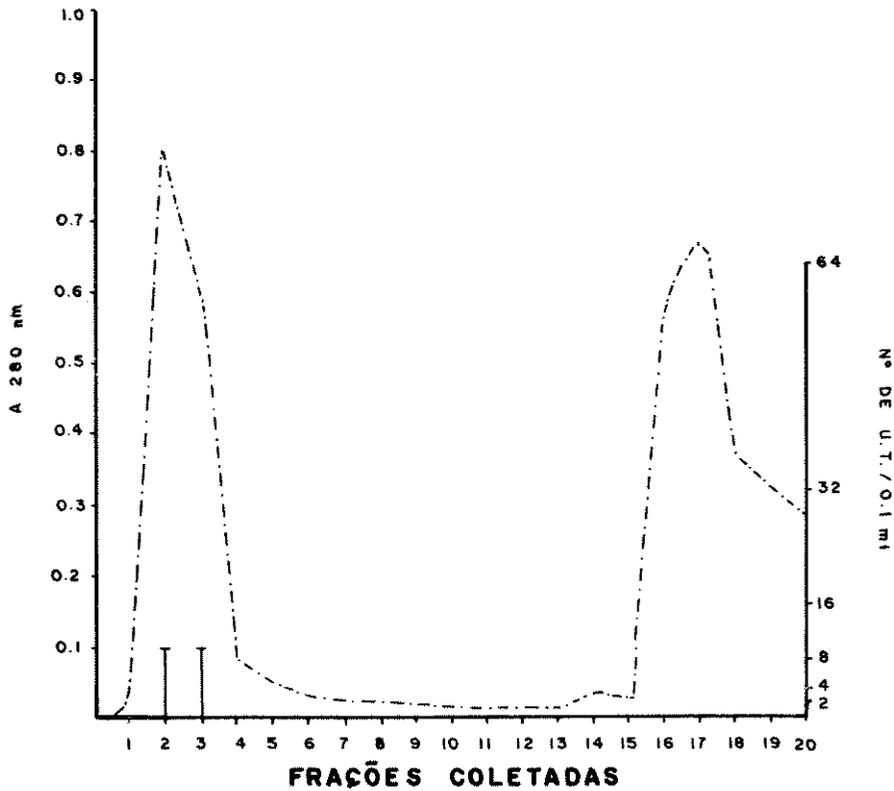


Figura 4. Cromatografia de toxina bruta em Permutador Aniônico equilibrado com tampão acetato de amônio 0,01M pH 9. A cromatografia desenvolveu-se conforme o texto. Símbolos: -.- absorção a 280nm; — Nº de U.T./0,1 ml encontrados na fração examinada.

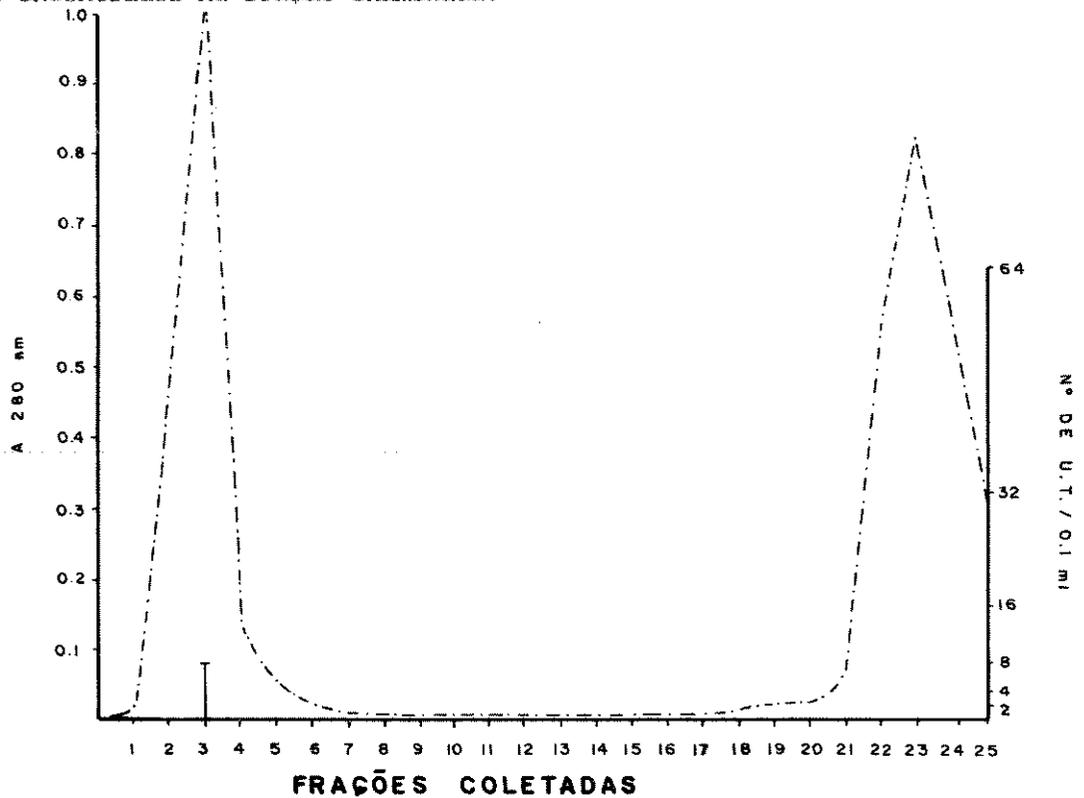
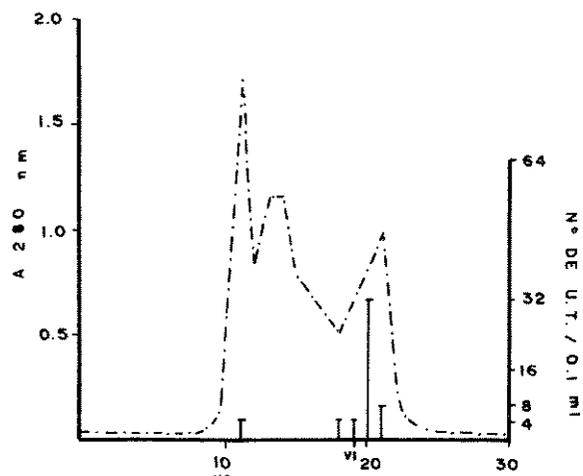
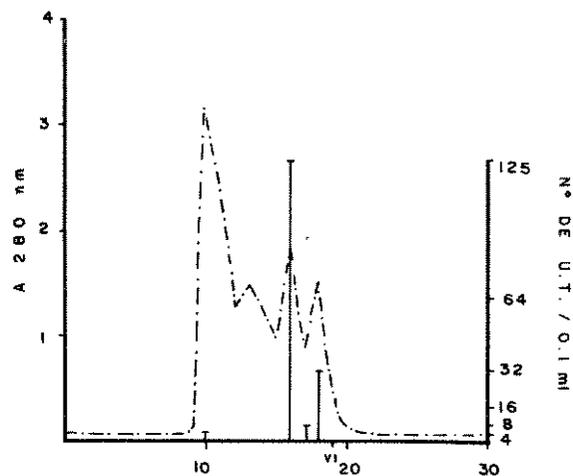


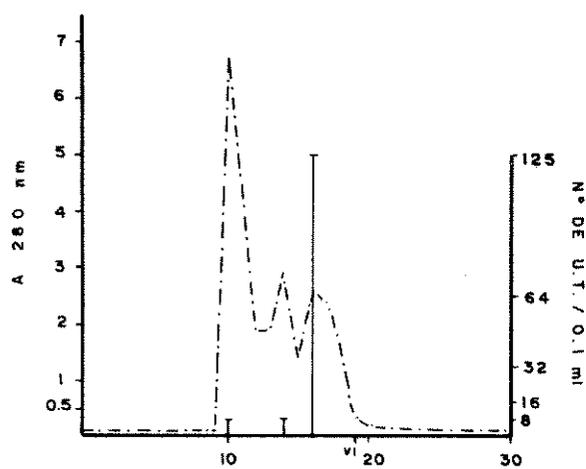
Figura 5. Cromatografia de toxina bruta em Permutador Aniônico equilibrado com tampão acetato de amônio 0,01M pH 10. A cromatografia desenvolveu-se conforme o texto. Símbolos: -.- absorção a 280 nm; — nº de U.T./0,1 ml encontradas na fração examinada.



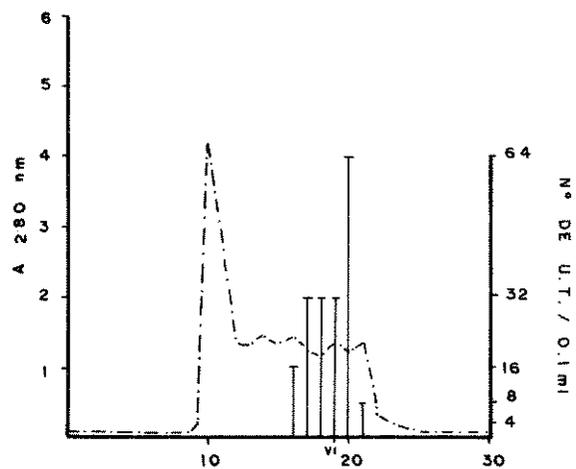
FRAÇÕES COLETADAS  
FIG. 6



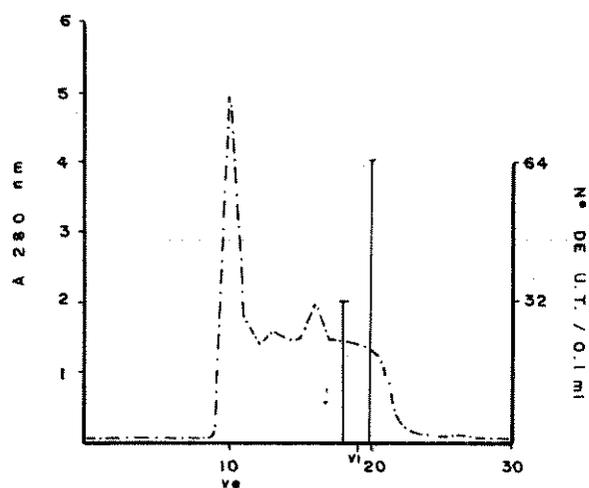
FRAÇÕES COLETADAS  
FIG. 7



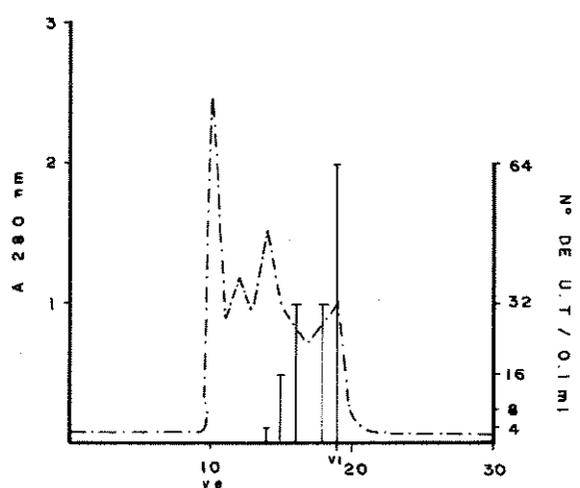
FRAÇÕES COLETADAS  
FIG. 8



FRAÇÕES COLETADAS  
FIG. 9



FRAÇÕES COLETADAS  
FIG. 10



FRAÇÕES COLETADAS  
FIG. 11

Figuras de 6 a 11 - Correspondem a cromatografias em uma mesma coluna de Sephadex G-15. Coluna de 1,3 por 88 cm; eluente: água com trimetilamina pH 8; frações de 4,2 ml. Símbolos: - - - absorção a 280 nm; --- nº de U.T./0,1 ml encontradas na fração examinada. V.E. - volume de exclusão; V.I. - volume interno.

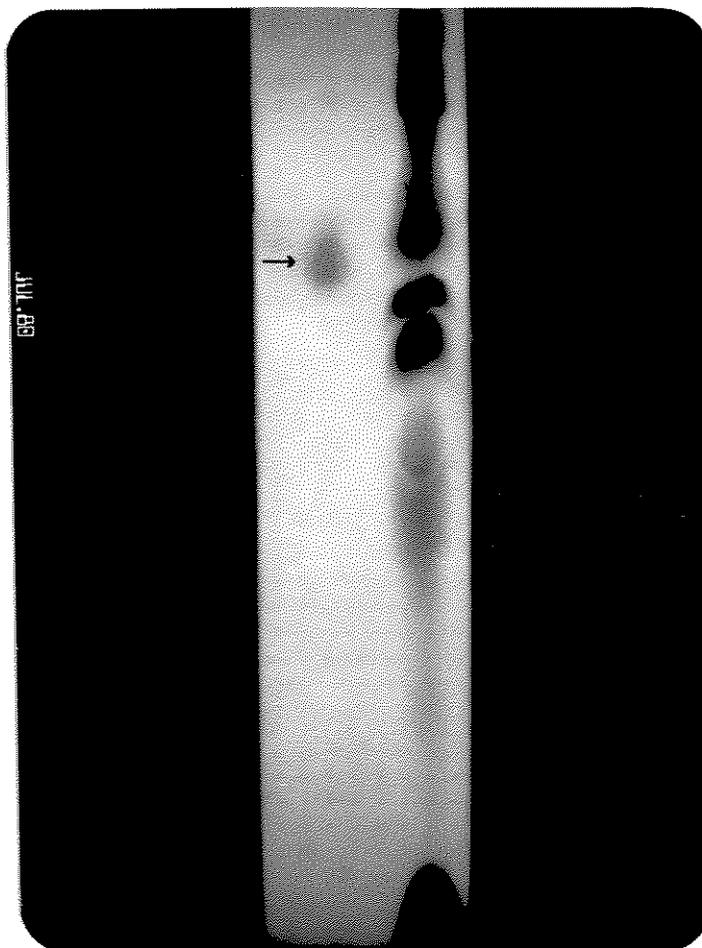


Figura 12. Cromatografia descendente em papel, no sistema de solventes ácido acético, butanol, água (1:4:5), após 24 horas. A mancha isolada corresponde a recromatografia da terceira mancha encontrada após o Ponto de Aplicação (P.A.) da amostra, onde atividade de ST foi detectada.

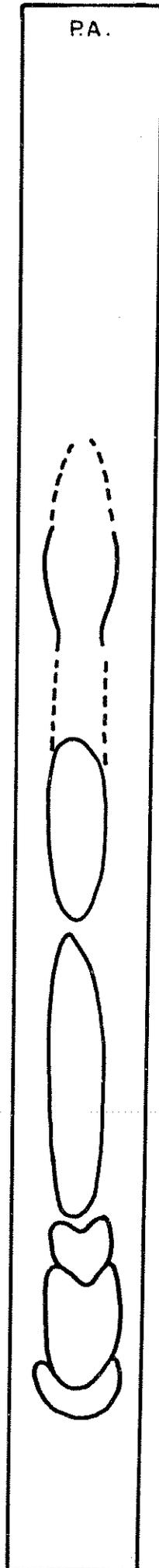


Figura 13. Esquema de cromatografia descendente em papel, no sistema de solventes etanol, butanol, água (3:3:4), após 21 horas. Atividade de ST foi encontrada na última mancha obtida em relação ao Ponto de Aplicação da amostra (P.A.).

#### IV. DISCUSSÃO

Nossos estudos foram iniciados com métodos tradicionais de precipitação e extração, que revelaram serem de pouca utilidade em vista dos baixos rendimentos obtidos nos processos. A precipitação com sulfato de amônio, pode ter tido seu rendimento diminuído por uma ação inativante da toxina ST pelo próprio sal, acrescida pela perda na diálise em sacos não tratados.

Quanto aos outros métodos, precipitação por acetona já havia sido utilizada em 1967 por Smith e Halls (52), que estudando a atividade de enterotoxinas de E. coli em alça ligada de porcos, obtiveram resultados positivos com precipitados de sobrenadante de cultura.

~~O baixo rendimento observado neste trabalho com precipitados de acetona examinados em testes de camundongo recém-nascido, leva-nos a crer que tal método deva ser utilizado apenas na eliminação de contaminantes. Assim sendo, Staples e Gianella (56) relataram recentemente uma sequência de purificação onde a extração por acetona foi utilizada durante o processo.~~

Por outro lado, possivelmente o pH excessivamente ácido determinado pelo ácido tricloroacético, somado às condições

impostas pela acetona em 50% de saturação impediram que fosse encontrada atividade de ST no precipitado obtido após tratamento simultâneo de ambos.

Os experimentos de ultrafiltração puderam confirmar dados relatados por outros autores (5, 30) de que o peso molecular da toxina ST estaria abaixo de 10.000, uma vez que a totalidade da atividade tóxica foi encontrada no ultrafiltrado. Através da filtração em gel de toxina bruta pelas resinas G-25 e G-15, verificou-se grande número de contaminantes, alguns demonstrando adsorção a coluna, uma vez que foram eluídos após o volume interno da mesma. Estas substâncias, que fugindo ao padrão normal de eluição, saem antes ou depois do volume correspondente ao seu peso molecular, são frequentemente moléculas de pequeno peso molecular que interagem geralmente com os géis Sephadex G-10 e G-15 por ligações iônicas e aromáticas que tem sido extensivamente estudadas por alguns autores (31, 59, 61).

O estudo dos métodos dependentes de carga elétrica exigiram que alguns fatores tais como pH e força iônica do tampão, fossem rigorosamente analisados. Por ter apresentado como resultado, um maior aumento da atividade específica, a resina Permutador Aniônico foi posteriormente escolhida para constituir o primeiro passo de uma sequência de purificação. Por outro lado, as resinas Permutador Catiônico e DEAE-celulose pelos resultados apresentados, poderão talvez, após algumas modificações nas condições da cromatografia, serem também úteis na purificação.

A elaboração e desenvolvimento de uma sequência de purificação para a enterotoxina ST foi extremamente dificultada pela complexidade do meio de CAYE, que contribuiu com grande

número de contaminantes, sendo os mesmos de peso molecular bastante semelhante ao da toxina, abaixo de 10.000, como demonstraram os resultados obtidos na ultrafiltração.

A sequência Permutador Aniônico, diálise e filtração em Sephadex G-15, permitiu um aumento na atividade específica de até 51 vezes. O primeiro passo, constituído por cromatografia na resina Permutador Aniônico, apresentou em uma série de 12 experimentos, resultados bastante homogêneos. Em contraste, os obtidos com a diálise, onde as condições eram modificadas durante o processo por razões não esclarecidas, foi grande a heterogeneidade, resultando amostras com características diferentes quanto a atividade tóxica e absorção a 280 nm.

As filtrações em Sephadex G-15, escolhido por ter apresentado na cromatografia com a toxina bruta um pico de atividade tóxica mais distinto que o apresentado com Sephadex G-25, caracterizou com a toxina ST, o mesmo fenômeno já observado com outros constituintes do meio nas filtrações iniciais. Assim sendo, em 6 cromatografias realizadas na mesma coluna sob as mesmas condições, o pico de atividade tóxica foi localizado nas frações 16, 19 e 20, nos diferentes experimentos.

A tentativa de se introduzir a cromatografia em papel na sequência de purificação, deveu-se ao fato da toxina ST poder ser eluída do papel sem perda de atividade (24). Entretanto, apesar de termos conseguido eluir a toxina com atividade de ST e em nova cromatografia no mesmo sistema de solventes ácido acético, butanol, água (1:4:5) termos verificado apenas uma mancha, o baixo rendimento do processo nos impede que seja este, um método recomendável para uma sequência de purificação da mesma.

Por outro lado, a boa separação de manchas alcançada e a facilidade de desenvolvimento e material necessários à técnica, permitem que esta seja recomendada como um método de análise da enterotoxina ST.

Os resultados obtidos neste trabalho, evidentemente servem de base para que continuemos desenvolvendo nosso objetivo final de purificação da enterotoxina ST. Esta meta, apenas recentemente foi alcançada por alguns autores. Alderete e Robertson (1) em 1978 relataram purificação da toxina ST produzida a partir de uma amostra suína de E. coli enteropatogênica.

Primeiramente, desenvolveram um meio mínimo contendo quatro amino-ácidos (alanina, serina, ácido aspártico e prolina), sais e um agente quelante. Depois de removida as células, o sobrenadante de cultura foi concentrado por ultrafiltração, fracionado por acetona em diferentes proporções, extraído por cloroformio-metanol, separado em eletroforese preparativa, cromatografado em DEAE-agarose e gel filtrado em Bio-Gel P-10. O produto final foi então analisado quanto suas propriedades químicas e físicas.

Trabalhando com toxina ST produzida por uma amostra humana, Takeda et al. (58), desenvolveram uma sequência de purificação semelhante a esta, diferindo porém, em um ponto básico, uma vez que tiveram como material inicial, sobrenadantes de cultura em meio de CAYI. O esquema de purificação desenvolvido por esses autores, constituiu em cromatografia em DEAE-celulose, hidroxiapatita, Bio Gel P-10, extração com etanol e eletroforese em Gel de Poliacrilamida onde obtiveram uma banda com atividade de ST, bem separada de outros contaminantes. Apesar de terem analisado biologicamente este material como puro, não relatam outras análises que comprovem realmente uma purifi

cação total da enterotoxina ST.

Por outro lado, Staples e Gianella (56), recentemente apresentaram um trabalho onde relatam a purificação da toxina ST produzida por uma amostra humana, a partir de um meio definido contendo apenas uma mistura de sais, asparagina, acetato e traços de metais. Com sobrenadantes de cultura neste meio, desenvolveram um esquema de purificação baseado em cromatografia em Amberlite XAD-2, extração com acetona, filtração em Sephadex G-25, DEAE-Sephacel e novamente Sephadex G-25. A análise do material purificado mostrou apenas um pico em filtração em gel, uma banda em cromatografia e eletroforese em camada delgada, apenas um resíduo de amino-ácido N-terminal e relações estequiométricas entre os amino-ácidos constituintes da molécula isolada.

Diferenças foram observadas entre as moléculas de ST isoladas pelos trabalhos acima mencionados. Alderete e Robertson encontraram na ST suína, 47 resíduos de amino-ácidos e um peso molecular de 5.100, enquanto que Staples e Gianella trabalhando com ST de uma amostra humana, quantificaram 18 resíduos de amino-ácidos e peso molecular de aproximadamente 1.980. O amino-ácido N-terminal determinado na ST suína foi a glicina enquanto na ST humana foi a asparagina.

A dose mínima efetiva em testes de camundongo, que corresponde a menor quantidade de proteína capaz de causar acúmulo de fluido, foi determinada por Takeda e col. como de 2,5 ng e por Alderete e col., cerca de 1 ng, enquanto que para Staples e Gianella corresponde a 7,9 ng quando dosadas pelo método de Lowry e a 1,5 ng quando quantificadas pela análise de amino-ácidos. Examinando algumas propriedades da enterotoxina ST puri-

ficada, Alderete e col, determinaram que o tratamento da mesma durante 30 minutos a 37°C em pH 1, não causava nenhum dano à molécula, enquanto que as mesmas condições em um pH 9, causavam inativação total da toxina. Este resultado difere das características da enterotoxina ST por nós observadas, uma vez que inclusive, nosso primeiro passo numa sequência de purificação, constituiu-se de cromatografia em Permutador Aniônico equilibrado em pH 9.

Além disso, o tratamento com TCA e acetona inativou completamente a amostra, provavelmente por efeito do pH extremamente ácido.

As diferenças observadas nos trabalhos de purificação quanto as características da enterotoxina ST poderiam corresponder a diferentes toxinas elaboradas por diferentes amostras ou serem talvez, consequência de alterações nos esquemas de purificação. Por outro lado, tem sido publicado diversos trabalhos que relatam a caracterização de toxinas ST em testes biológicos diferentes do de Dean (11). Assim sendo, Mullan e col. (41) trabalhando em um processo de purificação da enterotoxina ST, observaram anomalias que sugeriam a presença de uma ou mais toxinas cujos efeitos variavam com a idade do porco usado para os testes de atividade.

Até então, outros trabalhos já haviam relatado diferenças na termolabilidade de toxinas ST, quando examinadas em espécies animais de diferentes idades (13, 22, 45, 52, 60).

Burgess e col. (3) trabalhando com enterotoxina ST preparada no meio definido de Mitchell e col. (37), separaram duas frações através da extração com metanol, uma solúvel e outra insolúvel. Denominaram de STa a fração solúvel, que era parcial

mente termo-estável, ativa em testes de alça em porcos recém-natos (2 a 3 dias) e em testes de camundongo recém-nascidos, mas inativa em porcos desmamados de 7 a 9 semanas. A outra fração, denominaram de STb, sendo a mesma insolúvel em metanol, ativa em alça ligada de porcos desmamados e em alça de coelho, mas inativa em camundongos recém-nascidos. Já em 1970, Moon e Whipp (39) haviam lançado uma classificação da toxina ST de E. coli em duas classes distintas: classe I, ativa em porcos de todas as idades e classe II, ativa apenas em porcos recém-nascidos.

Recentemente, Olsson e Soderlind (43), realizaram um trabalho de caracterização da atividade de ST e LT através dos testes: alça ligada de porco, alça ligada de coelho, arredondamento de células Y1 e teste do camundongo recém-nascido. Através destes testes, caracterizaram cinco grupos de toxinas: LT, quando resultados positivos eram obtidos em todos os testes, menos no de camundongo; ST de porco, quando teste positivo, apenas era encontrado no teste de alça ligada em porcos; ST de camundongo, quando apenas o teste de Dean era positivo; ST de porco e camundongo, quando a amostra era positiva nos dois testes e finalmente amostras simultaneamente ST e LT, aquelas positivas em todos os testes.

As experiências desses autores, mostrando discrepância entre os resultados encontrados com sobrenadantes de cultura termo-inativados por tratamento a 80°C por 20 minutos, nos testes de alça ligada de porco e camundongo recém-nascido, contestam a adequação deste último método, na caracterização da enterotoxina ST.

Outros trabalhos reforçam esta idéia, como o relatado

por Nalin e col. (42), que trabalhando com amostras de E. coli enterotoxigênicas de origem humana, realizaram testes em alça de cachorro e em camundongos recém-nascidos. Dentre 34 amostras examinadas, encontrou 10, como sendo positivas no teste de alça em cachorro, dentre as quais apenas 5 eram simultaneamente positivas no teste de camundongo. Concentrando o sobrenadante de cultura cerca de 100 vezes, dentre as 5 restantes, 3 tornaram-se positivas para o ensaio do camundongo, sendo que as outras duas davam resultados intermitentes nesse teste.

Por outro lado, Klipstein e col. (34), descreveram que linhagens enteropatogênicas de E. coli isoladas de casos de diarreias infantis epidêmicas, produziram potentes enterotoxinas que causavam alterações no transporte de água no ensaio de perfusão em jejuno de rato (33), apesar de serem respectivamente negativas nos testes em culturas Y1 e CHO e no teste do camundongo.

Conclusivamente, os trabalhos mencionados mostram que o teste do camundongo recém-nascido, apesar de reprodutível e conveniente, apresenta limitações consideráveis na caracterização das toxinas termo-estáveis de E. coli. Os processos de purificação de ST até hoje publicados, sempre utilizaram fundamentalmente este teste na análise das frações purificadas. Entretanto, em vista da possibilidade de caracterização de toxinas termo-estáveis não detectáveis pelo teste do camundongo, através de outros modelos biológicos, torna-se viável a existência de outras enterotoxinas ST, nas frações não aproveitadas nos processos de purificação.

Quanto a utilização de recursos imunológicos, temos que vários pesquisadores já conseguiram neutralizar a entero-

toxina LT com antisoro específico ou com antisoro preparado com a toxina de cólera (8, 27), porém, neutralização nunca foi observada com ST (15, 53).

Mesmo com a toxina ST purificada por Alderete (1), utilizando soros anti-ST e anti-ST:BSA em técnicas imunológicas sensíveis como hemaglutinação passiva e hemólise, além da neutralização da atividade biológica, apenas um baixo título de anticorpos foi determinado.

A neutralização de ST purificada, pelos soros anti-ST e anti-ST:BSA foi de apenas 1,09 microgramas e 2,25 microgramas respectivamente, valores 40 a 100 vezes menores que os observados pela neutralização da enterotoxina de cólera por sua antitoxina específica (20). Esses dados revelam que a toxina ST é uma substância pouco imunogênica, mesmo quando acoplada a um "carrier" como a soro albumina bovina.

Realmente, os fatores de não imunogenicidade, modelos biológicos diferentes na caracterização da toxina ST e meios complexos na produção da mesma, dificultam sobremaneira a purificação e análise desta toxina. Contudo, é primordial que seja a mesma purificada, para que possa ser elucidado o mecanismo de ação da toxina ST, provocando secreção e consequentemente, diarreia. Esperamos que com a toxina ST por nós semi-purificada, possamos contribuir para sua melhor caracterização e análise de seus efeitos biológicos.

## V. RESUMO E CONCLUSÕES

Para posteriores estudos das propriedades e efeitos biológicos da enterotoxina ST de Escherichia coli, contribuindo desta forma para elucidação do mecanismo de ação da mesma, este trabalho teve como objetivo, purificá-la ou semi-purificá-la a partir de sobrenadantes de cultura em meio de CAYE.

Assim sendo, com um único preparado bruto de sobrenadante de cultura obtido a partir de uma amostra de origem humana, foram estudadas as características físico-químicas da molécula de ST. A partir desta análise desenvolvemos uma sequência de purificação da mesma, tendo sido obtido os seguintes resultados e conclusões:

1) Os métodos clássicos de precipitação por sulfato de amônio, TCA e acetona, não foram eficientes para a separação da toxina, podendo entretanto, serem utilizados para eliminação de contaminantes.

2) Ultrafiltração em membranas que permitam a separação de moléculas com peso molecular de até 10.000, não tiveram utilidade na purificação da enterotoxina ST, uma vez que a mes

ma e a maioria dos constituintes do meio de CAYE, apresentaram peso molecular inferior a este limite.

3) Filtrações em resinas de Sephadex G-15 e G-25, parecem adequadas para a purificação da enterotoxina ST, desde que resolvidos problemas da interação de substâncias do meio de CAYE e da própria toxina com a matriz do gel.

4) As cromatografias de troca iônica analisadas, apresentaram resultados que favorecem a utilização das resinas DEAE-celulose, Permutador Catiônico (MERCK) e Permutador Aniônico (MERCK), em processos de purificação da toxina ST. Por ter apresentado um maior aumento na atividade específica dentre os experimentos realizados, a resina Permutador Aniônico, foi escolhida para ser utilizada na sequência de purificação de ST.

5) A cromatografia em Permutador Aniônico foi uma conduta inicial bastante importante no processo de purificação da enterotoxina ST, uma vez que apresentou rendimento de aproximadamente 71,4% e aumento na atividade específica em cerca de 8 vezes. Em 12 cromatografias desenvolvidas, os resultados foram bastante homogêneos.

6) A utilização da diálise foi um processo extremamente importante para eliminação de sais e pequenos péptides. Entretanto, o tratamento de sacos de diálise com anidrido acético e piridina nem sempre se mostrou eficiente na redução do "cut off" impedindo a diálise de toxina. Em vista disto, quando este processo foi utilizado na sequência de purificação, os

resultados não foram homogêneos.

7) Na sequência de purificação, a filtração em coluna de Sephadex G-15, permitiu a obtenção da enterotoxina ST com um aumento na atividade específica de até 51 vezes. Entretanto, como já mencionado no item 3, problemas de interação da toxina com o gel devem ser resolvidos, talvez por modificações no pH ou aumento da força iônica.

8) A cromatografia descendente em papel, utilizando o sistema de solventes ácido acético, butanol, água (1:4:5), apesar de ter contribuído para a purificação da toxina ST, uma vez que se conseguiu obter apenas uma mancha, não é recomendável para tal, já que o rendimento observado no processo foi muito baixo. Entretanto, nos parece um método simples e prático na análise da purificação da mesma.

9) Embora não tivéssemos completado o processo de purificação da enterotoxina ST de Escherichia coli, conseguimos por métodos simples e econômicos um aumento significativo na atividade específica de até 51 vezes. Com este preparado semi-purificado, análises mais conclusivas e homogêneas poderão ser obtidas no estudo de efeitos biológicos e características da molécula de ST.

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALDERETE, J.F. & ROBERTSON, D.C. Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxygenic Escherichia coli. Infect. Immun. 19:1021-1030, 1978.
2. BANWELL, J.G. & SHERRY, H. Effect of bacterial enterotoxins on the gastrointestinal tract. Gastroenterology 65: 467-497, 1973.
3. 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.
4. BURROWS, M.R.; SELLWOOD, R. & GIBBONS, R.A. Hemagglutinating and adhesive properties associated with K99 antigen of bovine strains of Escherichia coli. J. Gen. Microbiol. 96:269-275, 1976.

5. BYWATER, R.J. Dialysis and ultrafiltration of a heat-stable enterotoxin from Escherichia coli. J. Med. Microbiol. 5:337-343, 1971.
6. CASTRO, A.F.P.; SERAFIM, M.R.; RANGEL, H.A. & GUEPRANT, P. L. Swiss and inbred mice in the infant mouse test for the assay of Escherichia coli thermostable enterotoxin. Infect. Immun. 22:972-974, 1978.
7. CLEMENTS, J.D. & FINKELSTEIN, R.A. Isolation and characterization of homogeneous heat-labile enterotoxin with high specific activity from Escherichia coli cultures. Infect. Immun. 24:760-769, 1979.
8. CLEMENT, J.D.; YANCEY, R.J. & FINKELSTEIN, R.A. Pure heat-labile enterotoxin (LT) from Escherichia coli is similar to cholera toxin immunologically, structurally and in specific activity. In: Proceedings of the 15th Joint Conference on cholera. National Institutes of Health, Bethesda, Md: 127-141, 1979.
9. DAFNI, Z. & ROBBINS, J.B. Purification of heat-labile enterotoxin from Escherichia coli 078:H11 by affinity chromatography with antiserum to Vibrio cholerae toxin. J. Infect. Dis. 133:5138-5141, 1976.
10. DAFNI, Z.; SACK, R.B. & GRAIG, J.D. Purification of heat-labile enterotoxin from four Escherichia coli strains by affinity immunoabsorbent: evidence for similar subunit structure. Infect. Immun., 22:852-860, 1978.

11. DEAN, A.G.; CHING, Y.C.; WILLIAMS, R.G. & HARDEN, L.R. Test for Escherichia coli enterotoxin of diarrhea in children in Honolulu. J. Infect. Dis. 125:407-411, 1973.
12. 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 183:330-336, 1974.
13. EVANS, D.G.; EVANS, D.J.Jr. & PIERCE, N.F. Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxins of Escherichia coli. Infect. Immun. 7:873-880, 1973.
14. EVANS, D.J.; EVANS, D.G. & GORBACH, S.L. production of vascular permeability factor by enterotoxigenic Escherichia coli isolated from man. Infect. Immun. 8:725-730, 1973.
15. EVANS; D.G.; EVANS; D.J.Jr. & GORBACH, S.L. Identification of enterotoxigenic Escherichia coli and serum antitoxin activity by vascular permeability factor essay. Infect. Immun. 8:731-739, 1973.
16. EVANS, D.G.; SILVER, R.P.; EVANS, D.J.Jr.; CAASE, D.G. & GORBACH, D.G. Plasmid controlled colonization factor associated with virulence in Escherichia coli enterotoxigenic for humans. Infect. Immun. 12:656-667, 1975.

17. EVANS, D.G.; EVANS, D.J.Jr.; TJOA, W.C. & DUPONT, H.L. Detection and characterization of colonization factor of enterotoxigenic Escherichia coli isolated from adults with diarrhea. Infect. Immun. 19:727-736, 1978.
18. EVANS, D.G. & EVANS, D.J.Jr. A 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.
19. FIELD, D.M.; GRAF, L.H.Jr.; LAIRO, W.J. & SMITH, D.L. Heat-stable enterotoxin of Escherichia coli: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration and ion transport in small intestine. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75:2800-2804, 1978.
20. FINKELSTEIN, R.A. Monospecific equine antiserum against cholera exo-enterotoxin. Infect. Immun. 2:691-697, 1970.
21. FRANCESCHI, A.P.; CASTRO, A.F.P.; SERAFIM, M.B. & PULITIGLIONE, L. NETTO. Estudos comparativos entre o teste de alça ligada do intestino de coelho e do camundongo recém-nascido na detecção da enterotoxina termo-estável (ST) produzida por Escherichia coli. Rev. Microb. (S.Paulo) 8: 123-128, 1977.
22. GIANELLA, R.A. Suckling mouse model for detection of heat-stable Escherichia coli enterotoxin: characteristics of the model. Infect. Immun. 14:95-99, 1976.

23. GIANELLA, R.A. & DRAKE, K.W. Effect of purified Escherichia coli heat-stable enterotoxin on intestinal cyclic nucleotide metabolism and fluid secretion. Infect. Immun. 24:19-23, 1979.
24. GOMES, J.A.; RODRIGUES, A.C.; SIMÕES, M.; SERAFIM, M.B. & CASTRO, A.F.P. Simplification of methods for the production and storage of specimen to be tested for heat-stable enterotoxin of Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 10: 786-790, 1979.
25. GRAIG, L.C. Fractionation and characterization by dialysis. Analytical Methods of Protein Chemistry. Eds. ALEXANDER, B. & BROCK, R.J. Bergamon Press: 103, 1960.
26. GUERRANT, R.L.; BRUNTON, L.L.; SCHNAITMAN, T.C.; REBHUN, L. I. & GILMAN, A.G. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cells morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of Vibrio cholerae and Escherichia coli. Infect. Immun. 10: 320-327, 1974.
27. GYLES, C.L. Immunological study of the heat-labile enterotoxins of Escherichia coli and Vibrio cholerae. Infect. Immun. 9:564-570, 1974.
28. GYLES, J.M.; SO, M. & FALKOW, S. The enterotoxin plasmids of Escherichia coli. J. Infect. Dis. 130:40-49, 1974.

29. HUGHES, J.M.; MURAD, F.; CHANG, B. & GUERFANT, R.L. Pole of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of Escherichia coli. Nature (London) 271:755-756, 1978.
30. JACKS, T.M. & WU, B.J. Biochemical properties of Escherichia coli low-molecular weight heat-stable enterotoxin. Infect. Immun. 9:342-347, 1974.
31. JANSON, J.C. Adsorption phenomena of Sephadex. J.Chromatogr. 28:12-20, 1967.
32. 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.
33. KLIPSTEIN, F.A.; LEE, C.S. & ENGERT, R.F. Assay of Escherichia coli enterotoxins by in vivo perfusion in the rat jejunum. Infect. Immun. 14:1004-1010, 1976.
34. KLIPSTEIN, F.A.; ROWE, B.; ENGERT, R.F.; SHORT, H.B. & GROSS, R.J. Enterotoxigenicity of enteropathogenic serotypes of Escherichia coli isolated from infants with epidemic diarrhea. Infect. Immun. 21:171-178, 1978.
35. LARIVIÈRE, S.; GYLES, C.L. & BARNUM, D.A. A comparative study of the rabbit and pig gut loops systems for the Assay of Escherichia coli enterotoxin. Can.J.Comp.Med. 36:319-327, 1972.

36. LOWRY, O.H.; BROUGH, R.N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, P. J.  
Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275, 1951.
37. MITCHELL, I.G.; TAME, M.J. & KENWORTHY, R. Conditions for the production of Escherichia coli enterotoxin on a defined medium. J. Med. Microbiol. 7:395-400, 1974.
38. MITCHELL, I.G.; TAME, M.J. & KENWORTHY, R. Separation and purification of enterotoxins from a strain Escherichia coli pathogenic for pigs. J. Med. Microbiol. 7:439-450, 1974.
39. MOON, H.W. & WHIPP, S.C. Development resistance with age by swine intestine to effects of enteropathogenic Escherichia coli. J. Infect. Dis. 122:220-223, 1970.
40. MOON, H.W.; WHIPP, S.C.; ENGSTROM, G.W. & BAETZ, A.L.  
Response of the rabbit ileal loop to cell-free products from Escherichia coli enteropathogenic for swine. J. Infect. Dis. 127:182-187, 1970.
41. MULLAN, N.A.; BURGESS, M.N. & NEWSOME, P.M. Characterization of a partially purified methanol-soluble heat-stable Escherichia coli enterotoxin in infant mice. Infect. Immun. 19:779-784, 1978.

42. NALIN, D.R.; LEVINE, M.M.; YOUNG, C.R.; BEPCQUETT, E.J. & MCLAUGHLIN, J.C. Increase Escherichia coli enterotoxin detection after concentrating culture supernatants: possible new enterotoxin detectable in dogs but not in infant mice. J. Clin. Microbiol. 8:700-703, 1978.
43. OLSSON, E. & SODERLIND, O. Comparison of different assays for definition of heat-stable enterotoxigenicity of Escherichia coli porcine strains. J. Clin. Microbiol. 11:6-15, 1980.
44. 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. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sec. B. 83:31-36, 1975.
45. PIERCE, M.F. & WALLACE, C.K. Stimulation of jejunal secretion by a crude Escherichia coli enterotoxin. Gastroenterology 63:439-448, 1972.
46. SACK, R.B. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic Escherichia coli. Ann. Rev. of Microbiol. 29: 333-353, 1975.
47. SACK, D.A.; KAMINSKI, D.C.; SACK, R.S.; WAMDLA, T. O.; ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I.; SLACK, R.C.B.; ARTHUR, R.R. & KAPIKIAN, A.Z. Enterotoxigenic Escherichia coli diarrhea of travellers: A prospective study of American peace corps volunteers. John Hopkins. Med. J. 141:63-70, 1977.

48. SANTOS, D.; PALCHAUDHURI, S. & MAAS, W.K. Genetic and physical characteristics of an enterotoxin plasmid. J. Bacteriol. 124:1240-1247, 1975.
49. SCHENKEIN, I.; GREEN, R.F.; SANTOS, D.S. & MAAS, W.K. Partial purification and characterization of a heat-labile enterotoxin of Escherichia coli. Infect. Immun. 13:1710-1720, 1976.
50. SILVA, R.M. Características culturais e bioquímicas dos colibacilos invasores. Tese de Mestrado apresentada a Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1978.
51. SIMÕES, M. Fatores de virulência e sensibilidade a drogas em colibacilos isolados de suínos com diarreia. Tese de Mestrado apresentada a Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1979.
52. SMITH, H.W. & HALLS, S. Studies on Escherichia coli enterotoxins. J. Path. Bact. 93:531-543, 1967.
53. SMITH, H.W. & GYLES, C.L. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of Escherichia coli of porcine origin. J. Med. Microbiol. 3:387-401, 1970.
54. SMITH, N.W. & SACK, B. Immunologic cross-reactions of enterotoxins from Escherichia coli and Vibrio cholerae. J. Infect. Dis. 127:164-170, 1973.

55. SPEIRS, J.I.; STAVRIG, S. & KONOWALCHUK, J. Assay of Escherichia coli heat-labile enterotoxin with Vero cells. Infect. Immun. 16:617-622, 1977.
56. STAPLES, S.J. & GIANELLA, R.A. Production and purification of human Escherichia coli heat-stable enterotoxin. In: Proceedings of the 15th. Joint Conference of Cholera. National Institutes of Health, Bethesda, Md.: 127-141, 1979.
57. SVENNERHOLM, A.M. & HOLMGREN, J. Identification of Escherichia coli heat-labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (Gml-ELISA) procedure. Curr. Microbiol. 1:19-23, 1978.
58. TAKEDA, Y.; TAKEDA, T.; YANO, T.; YAMAMOTO, K. & MIWATANI, T. Purification and partial characterization of heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 25:978-985, 1979.
59. WASTERNAK, C. Gel chromatography of low molecular weight compounds. Pharmazie 27:67-79; 1972.
60. WHIPP, S.C.; MOON, H.W. & LYON, N.C. Heat-stable Escherichia coli enterotoxin produced in vivo. Infect. Immun. 12:240-244, 1975.
61. WILLIAMS; K.W. Solute gel interactions in gel filtration. Lab. Practice 21:667-670, 1972.