

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

---

**CLEIDE FERREIRA CATANI**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE  
ENTEROHEMOLISINA PRODUZIDA POR  
*Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICAS**

**Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências na área de  
Bioquímica.**

**1999**

CLEIDE FERREIRA CATANI

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE  
ENTEROHEMOLISINA PRODUZIDA POR  
*Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICAS**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo (a) candidato (a)  
*Cleide Ferreira Catani*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.  
*30/7/99*

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências na área de  
Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Tomomasa Yano

1999

95/5620

CIDADE	BC
CHAMADA:	UNICAMP
	C28p
Ex.	
IMBO BC/	26630
ROC.	229/99
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
RECO.	R\$ 11,00
ATA	23/10/99
CPD	

CM-00136300-B

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

**Catani, Cleide Ferreira**  
**C28p** Purificação e caracterização de enterohemolisina produzida  
por *Escherichia coli* enteropatogênicas/Cleide Ferreira Catani. -  
Campinas, SP:[s.n.], 1999.  
118f.:ilus.

Orientador: Tomomasa Yano  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1. *Escherichia coli*. 2. Purificação. 3. Toxinas. I. Yano,  
Tomomasa. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto  
de Biologia. III. Título.

**Data da Defesa: 30/07/99**

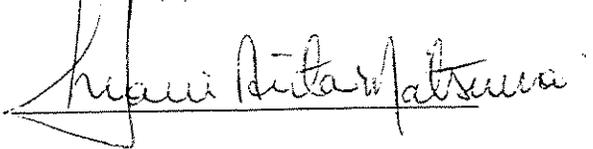
**Banca Examinadora**

**Titulares:**

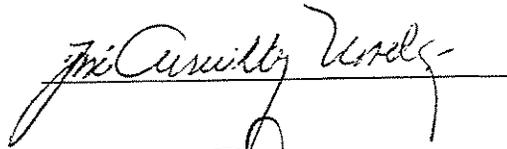
Prof. Dr. Tomomasa Yano (Orientador)



Profa. Dra. Maria Sumiko Arita Matsuura



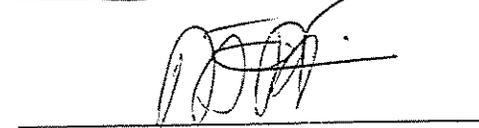
Prof. Dr. José Camilo Novello



Prof. Dr. Domingos da Silva Leite



Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira



**Suplentes:**

Prof. Dr. Sérgio Marangoni



Profa. Dra. Maria Sílvia Vicari Gatti



---

*“Numa busca, a insistência não é suficiente. O que não se busca da maneira correta não se encontra”*

*Provérbio chinês*

---

Ao André, meu amor e meu  
amigo, por sua presença em  
todos os momentos.

Ao meu filho Bruno, alegria da  
minha vida,

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Ao Yano, por sua amizade e orientação durante todos estes anos.

A todos os amigos do laboratório, que compartilharam comigo esses anos: Valéria, Helô, Pan, Ana Cláudia, Sílvia, Alessandra, Mário Paulo, Claudio, Gleize, Márcia Tomy, Beth, Márcia Regina, Juan, Rosabel, Marcelo, Cláudia e Gláucia. Agradeço as sugestões, dúvidas, tristezas, alegrias, os cafés, aniversários, amendoins e tudo mais que fez parte de nosso dia-a-dia.

À Stella, por sua disponibilidade, ajuda e incentivo durante todos esses anos.

Ao Erivaldo, por sua ajuda, principalmente nos experimentos com animais.

À Profa. Arita, por seu apoio, carinho, incentivo e disponibilidade constantes, pelo empréstimo de equipamentos e materiais, por suas correções e participação na Banca Examinadora do Exame de Qualificação.

À Profa. Nilce, por sua disponibilidade, sugestões e participação na Banca Examinadora do Exame de Qualificação.

Ao Prof. Domingos, por sua disponibilidade e empenho no processo de transferência do Curso de pós-graduação, por suas sugestões e participação na Banca Examinadora do Exame de Qualificação.

À Profa. Sílvia, por sua ajuda e disponibilidade constantes, especialmente nos experimentos utilizando cultura de células.

---

Ao Prof. Áureo, pelo auxílio na realização das fotos de cultura de células.

À Profa. Clarice, por seu apoio e incentivo especiais no processo de transferência do Curso de pós-graduação.

À Andréia e à Lourdes, pela disponibilidade e auxílio na confecção de requisições, matrículas e papéis sem fim.

Às bibliotecárias do Instituto de Biologia, pela atenção e auxílio.

A todos os colegas do Departamento de Microbiologia, pela agradável convivência ao longo destes anos.

Às minhas mães queridas, Clementina e Lygia, por todo seu amor e confiança.

.....À minha irmã Cássia, por ser a melhor amiga que alguém pode ter, e ao meu irmão Cláudio, por seu carinho.

A esta família campineira maravilhosa, Nana, Iza e Dú, por seu apoio, por estarem comigo, sempre, em todos os momentos.

À Fabi e ao Klaus, amigos de tanto tempo, por sua amizade e estímulo.

Ao André e ao Bruno, por seu amor, apoio e compreensão.

Ao André novamente, pelas fotos, slides, gráficos, tabelas, correção dos relatórios, cartas, projetos, tese...

À FAPESP, pelos subsídios financeiros aplicados nesta pesquisa.

## RESUMO

As enterohemolisinas (EHly) foram inicialmente detectadas em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênicas clássicas (EPEC), isoladas a partir de fezes de crianças com diarreia, sendo posteriormente detectada em amostras de *E. coli* isoladas de animais. Esta hemolisina, diferentemente da  $\alpha$ -hemolisina, não é liberada espontaneamente no meio de cultivo, sendo necessária sua extração da célula bacteriana. Entre os métodos de extração utilizados, a sonicação mostrou ser o método mais eficiente para a liberação da enterohemolisina. Para a detecção da atividade hemolítica, os diferentes materiais a serem testados foram incubados a 37°C por 1h, em microplacas ou em tubos, com 1% de eritrócitos de carneiro lavados com tampão PBS. A amostra padrão de *E. coli* C3888 foi utilizada para a produção e purificação da enterohemolisina. Esta cultura foi cultivada em meio TSB, acrescido de quelante de ferro EDDA, por 22 horas em shaker a 37°C. Após o cultivo, a cultura foi sonicada e precipitada com sulfato de amônio com 60% de saturação. O material precipitado foi cromatografado em coluna de DEAE Fast-Flow. As frações com atividade hemolítica foram recromatografadas em coluna de exclusão molecular Superdex 200 e posteriormente em coluna Mono Q no sistema HPLC. A fração com atividade hemolítica obtida da coluna Mono Q apresentou apenas uma banda de 60kDa em gel de SDS-PAGE. No processo de purificação foi obtido um aumento na atividade específica de 2800 vezes, e aproximadamente 100 vezes na atividade relativa. A atividade da EHly se manteve estável por diversos meses no sonicado de cultura, quando este foi mantido a baixas temperaturas (-20°C e -70°C). Entretanto, não foi possível manter a atividade da hemolisina pura nos processos finais de purificação.

Apesar da utilização de três diferentes métodos de inoculação em coelhos, para a obtenção de antissoro específico anti-enterohemolisina, não foram obtidos resultados satisfatórios nos testes de neutralização realizados, já que os títulos de soroneutralização obtidos foram os mesmos com soros pré e pós-imunização. Em

testes com diferentes culturas celulares, a enterohemolisina semi-purificada foi citotóxica para as culturas de células Hep-2, HeLa, Caco-2, Vero, MDBK e 3T3, com arredondamento celular e descolamento do tapete. As células CHO apresentaram um efeito citopático, com alongamento das células e aparente condensação do núcleo. Nos ensaios com camundongos, não foi observado letalidade ou toxicidade nos animais adultos ou nos recém-nascidos testados.

## ABSTRACT

Enterohaemolysins (EHly) were first detected in classical enteropathogenic *Escherichia coli* strains (EPEC), isolated from feces of infants with diarrhea, and also detected in strains isolated from animals. Differing from  $\alpha$ -haemolysin, EHly is not spontaneously released to culture medium. Sonication was the most efficient method to extract EHly. In order to detect haemolytic activity, the material was incubated for 1h at 37°C in microplates or in tubes, with 1% sheep erythrocytes, washed with PBS buffer. *E. coli* strain C3888 was used to carry out production and purification trials. Bacteria was cultivated in TSB medium with EDDA iron chelant, for 22h at 37°C. The cells were sonicated and the pellet submitted to cromatography in DEAE Fast-Flow column. The fractions that showed activity were applied to Superdex-200 and Mono Q HPLC columns. The fraction with haemolytic activity obtained from Mono Q cromatography showed just one 60kDa band in SDS-PAGE electrophoresis gel. Increases of 2800 times in specific activity and aproximately 100 times in relative activity were obtained. The activity remained stable for several months in sonicated material when it was kept at low temperatures (-20°C to -70°C). However, it was not possible to maintain the activity of pure haemolysin in the final purification procedures.

Neutralization tests with specific anti-EHly antiserum did not present satisfactory results, despite the three different inoculation methods we tested in rabbits. Titles obtained with pre- and post-immunized sera were the same. In tests with different cell cultures, semipurified EHly proved to be citotoxic to Hep-2, HeLa, Caco-2, Vero, MDBK and 3T3 cells, showing cell rounding and detachment of the cell layer. CHO cells presented a cytopathic effect, with elongation and apparent condensation of the nuclei. No lethality or toxicity were observed in tests carried out in mice.

# ÍNDICE

1. Introdução .....	01
2. Revisão Bibliográfica .....	03
3. Material e Métodos .....	21
3.1. Amostras bacterianas .....	21
3.2. Detecção da enterohemolisina .....	21
3.2.1. Padronização das hemácias .....	21
3.2.2. Teste em placas .....	22
3.2.3. Teste em meio líquido .....	22
3.2.3.1. Com culturas bacterianas .....	22
3.2.3.2. Com sobrenadante de cultura .....	23
3.2.3.3. Em microplaca .....	23
3.3. Extração da enterohemolisina .....	23
3.3.1. Extração por ultra-som .....	23
3.3.2. Extração com mitomicina C .....	24
3.3.3. Extração com polimixina B .....	24
3.3.4. Extração por criofatura .....	25
3.4. Padronização das condições de cultivo da enterohemolisina .....	25
3.4.1. Cultivo em diferentes meios de cultura .....	25
3.4.2. Variação do pH do meio .....	26
3.4.3. Cultivo em meio TSB com diferentes quelantes de ferro .....	26
3.5. Purificação da enterohemolisina .....	26
3.5.1. Produção da enterohemolisina .....	26
3.5.2. Processo de precipitação utilizando sulfato de amônio .....	27
3.5.3. Cromatografias .....	27
3.5.3.1. Cromatografias de troca-iônica convencionais .....	27
3.5.3.2. Cromatografias de exclusão molecular convencionais .....	28
3.5.3.3. Cromatografias de exclusão molecular no sistema HPLC ....	28

3.5.3.4. Cromatografia de troca-iônica no sistema HPLC .....	29
3.6. Dosagem de proteína .....	29
3.7. Análise eletroforética .....	30
3.7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida convencional (PAGE) .....	30
3.7.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) .....	30
3.7.3. Coloração dos géis de poliacrilamida .....	31
3.8. Determinação do peso molecular .....	31
3.9. Teste de termoestabilidade .....	31
3.10. Teste de estabilidade em diferentes soluções .....	32
3.11. Testes sorológicos .....	32
3.11.1. Obtenção de antissoro .....	32
3.11.2. Cromatografia em resina Sepharose Proteína A .....	33
3.11.3. Testes de soroneutralização .....	34
3.12. Testes de hemólise com diferentes hemácias .....	34
3.13. Teste de toxicidade <i>in vitro</i> em diferentes culturas de células .....	34
3.13.1. Preparo da cultura celular .....	34
3.13.2. Realização do teste .....	35
3.14. Teste de patogenicidade <i>in vivo</i> .....	36
3.14.1. Letalidade em camundongos .....	36
3.14.2. Teste em camundongos recém-nascidos .....	36
<b>4 Resultados .....</b>	<b>37</b>
4.1. Detecção da enterohemolisina .....	37
4.1.1. Teste em placas .....	37
4.1.2. Teste em meio líquido .....	38
4.2. Extração da enterohemolisina .....	38
4.2.1. Extração por ultra-som .....	38
4.2.2. Extração com mitomicina C .....	39
4.2.3. Extração com polimixina B .....	40
4.2.4. Extração por criofratura .....	40

4.3. Cultivo em diferentes meios de cultura .....	41
4.4. Variação do pH do meio de cultura .....	41
4.5. Cultivo com diferentes quelantes de ferro .....	42
4.5.1. Cultivo em meio TSB e TSB+EDDA .....	44
4.6. Purificação da enterohemolisina .....	44
4.6.1. Precipitação com sulfato de amônio .....	44
4.6.2. Cromatografias .....	45
4.6.2.1. Cromatografias de troca-iônica .....	45
4.6.2.2. Cromatografias de exclusão molecular convencionais .....	46
4.6.2.3. Cromatografias de exclusão molecular no sistema HPLC .....	46
4.6.2.4. Cromatografia em coluna de HPLC Mono Q .....	49
4.6.3. Determinação do peso molecular .....	54
4.7. Ensaio de termoestabilidade .....	60
4.8. Teste de estabilidade com diferentes soluções .....	60
4.9. Obtenção de antissoro e testes de soroneutralização .....	62
4.10. Atividade hemolítica frente a diferentes eritrócitos .....	64
4.11. Teste de toxicidade <i>in vitro</i> em culturas de células .....	65
4.12. Testes de patogenicidade <i>in vivo</i> .....	66
4.12.1. Letalidade em camundongos .....	66
4.12.2. Teste em camundongos recém-nascidos .....	66
<b>5. Discussão .....</b>	<b>69</b>
<b>6. Conclusões .....</b>	<b>83</b>
<b>7. Bibliografia .....</b>	<b>85</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Comparação do padrão hemolítico de amostras produtoras de $\alpha$ -hemolisina e enterohemolisina .....	37
<b>Tabela 2.</b> Atividade hemolítica das amostras padrão de enterohemolisina .....	39
<b>Tabela 3.</b> Atividade hemolítica da amostra C3888 tratada com Mitomicina C .....	39
<b>Tabela 4.</b> Atividade hemolítica da amostra C3888 tratada com polimixina B .....	40
<b>Tabela 5.</b> Atividade hemolítica das amostras tratadas por criofratura .....	41
<b>Tabela 6.</b> Atividade hemolítica da amostra C3888 cultivada em diferentes meios de cultura .....	42
<b>Tabela 7.</b> Crescimento bacteriano e atividade hemolítica da amostra C3888 em meio TSB com diferentes quelantes de ferro .....	43
<b>Tabela 8.</b> Atividade hemolítica do cultivo em meio TSB e TSB+EDDA .....	44
<b>Tabela 9.</b> Atividade hemolítica da amostra C3888 sob diferentes saturações de sulfato de amônio .....	45
<b>Tabela 10.</b> Seqüência de purificação da enterohemolisina (EHly) .....	54
<b>Tabela 11.</b> Teste de estabilidade da enterohemolisina a 4°C e a -20°C .....	60
<b>Tabela 12.</b> Teste de estabilidade da enterohemolisina a 25°C .....	61
<b>Tabela 13.</b> Título de soroneutralização (material DEAE) .....	62
<b>Tabela 14.</b> Título de soroneutralização (material Superdex 200) .....	63
<b>Tabela 15.</b> Título de neutralização dos eluatos da cromatografia em Sepharose Proteína A .....	63
<b>Tabela 16.</b> Atividade hemolítica de C3888 frente a eritrócitos de diferentes espécies .....	64
<b>Tabela 17.</b> Atividade biológica da EHly em diferentes linhagens celulares .....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cromatografia da enterohemolisina em coluna de troca iônica DEAE Sepharose Fast-Flow .....	47
<b>Figura 2.</b> Cromatografia de enterohemolisina em coluna de exclusão molecular Superdex 200 (convencional).....	48
<b>Figura 3.</b> Padrão de eluição da enterohemolisina em resina de exclusão molecular Superdex 200 (HPLC) .....	50
<b>Figura 4.</b> Padrão de eluição da enterohemolisina em resina de exclusão molecular Superdex 75 (HPLC) .....	51
<b>Figura 5.</b> Padrão de eluição da enterohemolisina em resina de exclusão molecular Shimpack Diol (HPLC) .....	52
<b>Figura 6.</b> Padrão de eluição da enterohemolisina em resina de troca-iônica Mono Q .....	53
<b>Figura 7.</b> Frações de cromatografia em diferentes resinas de exclusão molecular, em gel PAGE .....	55
<b>Figura 8.</b> Frações de cromatografia em diferentes resinas de exclusão molecular, em gel SDS-PAGE .....	56
<b>Figura 9.</b> Perfil eletroforético das frações cromatográficas durante os diferentes processos de purificação em gel SDS-PAGE .....	57
<b>Figura 10.</b> Frações de cromatografia em resina Mono Q, em gel SDS-PAGE .....	58
<b>Figura 11.</b> Perfil eletroforético da enterohemolisina em gel de SDS-PAGE .....	59
<b>Figura 12.</b> Efeito da atividade biológica de enterohemolisina em células 3T3, MDBK e HeLa .....	67
<b>Figura 13.</b> Efeito da atividade biológica de enterohemolisina em células Hep-2, Caco-2 e CHO .....	68

## ABREVIATURAS

- ATV** - Associação Tripsina-Versene
- BHI** - Infusão de cérebro e coração
- BSA** - Albumina de soro bovino
- Caco-2** - Linhagem celular de enterócitos humanos
- CHO** - Linhagem celular de ovário de hamster chinês
- CNF** - Fator necrosante citotóxico
- DTT** - Ditioneitol
- EDDA** - Etilenodiamina-di (o- hidroxifenol) ácido acético
- EDTA** - Etilenodiamino-tetra ácido acético
- EGTA** - Etileno Glicol-bis  $\beta$ -aminoetil éter
- EHly** - Enterohemolisina
- EPEC** - *Escherichia coli* enteropatogênica clássica
- HeLa** - Linhagem celular de carcinoma de útero humano
- HEp-2** - Linhagem celular de carcinoma de laringe humana
- HI** - Infusão de coração
- HUS** - Síndrome urêmica hemolítica
- IgG** - Imunoglobulina G
- ITU** - Infecção do trato urinário
- 
- LB** - Meio Luria Bertani
- LT** - Toxina termo-lábil
- MDBK** - Linhagem celular de rim de boi Madine-Derby
- MEM** - Meio mínimo essencial de Eagle
- PBS** - Tampão salina fosfato
- PDE** - Doença do edema em suínos
- PMSF** - Fenilmetil sulfonil fluoridro
- RITARD** - Diarréia em coelhos adultos em alça intestinal reversível
- SCI** - Síndrome da cabeça inchada

**SDS** - Dodecil sulfato de sódio

**SFB** - Soro fetal bovino

**Tris** – Tris (hidroximetil) aminometano

**TSA** - Ágar tríptico de soja

**TSB** - Caldo tríptico de soja

**UH** - Unidades hemolíticas

**Vero** - Linhagem celular de rim de macaco verde da África

**VT**- Verotoxina

**VTEC** - *Escherichia coli* verotoxigênica

**3T3** - Linhagem celular de fibroblastos de camundongo

# 1. INTRODUÇÃO

A enterobactéria *Escherichia coli* faz parte da microbiota do intestino de homens e animais. Este microrganismo pode, entretanto, causar infecções, tanto no trato intestinal (diarréia, disenteria, uremia hemolítica, colite hemorrágica etc.), como infecções extraintestinais (infecções do trato urinário, septicemias, peritonites, apendicites etc.). Sua patogenicidade é multifatorial, e certos fatores estão associados a amostras virulentas. Entre estes fatores está a capacidade de algumas amostras produzirem hemolisinas.

Entre as hemolisinas produzidas por *E. coli*, a mais estudada e melhor caracterizada é a  $\alpha$ -hemolisina. Sua síntese é dependente de uma série de fatores presentes no meio de cultura. Em presença de quelantes de ferro, a atividade hemolítica de algumas amostras aumenta (Nicaud *et al.*, 1985; Mackman *et al.*, 1986). O cálcio foi descrito como sendo essencial para a ativação da  $\alpha$ -hemolisina (Snyder e Zwadyk, 1969), para sua estabilidade (Nicaud *et al.*, 1985) e para a ligação da toxina às membranas do eritrócito (Boehm *et al.*, 1990).

A purificação da  $\alpha$ -hemolisina é bastante difícil, já que a hemolisina forma grandes agregados heterogêneos com lipídios, carboidratos e outras proteínas, provavelmente oriundas da parede celular. As condições desnaturantes necessárias para dissociar estes agregados, resultam na perda da atividade hemolítica e de outras atividades biológicas.

Vários métodos tem sido descritos para a purificação da  $\alpha$ -hemolisina. Short e Kurtz (1971), demonstraram que a  $\alpha$ -hemolisina pode ser separada de outros componentes do sobrenadante da cultura por cromatografia de gel filtração em Sephadex G-200 e Sepharose 6B. Estes autores descreveram que a  $\alpha$ -hemolisina também pode ser purificada utilizando resina de troca iônica DEAE-celulose em pH 6,0. Para purificação em larga escala também tem sido descrito o uso de gradiente de

glicerol (Cavalieri e Snyder, 1982) e precipitação com polietileno glicol (PEG 4000) (Bhakdi *et al.*, 1986).

Embora a  $\beta$ -hemolisina se assemelhe à  $\alpha$ -hemolisina quanto ao padrão de hemólise total em placas de ágar-sangue e quanto à produção durante a fase exponencial de crescimento, ela está associada à célula e, diferentemente da  $\alpha$ -hemolisina, não é liberada para o sobrenadante de cultura. Tentativas de dissociação da hemolisina da bactéria para sua caracterização não apresentaram resultados positivos. O uso de sonicação, congelamento e descongelamento, autólise, digestão com tripsina e lisozima não foram eficientes na detecção da  $\beta$ -hemolisina no sobrenadante de cultura (Short e Kurtz, 1971).

A enterohemolisina, em contraste com a  $\alpha$ - e  $\beta$ -hemolisinas, é produzida na fase estacionária do crescimento das bactérias, sendo detectada apenas em placas de ágar-sangue que contenham eritrócitos lavados com tampão PBS, 24h após a incubação (Beutin *et al.*, 1988). A exemplo da  $\beta$ -hemolisina, a enterohemolisina não é liberada no meio de cultura (Beutin *et al.*, 1988; Beutin, 1991). Entretanto, embora associada à célula bacteriana, esta hemolisina é detectada em extratos de cultura tratada por sonicação (Beutin, *et al.*, 1990).

Até o presente momento não há relatos de processos de purificação da enterohemolisina. Beutin *et al.* (1990), através de preparados de proteínas externas da amostra-padrão C3888 (EHly<sup>+</sup>) e K-12 recombinante EHly<sup>+</sup>, demonstraram que estas linhagens expressam uma proteína de 60 kDa. Esta proteína reage fortemente com soro preparado a partir da linhagem K-12 recombinante e não foi detectada em amostras não produtoras de enterohemolisina.

Para a purificação e caracterização da enterohemolisina (EHly) utilizamos a amostra C3888 e os objetivos específicos foram:

1. Determinação do melhor método de detecção e extração da EHly;
2. Determinação das melhores condições de cultivo para a produção da EHly;
3. Purificação da EHly e obtenção de antissoro específico anti-EHly;
4. Caracterização biológica em culturas de células e em camundongos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A habilidade de certas amostras de *E. coli* em lisar eritrócitos de diferentes espécies de mamíferos foi inicialmente descrita por Kayser, 1903 (apud Beutin, 1991), que evidenciou atividade hemolítica no sobrenadante de cultura destas amostras. Outros autores, entretanto, verificaram a atividade hemolítica somente associada à célula (Bamforth & Dudgeon, 1952; Robinson, 1951).

Smith, em 1963, foi o primeiro a diferenciar as hemolisinas de *E. coli*, demonstrando que, sob as mesmas condições de cultivo, algumas amostras de *E. coli* hemolíticas produziam simultaneamente hemolisinas detectadas no sobrenadante de cultura e hemolisinas associadas às células. As hemolisinas ligadas às células não eram neutralizadas por antissoro preparado contra a hemolisina liberada no meio de cultivo, indicando que as duas hemolisinas eram diferentes. O tipo de hemolisina capaz de ser liberado para o meio ("cell-free"), foi designado  $\alpha$ -hemolisina, enquanto o segundo tipo, que está relacionado à célula, foi chamado de  $\beta$ -hemolisina. Esta designação talvez não tenha sido a mais apropriada, já que  $\alpha$ -e  $\beta$ -hemolisinas produzem hemólise  $\beta$ -hemolítica (zonas claras de lise) ao redor das colônias em meio de ágar-sangue, podendo ser detectadas após 3h de incubação.

---

Existem atualmente poucas informações sobre a  $\beta$ -hemolisina. Tentativas de dissociação da  $\beta$ -hemolisina para sua caracterização não apresentaram resultados positivos. O uso de sonicação, congelamento e descongelamento, autólise, digestão com tripsina e lisozima não foram eficientes na detecção da  $\beta$ -hemolisina em sobrenadante de cultura (Short & Kurtz, 1971). Estes dados sugerem que esta hemolisina seja extremamente instável quando dissociada da célula, ou sua produção é extremamente baixa, não sendo detectada nos testes de lise de eritrócitos.

Um terceiro tipo de hemolisina, designada  $\gamma$ -hemolisina, foi descrito por Walton e Smith, em 1969. Produção espontânea de  $\gamma$ -hemolisina foi observada em *E. coli* K-12 não-hemolítica, selecionada para resistência ao ácido nalidíxico. Em contraste com as outras hemolisinas, sua capacidade hemolítica é restrita a alguns tipos de hemácias, lisando eritrócitos de cavalo, cobaia e carneiro, mas não as hemácias de homens e coelhos.

A  $\alpha$ -hemolisina é a mais estudada das hemolisinas produzidas por *E. coli*, e tem sido caracterizada funcional, bioquímica e geneticamente.

Os primeiros trabalhos realizados com  $\alpha$ -hemolisina de *E. coli* na década de vinte não foram conclusivos quanto ao seu envolvimento com patogenicidade (Cavaliere *et al.*, 1984). Estudos epidemiológicos posteriores demonstraram que a produção de  $\alpha$ -hemolisina estaria relacionada com *E. coli* que causam infecções extraintestinais, particularmente infecções do trato urinário (ITU), peritonites, apendicites, septicemia e meningite neonatal (Hugues *et al.*, 1983; Welch *et al.*, 1981).

Cooke e Ewins (1975) relataram que 47% das *E. coli* isoladas da uretra de pacientes que posteriormente desenvolveram infecções no trato urinário (ITU) eram hemolíticas, contra apenas 7% de culturas de *E. coli* obtidas de mulheres que não desenvolveram ITU. Diversos levantamentos epidemiológicos mostraram que cerca de 35 a 60% das amostras de *E. coli* isoladas de diferentes infecções extraintestinais produzem  $\alpha$ -hemolisina; de amostras isoladas de pacientes com septicemia cerca de 30 a 50%, e em amostras de *E. coli* de fezes de pessoas saudáveis ou com diarreia de 2 a 20% (DeBoy *et al.*, 1980; Evans *et al.*, 1981; Blanco *et al.*, 1992).

A associação de *E. coli* hemolíticas com infecções extraintestinais, levou muitos pesquisadores a questionarem se estas amostras de *E. coli* seriam mais virulentas que isolados não hemolíticos e se os fatores de virulência destas amostras hemolíticas seriam diferentes daqueles encontrados em amostras não hemolíticas.

Amostras de *E. coli* hemolíticas foram encontradas principalmente, mas não exclusivamente, nos sorogrupos O4, O6, O18 e O75 (Hugues *et al.*, 1982; Evans *et al.*, 1981). Hugues *et al.* (1982) relataram que a resistência ao soro entre sorogrupos O6, O18 e O75 estaria fortemente associada à produção de hemolisinas. A associação entre sorotipos e produção de hemolisinas de *E. coli* isoladas de fezes foi analisada por DeBoy *et al.* (1983), que demonstraram que a maioria dos sorotipos O6 isolados (85%), produzem  $\alpha$ -hemolisina. Muitos autores têm mostrado que amostras de *E. coli* hemolíticas freqüentemente hemaglutinam eritrócitos (Hugues *et al.*, 1983), possuem fimbrias (Brooks *et al.*, 1980) e antígeno K (Hacker *et al.*, 1983; Hugues *et al.*, 1983).

Inúmeros experimentos foram realizados *in vivo* para confirmar a hipótese de que a produção de  $\alpha$ -hemolisina seria um importante fator de virulência na patogênese causada por amostras de *E. coli* em infecções extraintestinais. Smith (1963) mostrou que sobrenadantes de culturas hemolíticas eram tóxicos e letais para camundongos. Injeções intravenosas destes sobrenadantes de cultura resultaram em letargia e dificuldade respiratória, e a morte destes animais ocorreu após 6h da inoculação. Estes efeitos eram neutralizados por imunização passiva, utilizando antissoro para a hemolisina, ou por imunização ativa, com a aplicação de quantidades subletais da hemolisina. As atividades letal e hemolítica de filtrados de cultura eram totalmente neutralizadas pelo aquecimento a 56°C por 10 min. Sobrenadantes de culturas não hemolíticas e produtoras apenas de  $\beta$ -hemolisina não eram letais quando injetados em camundongos. A neutralização pelo antissoro, a termolabilidade e a ausência de atividade letal em amostras não hemolíticas sugeriram que a  $\alpha$ -hemolisina seria a responsável pelos efeitos letais encontrados.

Estes resultados foram confirmados por estudos realizados posteriormente. Fried *et al.* (1971) mostraram que a virulência de amostras de *E. coli* selvagens hemolíticas, quando injetadas em camundongos e ratos por via intravenosa, era

consideravelmente maior do que a do mutante não hemolítico da mesma amostra. Resultados similares foram obtidos por Smith e Huggins (1985), que também descreveram que sobrenadantes de culturas de *E. coli* produtoras de  $\alpha$ -hemolisina aplicados intravenosamente eram tóxicos e letais para camundongos.

Emody *et al.* (1980) não conseguiram demonstrar uma diferença substancial de toxicidade entre culturas *Hly*<sup>+</sup> e derivados não hemolíticos, através de injeções intravenosas em camundongos. Entretanto, quando introduzidas por via intraperitoneal ou intranasal, as culturas hemolíticas foram claramente mais tóxicas. Estes autores observaram edema hemorrágico e efeito letal similar ao observado por Smith (1963). Fried e Wong (1970), relataram que 27% a 54% de ratos que foram injetados intravenosamente com *E. coli* hemolíticas desenvolveram pielonefrite. Os rins destes ratos apresentaram múltiplos abscessos, bem como infiltração tubular e intersticial de linfócitos polimorfonucleares. Em contraste, ratos injetados com *E. coli* não hemolíticas não desenvolveram pielonefrite e seus rins estavam normais.

Evidências diretas da importância da  $\alpha$ -hemolisina na patogênese das infecções extraintestinais por *Escherichia coli* têm sido mostradas através de técnicas de DNA recombinante. Infecções experimentais em ratos e camundongos com amostras de *E. coli* isogênicas, com e sem genes de  $\alpha$ -hemolisina, confirmaram que o determinante hemolítico aumenta a virulência de *E. coli* (Hacker *et al.*, 1983).

Welch *et al.* (1981), em experimentos com ratos, demonstraram que *E. coli* anteriormente não hemolíticas, tornaram-se virulentas após a clonagem do gene de  $\alpha$ -hemolisina. Quando o determinante *hly* clonado foi inativado pela inserção de Tn1, a amostra recombinante voltou a ser não virulenta. Entretanto, estes mesmos autores mostraram que a expressão da  $\alpha$ -hemolisina não é suficiente para conferir virulência à *E. coli*. A linhagem clonada, que se tornou virulenta (WA107), demorou muito mais tempo para causar peritonite nos ratos do que a linhagem selvagem virulenta, designada J96. Hull *et al.* (1982) também sugeriram que um fator

adicional à hemolisina seria necessário para a virulência de *E. coli*. Estes autores mostraram que a virulência da linhagem J96 ( $\alpha$ -hemolítica) em embriões de galinha foi perdida em mutantes não hemolíticos, mas restaurado por recombinantes Hly<sup>+</sup>. Entretanto, a transferência dos determinantes da  $\alpha$ -hemolisina para *E. coli* K-12 avirulenta não conferiu virulência a esta linhagem.

Em contraste com sua importância nas infecções extraintestinais, a  $\alpha$ -hemolisina parece não ter um papel significativo em diarreias causadas por *E. coli* isoladas de humanos e animais (DeBoy *et al.*, 1980; Beutin, 1991). Smith e Lingood (1971) descreveram que a produção de  $\alpha$ -hemolisina não contribui para a virulência de *E. coli* enteropatogênica em porcos, enquanto a produção de antígeno K88 é necessária para o desenvolvimento de diarreia. Amostras hemolíticas curadas de seus plasmídios contendo os genes para a  $\alpha$ -hemolisina foram tão virulentas quanto amostras selvagens, quando administradas oralmente a porcos. Ambas as linhagens, hemolíticas e não hemolíticas, produziram diarreia e doença do edema com igual severidade.

Outros trabalhos mostraram que amostras hemolíticas ou seus sobrenadantes não foram capazes de causar acúmulo de líquido em testes de alça ligada em coelhos (Caprioli *et al.*, 1983; DeRycke *et al.*, 1990). Entretanto, outros trabalhos descreveram que amostras Hly<sup>+</sup> e CNF1<sup>+</sup> (Fator Necrosante Citotóxico) causaram acúmulo de líquido em leitões (Prada *et al.*, 1991), e que porcos neonatais foram suscetíveis a desafios com amostras Hly<sup>+</sup> e CNF1<sup>+</sup>, desenvolvendo diarreia e enterocolite (Wray *et al.*, 1993). Recentemente Elliott *et al.* (1998) demonstraram, através do teste RITARD (diarreia em coelhos adultos em alça intestinal reversível), que amostras de *E. coli* DHEC (*E. coli* hemolíticas associadas a diarreia) causam enteropatias características, incluindo inflamação, necrose e hiperplasia das células no intestino delgado e grosso. Embora outros fatores de virulência possam estar envolvidos, os autores relataram que a  $\alpha$ -hemolisina seria o fator de virulência mais

importante neste modelo biológico, já que linhagens C600 avirulentas, clonadas com o gene *hly*, se tornaram virulentas, causando diarreia nos coelhos desafiados com estas linhagens.

Smith (1963) relatou, em seus trabalhos iniciais com hemolisinas de *E. coli*, que a  $\alpha$ -hemolisina era capaz de lisar hemácias de boi, carneiro, cavalo, porco, coelho, cobaia, galinha e humanas com a mesma intensidade. Entretanto, Rennie e Arbuthnott (1974), encontraram diferenças na sensibilidade das diferentes hemácias testadas. Os eritrócitos de carneiro e coelho foram os mais suscetíveis, enquanto os humanos e de camundongo os menos suscetíveis. Hemácias de peixe testadas mostraram-se resistentes à ação da  $\alpha$ -hemolisina.

Diferentes trabalhos realizados têm sugerido que a lise de eritrócitos deve estimular o crescimento bacteriano em organismos infectados por *Escherichia coli*, devido a um aumento do nível de ferro disponível. Estes dados foram confirmados pela observação de que a virulência de *E. coli* mutantes não hemolíticas aumentou depois de um pré-tratamento dos hospedeiros com hemoglobina ou sulfato de ferro (Smith & Huggins, 1985). Aparentemente, a produção de  $\alpha$ -hemolisina pode ser substituída pela administração de compostos contendo ferro.

A obtenção de ferro para o crescimento bacteriano não é, provavelmente, a única função da  $\alpha$ -hemolisina. Diversos trabalhos (Bhakdi & Tranum-Jensen, 1988; Bhakdi *et al.*, 1990) têm mostrado que a  $\alpha$ -hemolisina lisa eficientemente eritrócitos em concentrações relativamente altas; em concentrações muito inferiores, a  $\alpha$ -hemolisina afeta um grande número de células nucleadas do hospedeiro. Leucócitos polimorfonucleares, monócitos e linfócitos T periféricos têm sido identificados como os principais alvos da  $\alpha$ -hemolisina (Cavaliere & Snyder, 1982; Bhakdi *et al.*, 1990).

A capacidade da  $\alpha$ -hemolisina de lisar fagócitos polimorfonucleares e mononucleares, bem como linfócitos periféricos, provavelmente estabelece um

mecanismo pelo qual amostras de *E. coli* extraintestinais danificam e resistem às defesas do sistema imune do hospedeiro. Em adição à atividade leucotóxica, outros trabalhos com  $\alpha$ -hemolisina de *E. coli* demonstraram que esta hemolisina tem efeito citotóxico e citolítico em células endoteliais (Grimminger *et al.*, 1990), em fibroblastos de embriões de galinha (Chaturvedi *et al.*, 1969), em células tubulares do epitélio renal (Mobley *et al.*, 1990) e em fibroblastos de camundongos (Cavalieri & Snyder, 1982). Estes autores demonstraram que a  $\alpha$ -hemolisina purificada em gradiente de glicerol foi citotóxica para células de fibroblasto de camundongos (células 3T3) e leucócitos periféricos. Uma concentração aproximada de 5 UH (unidades hemolíticas) de  $\alpha$ -hemolisina (23ng de proteína), mataram cerca de  $10^5$  a  $10^6$  células. Em pielonefrite aguda, a forma mais séria de infecção do trato urinário, a morte de células tubulares renais pode permitir a penetração das bactérias através do epitélio do rim e a colonização do parênquima renal. O'Hanley *et al.* (1991) demonstraram, em experimentos utilizando como modelo camundongos com pielonefrite, que a produção da  $\alpha$ -hemolisina está relacionada com o dano do parênquima renal.

A atividade da  $\alpha$ -hemolisina de *E. coli* não está restrita, entretanto, a matar e lisar células alvo. Concentrações não-líticas da hemolisina provavelmente modulam a função normal de vários tipos de células do hospedeiro, aumentando a probabilidade da bactéria de se estabelecer e causar infecções. Bhakdi *et al.* (1989), demonstraram que concentrações baixas de  $\alpha$ -hemolisina aumentam a permeabilidade da membrana de granulócitos polimorfonucleares, que resulta em exocitose de grânulos e perda da capacidade de matar dos fagócitos.

Smith e Halls (1967) foram os primeiros a descrever a natureza transmissível dos genes da  $\alpha$ -hemolisina. Estes autores observaram que de 53 amostras de *E. coli* hemolíticas, 10 foram capazes de transmitir a característica hemolítica para *E. coli* K-12 receptoras não hemolíticas, concluindo que, nestas amostras, o determinante

para  $\alpha$ -hemolisina, designado *hly*, estaria localizado em plasmídios. Posteriormente, vários pesquisadores mostraram que o determinante para  $\alpha$ -hemolisina, na maioria das amostras de *E. coli* isoladas de fezes de origem animal, estava localizado em grandes plasmídios conjugativos, com tamanho variando entre 50 e 160 kb (Goebel *et al.*, 1974; Prada *et al.*, 1991).

A transferência da  $\alpha$ -hemolisina (Hly) de *E. coli* para outros gêneros de bactérias também foi descrito. Smith e Halls (1967), relataram que o fator Hly poderia ser transferido para *Salmonella* spp. e para algumas amostras de *Shigella* spp. A transferência do fator Hly para amostras de *E. coli* não hemolíticas, resultou em um fenótipo hemolítico relativamente estável. Nas amostras de *Shigella* e *Salmonella* spp. o fator Hly se mostrou menos estável. Emody *et al.* (1983) relataram a transferência do determinante Hly de *E. coli* para a bactéria *Proteus morganii* *in vitro* e *in vivo*. Le minor e Le Coueffic, em 1975 (apud Cavalieri *et al.*, 1984), relataram a transferência do Hly entre amostras de *E. coli*, bem como para *Salmonella typhi* e *Salmonella typhimurium*.

Smith e Halls (1967), sugeriram que os genes que codificariam a  $\alpha$ -hemolisina nas 43 amostras de *E. coli* que não transferiram seu caráter hemolítico, estariam localizados em cromossomos. Posteriormente, Minshew *et al.* (1978) também propuseram que a  $\alpha$ -hemolisina produzida por algumas amostras de *E. coli* isoladas de humanos com infecções extraintestinais, teriam seus determinantes genéticos localizados no cromossomo. Subseqüentemente, Hull *et al.* (1982), localizaram o *locus* que codifica a  $\alpha$ -hemolisina (*hly*) no cromossomo da bactéria, em amostras de *E. coli* isoladas do trato urinário. Welch *et al.* (1983) confirmaram estes resultados, demonstrando que a maioria das amostras hemolíticas isoladas do trato urinário e de outras infecções extraintestinais em humanos, bem como de fezes de pessoas saudáveis, carregam os determinantes *hly* em seus cromossomos.

Os determinantes genéticos para a síntese e secreção da  $\alpha$ -hemolisina ativa foram primeiramente clonados do plasmídeo pHly152 (Goegel & Hedgpeth, 1982). Através da construção de mutantes, complementados posteriormente com fragmentos da seqüência do plasmídeo pHly152, estes autores mostraram que os determinantes da  $\alpha$ -hemolisina são constituídos por quatro genes estruturais, arranjados na seqüência *hlyC*, *hlyA*, *hlyB* e *hlyD*. Este estudo também mostrou que os genes *hlyC* e *hlyA* são necessários para a síntese da hemolisina ativa, e o gene *hlyA* é um gene estrutural que codifica a proteína  $\alpha$ -hemolisina (HlyA). Os genes *hlyB* e *hlyD* codificam proteínas necessárias para o transporte da  $\alpha$ -hemolisina através das membranas da célula (Wagner *et al.*, 1983). Hibridização de DNA cromossômico ou plasmidial de Hly de amostras de *E. coli* hemolíticas uropatogênicas com genes *hly* clonados, revelaram uma extensa homologia entre os diferentes determinantes de  $\alpha$ -hemolisina (De la Cruz *et al.*, 1983). Esta homologia foi posteriormente confirmada, através da clonagem e mapeamento de uma variedade destes determinantes (Mackman & Holland, 1984). A evidência direta da existência de quatro genes estruturais foi fornecida pela seqüência de nucleotídeos dos determinantes de  $\alpha$ -hemolisina codificados por plasmídios e cromossomos (Felmlee *et al.*, 1985).

Muitas cópias do determinante *hly* têm sido identificadas nos cromossomos de *E. coli* uropatogênicas isoladas. Na *E. coli* 536, dois determinantes *hly* estão localizados em grandes “ilhas de patogenicidade” (Pai) de 70kb e 190kb respectivamente (Hacher *et al.*, 1992). Curiosamente, vários determinantes da  $\alpha$ -hemolisina em cromossomos de *E. coli* uropatogênicas, podem fazer parte de grandes “blocos de genes de virulência”, isto é, eles podem estar fisicamente ligados a outros genes envolvidos em virulência, como os genes *prf*, que codificam fimbrias relacionadas a fimbria P ou aos genes que codificam o fator necrosante citotóxico tipo 1 (CNF 1) (Falbo *et al.*, 1992).

Gray *et al.* (1986) demonstraram que a  $\alpha$ -hemolisina é secretada diretamente através da membrana interna e externa da bactéria *E. coli*, sem acúmulo no espaço periplasmático. Três proteínas, designadas HlyB, HlyD e TolC, têm sido identificadas como sendo essenciais para o transporte da  $\alpha$ -hemolisina para o meio de cultivo (Wagner *et al.*, 1983; Wandesman & Delepelaire, 1990). As proteínas HlyB e HlyD foram localizadas na membrana interna de *E. coli* mas, em alguns experimentos, estas proteínas aparecem em pequenas quantidades em frações da membrana externa (Mackman *et al.*, 1985). A proteína TolC, de 52kDa, é codificada por um gene cromossômico não localizado no grupo de genes *hly*, e encontra-se na membrana externa da bactéria (Wandesman & Delepelaire, 1990). É provável que estas proteínas formem um complexo que atravessa as duas membranas, interna e externa, através de sítios de adesão entre as duas membranas, permitindo a secreção direta da  $\alpha$ -hemolisina no meio. A proteína TolC deve ser necessária para permitir a interação do complexo HlyD/HlyB com a membrana externa. Benz *et al.* (1993) demonstraram que oligômeros de TolC são capazes de formar canais permeáveis a íons, em membranas artificiais de lipídios, sugerindo que a proteína TolC pode agir *in vivo* como canais na membrana externa. Em amostras de *E. coli* TolC negativas, a  $\alpha$ -hemolisina não fica acumulada no espaço periplasmático, mas é retida no citoplasma (Wandesman & Delepelaire, 1990).

O sinal que permite a secreção específica da  $\alpha$ -hemolisina pelo complexo HlyB/HlyD/TolC está localizado na porção final carboxi-terminal da HlyA, sugerindo que o transporte da  $\alpha$ -hemolisina é estritamente pós-translacional (Ludwig *et al.*, 1987). Resultados posteriores indicam que a proteína HlyB sozinha é capaz de reconhecer o sinal de secreção carboxi-terminal da HlyA e iniciar a translocação da  $\alpha$ -hemolisina através de ambas as membranas de *E. coli*. Em mutantes HlyB<sup>+</sup>/HlyD<sup>-</sup>, a hemolisina é translocada do envelope da célula, e uma parte da HlyA é exposta na superfície da célula (Orepeza-Welerle *et al.*, 1990). Em

mutantes HlyB<sup>-</sup>/HlyD<sup>-</sup> e HlyB<sup>-</sup>/HlyD<sup>+</sup> a HlyA fica associada apenas à membrana interna, mostrando que a HlyA, por ela mesma, é capaz de interagir com a membrana citoplasmática. A proteína HlyD aparentemente não está envolvida com o reconhecimento do sinal de secreção, mas parece ser necessária para completar a translocação da  $\alpha$ -hemolisina, puxando-a completamente através das membranas e soltando-a da superfície da célula. Esta proteína funcionaria como uma ponte entre a membrana interna e externa, através da qual a HlyA poderia atravessar o espaço periplasmático (Wagner *et al.*, 1983; Oropeza-Wekerle *et al.*, 1990).

O produto do gene *hlyA* tem sido identificado como uma proteína de 107kDa (Welch *et al.*, 1983) que é secretada das células de *E. coli* na fase exponencial de crescimento. A proteína HlyA sozinha é inativa hemoliticamente, e os primeiros trabalhos bioquímicos realizados com esta hemolisina sugeriram que para a toxina estar ativa, a HlyA deveria estar associada com outros componentes não protéicos, particularmente lipídios (Cavalieri *et al.*, 1984; Bohach & Snyder, 1985). Estes dados foram confirmados pela observação de que a atividade hemolítica de  $\alpha$ -hemolisina de *E. coli* poderia ser destruída por ultrassonicação ou tratamento com fosfolipase C, sem alterar a massa molecular da proteína HlyA (Wagner *et al.*, 1988). A labilidade da atividade hemolítica extracelular observada durante condições de cultivo normais não tem sido associada à degradação proteolítica da HlyA (Wagner *et al.*, 1988). Este declínio na atividade parece estar associado à agregação da  $\alpha$ -hemolisina, que é reversível na presença de 6M de uréia (Ostalaza *et al.*, 1991).

Como mencionado anteriormente, a síntese da  $\alpha$ -hemolisina ativa depende dos genes *hlyA* e *hlyC*, e a proteína HlyA é ativada no citoplasma por HlyC antes de ser exportada (Welch *et al.*, 1983). A proteína HlyA inativa (proHlyA) não consegue se ligar à membrana do eritrócito. Entretanto, a proHlyA inativa é capaz de formar poros em bicamada artificial de lipídios, embora em baixa frequência, indicando que

a estrutura para a formação de poro já existe na proHlyA (Ludwig *et al.*, 1996). A ativação da proHlyA mediada por HlyC parece ser necessária para intensificar a ligação da  $\alpha$ -hemolisina com a membrana da célula alvo, mas não para a formação de poro.

Bamforth e Dudgeon (1952) demonstraram que cátions divalente como cálcio, estrôncio ou bário são necessários para a atividade hemolítica de culturas de *E. coli*. Snyder e Zwadyk (1969) mostraram que cálcio e estrôncio, mas não bário e magnésio são necessários para a atividade hemolítica da  $\alpha$ -hemolisina. Outros autores também confirmaram a necessidade do cálcio para a atividade hemolítica (Rennie *et al.*, 1974; Short & Kurtz, 1971). Entretanto, Lovell e Rees (1960) e Smith (1963), não mencionaram a necessidade do uso de cálcio para ativação da  $\alpha$ -hemolisina em meio com extrato alcalino. Van den Bosch *et al.* (1980) também relataram que a adição de cálcio não afeta a atividade hemolítica. Estudos recentes evidenciaram que o  $\text{Ca}^{2+}$  é necessário para facilitar a interação da  $\alpha$ -hemolisina com o eritrócito (Ludwig *et al.*, 1988; Boehm *et al.*, 1990).

A HlyA pertence à família das citolisinas RTX (Repeat in ToXin), que se caracterizam por conter na porção C-terminal da molécula seqüências repetidas de 11 a 13 aminoácidos ricos em glicina (X-Leu-X-Gly-Gly-X-X-Gly-Asn/Asp-Asp). Segundo Ludwig *et al.* (1988), esta seqüência de repetição estaria envolvida na ligação dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  entre a hemolisina e o eritrócito. A ligação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  às unidades de repetição provavelmente resultam na formação e/ou exposição de uma estrutura de HlyA que pode ser necessária para o reconhecimento de um possível receptor na membrana do eritrócito. A formação de poro na membrana da célula alvo independe da seqüência de repetição, bem como de  $\text{Ca}^{2+}$ .  $\alpha$ -Hemolisina com deleções específicas nas seqüências de repetição são incapazes de se ligar a eritrócitos, formando, entretanto, poros em bicamadas de lipídios artificiais (Ludwig

*et al.*, 1988). Além disso, a  $\alpha$ -hemolisina sem deleções gera poros nas membranas artificiais de lipídios na ausência completa de  $\text{Ca}^{2+}$ .

A verdadeira estrutura de formação de poros da  $\alpha$ -hemolisina de *E. coli* é fornecida pela porção amino-terminal da HlyA. Esta região contém três domínios marcadamente hidrofóbicos, designados DI, DII e DIII, embora a HlyA seja uma proteína hidrofílica. A deleção das seqüências hidrofóbicas ou a substituição de aminoácidos não conservativos, que alteram sua hidrofobicidade, destrói inteiramente a atividade hemolítica e a capacidade de formação de poros, sem reduzir, entretanto, a estabilidade e secreção da  $\alpha$ -hemolisina (Ludwig *et al.*, 1991).

Bhakdi *et al.* (1986), através de experimentos com diferentes agentes protetores, demonstraram que 30mM de sacarose (diâmetro de 0,9nm) ou rafinose (diâmetro de 1,3nm), não oferecem prevenção, demonstrando que a  $\alpha$ -hemolisina possivelmente gera poros de 1-3nm de diâmetro na membrana do eritrócito. Benz *et al.* (1989), trabalhando com sistemas de membranas artificiais de lipídios, sugeriram que duas a três moléculas de HlyA seriam necessárias para formar um único poro. Estes autores também demonstraram a instabilidade do poro formado devido, possivelmente, a uma instabilidade dos oligômeros de  $\alpha$ -hemolisina na membrana do eritrócito. Estes dados são consistentes com os resultados de microscopia eletrônica. Membranas alvo tratadas com  $\alpha$ -hemolisina não apresentaram lesões visíveis, que têm sido documentadas em outras citolisinas que formam poros estáveis (Bhakdi & Tranum-Jensen, 1986).

A despeito dos dados descritos anteriormente, alguns autores colocam em dúvida se a atividade citolítica da  $\alpha$ -hemolisina de *E. coli* está baseada na formação de pequenos poros na membrana da célula alvo. Baseados em experimentos utilizando protetores osmóticos, Moayeri e Welch (1994), sugeriram que a  $\alpha$ -hemolisina criaria lesões heterogêneas na membrana do eritrócito, e que estas lesões aumentariam em tamanho com o passar do tempo. Além disso, Ostalaza *et al.* (1993)

relataram que a  $\alpha$ -hemolisina induz o vazamento de grandes vesículas unilamelares, resultado de um efeito parecido com a ação de detergentes, que rompem a bicamada lipídica.

Em 1988, Beutin *et al.* descreveram um outro tipo de hemolisina que, diferentemente da  $\alpha$ -hemolisina, foi encontrada em elevada frequência em amostras de *E. coli* isoladas de crianças com gastroenterite. Esta nova hemolisina foi designada enterohemolisina (EHly), por ter sido encontrada em amostras do sorogrupo O26, pertencentes às *E. coli* enteropatogênicas clássicas (EPEC).

Em contraste com a  $\alpha$  e  $\beta$ -hemolisina, a enterohemolisina é produzida na fase estacionária do crescimento, sendo detectada apenas em placas de ágar-sangue que contenham eritrócitos lavados com tampão PBS, 18h a 24h após a incubação. Não foram observados por Beutin *et al.* (1988) diferenças na especificidade dos eritrócitos em relação à  $\alpha$ -hemolisina. Ambos os tipos de hemolisinas lisaram hemácias humanas, de carneiro, boi, coelho, cobaia, rato e galinha. Estes dados foram confirmados posteriormente por Beutin *et al.* (1989), que testaram diferentes amostras EHly<sup>+</sup> em placas contendo hemácias humanas, de boi, cobaio e coelho. A zona de lise produzida pela enterohemolisina é geralmente menor e mais turva que aquela produzida por  $\alpha$ -e- $\beta$  hemolisina e, a exemplo da  $\beta$ -hemolisina, não é liberada no meio de cultura (Beutin *et al.*, 1988; Beutin, 1991). Entretanto esta hemolisina, embora associada à célula bacteriana, é detectada em extratos de cultura quando tratada por sonicação (Beutin *et al.*, 1990).

Como no caso da  $\alpha$ -hemolisina, extratos sonicados de enterohemolisina são sensíveis à temperatura e inativados pela tripsina. A enterohemolisina tem também sua atividade inibida por 30mM de Dextran 4 e, assim como a  $\alpha$ -hemolisina, lisa os eritrócitos rapidamente após a remoção do protetor osmótico. Substâncias com diâmetro menor que o Dextran 4 (rafinose e sacarose) são incapazes de prevenir a hemólise dos eritrócitos (Beutin *et al.*, 1990). Estes dados sugerem que a

enterohemolisina deva atuar na membrana da célula alvo de modo semelhante à  $\alpha$ -hemolisina. Porém, a enterohemolisina independe de cálcio e não está relacionada serológica nem geneticamente à  $\alpha$ -hemolisina. Amostras produtoras de enterohemolisina dos sorogrupos O26 e O111 estudadas por Beutin *et al.* (1988), não reagiram com anticorpo monoclonal ou com sondas para genes específicos de  $\alpha$ -hemolisina (Beutin *et al.*, 1988; Beutin *et al.*, 1990).

Geneticamente, a EHly também difere da  $\alpha$ -hemolisina, sendo que seus genes foram detectados em fagos temperados de *E. coli* do sorogrupo O26. Beutin *et al.* (1989) relataram que a amostra C3888, pertencente ao sorogrupo O26, continha bacteriófagos que codificavam o fenótipo enterohemolítico. Baseados nestes dados, os autores não concluíram se o gene estrutural da EHly é codificado por bacteriófagos ou se os fagos seriam responsáveis por conter seqüências regulatórias que controlam a expressão do determinante estrutural da EHly no cromossomo. Fagos associados à enterohemolisina não foram isolados de *E. coli* do sorogrupo O111, mas foram encontrados em amostras do sorogrupo O26 diferentes da amostra C3888. Estes fagos, em contraste com bacteriófagos que codificam genes para a toxina VT (Smith *et al.*, 1983), não foram capazes de crescer em linhagens de *E. coli* K-12, ou em outras amostras sorologicamente não relacionadas com o sorogrupo O26 (Beutin *et al.*, 1990).

O determinante associado à produção de enterohemolisina foi designado EHly1. Fagos contendo os genes para a enterohemolisina, designados  $\phi$ C3888, foram clonados em vetores e dois plasmídios recombinantes foram produzidos, denominados pEO19 e pEO21. A transformação utilizando estes plasmídios em linhagem K-12 EHly-negativas levou à expressão da atividade hemolítica (Beutin *et al.*, 1990). O estudo de seqüências de nucleotídeos do recombinante pEO21 mostrou que uma seqüência de 798pb codifica uma proteína de 29,6kDa e estaria associada com a produção de EHly1. Esta proteína foi produzida em grandes quantidades em

amostras de *E. coli* recombinantes contendo o plasmídeo pEO21 (Strocher *et al.*, 1993). Posteriormente, uma segunda enterohemolisina designada EHly2, foi encontrada na amostra C3208 do sorotipo O26:H11 (Beutin *et al.*, 1993). Esta hemolisina não está geneticamente relacionada à seqüência de DNA que codifica a EHly1, e apresenta três regiões de homologia com o DNA do bacteriófago  $\lambda$ .

No primeiro relato da ocorrência de enterohemolisina em amostras de EPEC (Beutin *et al.*, 1988), as amostras estudadas, pertencentes principalmente ao sorogrupo O26, não foram associadas à produção de toxina VT. Entretanto, em trabalhos posteriores, a enterohemolisina passou a ser associada à produção de VT. Beutin *et al.* (1989), estudando um grande número de amostras pertencentes a sorogrupos associados a *E. coli* verotoxigênicas (VTEC) de origem humana, encontraram correlação entre a produção de VT e enterohemolisina (89%). Tais dados levaram estes autores a propor a detecção de enterohemolisina como um método para a rápida detecção de amostras VT. Posteriormente outros autores também observaram esta associação entre a produção de VT e enterohemolisina (Scotland *et al.*, 1990; Beutin & Montenegro, 1990; Pohl *et al.*, 1990; O'Brien *et al.*, 1993).

A presença de enterohemolisina também tem sido relatada em amostras isoladas de animais. Pohl (1991), estudando amostras VTEC isoladas de bovinos com diarreia, relatou que 87% das amostras VT1 produziam também enterohemolisinas. Wieler *et al.* (1992), trabalhando com amostras VTEC envolvidas em diarreia neonatal de bovinos, constataram que, das amostras VT1 positivas, 71% produziam enterohemolisinas. A presença de enterohemolisinas também foi detectada em animais sadios, produtores de toxina VT, que podem servir como reservatório de patógenos humanos (Beutin *et al.*, 1993).

Em experimentos de hibridização DNA-DNA, várias amostras de *E. coli* com o fenótipo enterohemolítico não reagiram com as sondas para EHly1 e EHly2

(Beutin *et al.*, 1993; Stroehler *et al.*, 1993). Estes autores sugeriram que, pelo menos nestas amostras estudadas, a produção de enterohemolisina poderia ser independente das seqüências codificadas por fagos. Pouco tempo depois, Schmidt *et al.* (1994) relataram que o fenótipo enterohemolítico das amostras de *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) O157:H7 é codificado por um plasmídio de 90kb (pO157) e está presente na maioria dos isolados clínicos de O157. A análise da seqüência de um fragmento clonado de 5,4kb do plasmídio pO157 mostrou dois ORF (Open Reading Frames) que têm cerca de 60% de homologia com os genes *hlyC* e *hlyA* do operon da  $\alpha$ -hemolisina (Schmidt *et al.*, 1995). A seqüência analisada de nucleotídeos dos determinantes hemolíticos de EHEC revelaram quatro genes, na ordem EHEC-*hlyC*, EHEC-*hlyA*, EHEC-*hlyB* e EHEC-*hlyD*, que constituem um operon típico de citolisinas RTX (Schmidt *et al.*, 1994, 1995).

A síntese e/ou o transporte da EHEC-*hly* para o sobrenadante de cultura são baixos. Tem sido especulado se o mecanismo de transporte (*hlyB* e *hlyD*) é defectivo ou a expressão do operon é baixa, mas não existem ainda dados conclusivos (Schmidt *et al.*, 1995). Anticorpos para enterohemolisina de O157 foram detectados em amostras de 19 pacientes em 20 avaliados com O157 associadas a síndrome urêmica hemolítica (HUS), mas apenas uma amostra foi EHEC-Hly nos soros controle (Schmidt *et al.*, 1995). Embora esta hemolisina pareça pertencer à mesma classe de citolisinas da  $\alpha$ -hemolisina, sua especificidade frente às células alvo é diferente. Esta função é codificada na porção amino-terminal da molécula, e existe um baixo grau de homologia entre estas duas proteínas (Schmidt *et al.*, 1995).

Sondas de DNA para a EHly1 e EHly2 não hibridizaram com o plasmídio pO157 ou clonaram com o derivado deste (Schmidt *et al.*, 1994), mostrando que estas enterohemolisinas não tem relação com as enterohemolisinas de EHEC. A presença de enterohemolisinas têm sido descrita em amostras isoladas na Alemanha,

Bélgica e Estados Unidos, principalmente por sua relação com amostras produtoras de toxina VT. No Brasil são poucos os dados a respeito das enterohemolisinas. Saridakis *et al.* (1997) trabalhando com 19 amostras pertencentes a sorogrupos de EPEC, detectaram 4 amostras VT-negativas com o fenótipo enterohemolítico, todas pertencentes ao sorogrupo O26. Della Colleta (1997), em um estudo com 273 amostras de *E. coli* de bovinos com diarreia, detectou que 4% destas amostras eram produtoras de enterohemolisinas, sem relatar, entretanto, se estas amostras EHly estariam relacionadas a outros fatores de virulência.

---

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Amostras bacterianas

Foram utilizadas as amostras-padrão C3279, C4169 e C3888 de *E. coli*, produtoras de enterohemolisinas isoladas a partir de fezes de crianças com diarreia na Alemanha, gentilmente cedidas pelo Dr. Lothar Beutin (Instituto Robert Koch, Berlim, Alemanha).

Como padrão de  $\alpha$ -hemolisina foi utilizada a amostra P46, isolada em nosso laboratório, a partir de fezes de suínos com Doença do Edema (PDE). Como controle negativo, em todos experimentos, foi utilizada a amostra B3, gentilmente cedida pelo Dr. Jorge Blanco (Universidade de Campostela, Lugo, Espanha).

### 3.2. Detecção da enterohemolisina

#### 3.2.1. Padronização das hemácias

Para a padronização, foi empregada a técnica descrita por Bohach *et al.* (1988), utilizando hemácias de carneiro lavadas três vezes com tampão PBS 0,05M, PH 7,2, numa concentração aproximada de 1% (v/v). Uma alíquota de 500 $\mu$ L da suspensão a 1% foi adicionada a 3,5 mL de água para lisar os eritrócitos, e a absorbância do sobrenadante foi medida a 545 nm ( $A_{545}$ ), em espectrofotômetro (Beckman DU-65). Quando necessário, foram feitos ajustes no volume da suspensão, de tal maneira que, após a lise, a medida da absorbância em  $A_{545}$  fosse de  $0,30 \pm 0,02$ .

### **3.2.2. Teste em placas**

A detecção de enterohemolisinas em placas foi feita conforme indicação de Beutin *et al.* (1988). As bactérias foram inoculadas em meio de ágar Triptose (Difco) e ágar TSB (Difco). Nos dois meios utilizados, o teste foi realizado com e sem a adição de 10mM CaCl<sub>2</sub> e 5% de sangue de carneiro desfibrinado, não lavado e lavado 3 vezes em tampão PBS 0,05 M, pH 7,2. As placas foram incubadas a 37°C e observadas após 4h e 24h de incubação.

Para o teste em placas utilizando sobrenadante das culturas, foram feitos orifícios de 4,0 mm de diâmetro em meio de ágar-sangue. Os orifícios foram preenchidos com 20 µL de sobrenadante das culturas. As placas foram examinadas após 18h de incubação em estufa a 37°C.

### **3.2.3. Teste em meio líquido**

#### **3.2.3.1. Com culturas bacterianas**

Foi utilizado o método descrito por Beutin *et al.* (1990), com modificações. Após o crescimento em TSB, as culturas bacterianas foram centrifugadas a 8.000g por 5 min (centrífuga Beckman - J2-21) e as células ressuspendidas em PBS 0,05M, PH 7,2, em 1/3 do volume original. Aliquotas de 2 mL das culturas foram então incubadas em igual volume de uma suspensão de 2% de eritrócitos de carneiro previamente lavados com tampão PBS 0,05M, PH 7,2. A mistura foi incubada em banho-maria a 37°C por 2h, e então centrifugada a 2.000 g por 15 min. A atividade hemolítica do sobrenadante foi determinada pela leitura da absorbância a 540 nm.

### **3.2.3.2. Com sobrenadante das culturas**

Alíquotas dos extratos de cultura, obtidas por diferentes métodos de extração, foram utilizadas para testes em meio líquido, seguindo a metodologia descrita por Miyake *et al.* (1988), com modificações. Alíquotas das amostras foram diluídas em PBS 0,05M, pH 7,2 até um volume de 500µL. A cada alíquota foram adicionados 500µL de uma suspensão padronizada de eritrócitos de carneiro (item 3.2.1). As suspensões foram incubadas a 37°C por 1h e então centrifugadas a 3000 g por 5 min e a absorbância do sobrenadante foi medida a 540 nm.

### **3.2.3.3. Em microplaca**

Foi utilizado o método descrito por Bhakdi *et al.* (1986). Alíquotas de 50 µL de sobrenadante das culturas foram diluídas à metade, sucessivamente, em tampão PBS 0,05M, PH 7,2. Uma alíquota de 50µL da suspensão de hemácias de carneiro preparadas como indicado no item 3.2.1 foi adicionada a cada orifício e o título determinado visualmente após 60 min de incubação a 37°C.

## **3.3. Extração da enterohemolisina**

A extração da enterohemolisina foi feita empregando quatro diferentes métodos. Como esta hemolisina não é liberada espontaneamente no meio de cultura, quatro técnicas foram utilizadas, e escolhemos a que apresentou maior eficiência na extração.

### **3.3.1. Extração por ultra-som**

A extração por ultra-som foi feita como indicado por Beutin *et al.* (1990), com modificações. As amostras bacterianas (C3279, C3888, C4169 e B3) foram

cultivadas por 18h a 37°C em TSB, em estufa com agitação (New Brunswick, USA) a 150 rpm. As bactérias foram lavadas com PBS 0,05M, PH 7,2 e ressuspendidas em 10% do volume inicial, rompidas com desintegrador ultra-sônico (VIBRA CELL) durante 10 ciclos de 10 seg. (50% de amplitude), seguido de centrifugação por 20 min a 4°C, a 16.000 g.

### **3.3.2. Extração com mitomicina C**

A extração com mitomicina C foi feita como indicado por Blanco *et al.* (1990), com modificações. As culturas C3888 e B3 foram inoculadas em 5 mL de TSB, com agitação a 150 rpm a 37°C. Após 5h de incubação, foram adicionadas às culturas diferentes concentrações de mitomicina C (0,1 µg/mL; 0,5 µg/mL e 1,0 µg/mL). Após 20h de incubação, as culturas foram centrifugadas a 6.000 g por 15 min.

### **3.3.3. Extração com polimixina B**

A extração foi feita como indicado por Karmali *et al.* (1985), com modificações. A bactéria C3888 foi cultivada em TSB, com agitação a 150 rpm a 37°C por 5h. O cultivo foi dividido em alíquotas, que foram centrifugadas a 8.000 g por 15 min. Os precipitados foram lavados duas vezes em tampão PBS 0,04 M, pH 6,5 e ressuspendidos em 1 mL de solução de polimixina B nas seguintes concentrações: 2,2 mg/mL; 1,1 mg/mL; 0,55 mg/mL; 0,275 mg/mL; 0,137 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,069 mg/mL e 0,0 mg/mL. As suspensões foram incubadas por 1h em banho-maria a 37°C e centrifugadas a 10.000 g por 10 min. Um segundo cultivo, com agitação a 150 rpm por 18h a 37°C, foi submetido ao mesmo tratamento.

### **3.3.4. Extração por criofratura**

Conforme indicado por Tabouret e Rycke (1990), as culturas C3279, C3888, C4169 e B3 foram cultivadas em 20 mL de TSB, com agitação a 150 rpm por 18h a 37°C. Após a incubação, as culturas foram centrifugadas (8.000 g por 20 min) e os sedimentos ressuspensos em 1 mL de PBS 0,05M, PH 7,2. As bactérias foram rompidas através de congelamento (-20°C) e descongelamento (37°C) durante 3 ciclos consecutivos e novamente centrifugadas (10.000g por 10 min). Foram utilizados ciclos curtos de congelamento de 1h e ciclos longos, de 6h a 15h de congelamento.

Em todos os métodos de extração citados acima, os sobrenadantes obtidos foram filtrados (membrana 0,22 µm Millipore) e armazenados a -20°C até o momento do uso. A atividade hemolítica foi determinada em triplicata, através da metodologia descrita nos itens 3.2.3.2. e 3.2.3.3.

## **3.4. Padronização das condições de cultivo da enterohemolisina**

Para determinar as condições ótimas de produção de enterohemolisina, a amostra C3888 foi submetida a diferentes testes de cultivo. Os diferentes cultivos foram centrifugados e sonificados como indicado no item 3.3.1. A atividade hemolítica foi determinada segundo método descrito nos itens 3.2.3.2. e 3.2.3.3.

### **3.4.1. Cultivo em diferentes meios de cultura**

Após a determinação do melhor método para extração da enterohemolisina, a cultura C3888 foi cultivada nos seguintes meios de cultura: TSB (caldo tríptico de soja, Difco); Meio Mínimo (Williams, 1979); BHI (infusão de cérebro e coração, Difco), LB (Meio Luria Bertani) (Miller, 1972), e Meio de Triptose (Difco), com e sem a adição de CaCl<sub>2</sub> (10 mM), com agitação a 150 rpm por 18h a 37°C.

### **3.4.2. Variação do pH do meio**

O pH do meio de cultivo TSB foi ajustado para diferentes valores (5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 8,0; 8,5), utilizando HCl ou NaOH, antes da inoculação da amostra C3888. Como controle, foi utilizado o meio TSB sem ajuste de pH (pH 7,3), com agitação a 150 rpm por 18h a 37°C.

### **3.4.3. Cultivo em meio TSB com diferentes quelantes de ferro**

A amostra bacteriana C3888 foi cultivada a 37°C com agitação a 150 rpm em meio TSB contendo três diferentes quelantes de Ferro: Chelex 100 (100-200 mesh, forma sódica) (Bio Rad), EDDA (ethylenediamine-di (o-hydroxyphenol)acetic acid) (Sigma) (12,5µg/mL) e  $\alpha,\alpha$  Dipiridil (Sigma) (200mM), além de meio TSB normal como controle. Inicialmente, foram utilizados dois erlenmeyers contendo 40 mL de cultura de cada tratamento utilizado, a fim de determinar o crescimento bacteriano em diferentes intervalos de tempo. Este crescimento foi determinado através de leitura da absorbância a 600nm. Após a determinação do melhor tempo de crescimento para cada um dos meios, foi feito outro cultivo, em erlenmeyers contendo 400 mL de meio. A amostra C3888 também foi cultivada em meio TSB e TSB+EDDA em quatro diferentes tempos de incubação: 18h, 20h, 22h e 24h.

---

## **3.5. Purificação da enterohemolisina**

### **3.5.1. Produção da enterohemolisina**

A amostra bacteriana C3888 foi cultivada por 22h a 37°C em TSB contendo EDDA (12,5µg/mL), com agitação a 150 rpm. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 8.000g por 10 min. O precipitado foi lavado com tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,6 e ressuspendido neste mesmo tampão, em 1/25 do volume inicial. As

células foram rompidas com desintegrador ultra-sônico durante 10 ciclos de 10 seg. (50% de amplitude), seguido de centrifugação por 20 min a 4°C, a 16.000 g.

### **3.5.2. Processo de precipitação utilizando sulfato de amônio**

A amostra C3888 foi cultivada e sonicada como indicado no item 3.5.1. O material sonicado foi fracionado em 20% de saturação com sulfato de amônio (Merck), mantido sob agitação a 4°C por 2h e centrifugado a 10.000 g por 10 min. Ao sobrenadante resultante foi adicionado sulfato de amônio para 40% de saturação. O mesmo processo foi repetido para 60% e 80% de saturação. Os precipitados obtidos nestes fracionamentos foram ressuspensos em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,6, dialisados contra o mesmo tampão diversas vezes a 4°C e testados quanto à atividade hemolítica.

### **3.5.3. Cromatografias**

Diversas cromatografias foram realizadas, visando encontrar a melhor seqüência de purificação para a enterohemolisina. A seguir, estão relacionadas as diferentes cromatografias utilizadas durante o processo de purificação.

#### **3.5.3.1. Cromatografias de troca-iônica convencionais**

A hemolisina obtida da precipitação com 60% de sulfato de amônio (21mg/mL), foi cromatografada em resina de troca-iônica DEAE Sepharose Fast-Flow (Pharmacia, 33,7cm x 4cm), equilibrada em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,6. O material aplicado foi eluído com tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,6 e posteriormente eluído com 0,1 M de NaCl no mesmo tampão. Frações de 10 mL foram coletadas e a absorbância analisada em espectrofotômetro a 280 nm. As

frações que apresentaram atividade hemolítica foram concentradas por ultrafiltração (XM-50, Amicon), em Speed Vac ISS110 (Savant) e armazenadas a -20 °C.

Foram utilizadas também as resinas Q-Sepharose Fast-Flow (Pharmacia) e DEAE-Cibacron Blue 3G-A Agarose (Sigma), nas mesmas condições descritas para a resina DEAE Fast-Flow.

### **3.5.3.2. Cromatografias de exclusão molecular convencionais**

A fração com atividade da cromatografia em DEAE Fast-Flow concentrada (0,8mg/mL) foi aplicada em coluna de exclusão molecular Superdex 200 (Pharmacia, 90cm x 1,6cm). A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,6 contendo 0,15M de NaCl e eluída com o mesmo tampão, com um fluxo de 1mL/min. O perfil cromatográfico foi monitorado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 280nm. As frações com atividade hemolítica foram concentradas em Speed Vac e armazenadas a -20°C.

Frações provenientes da cromatografia em resina DEAE Fast-Flow também foram cromatografadas nas resinas de exclusão molecular Sepharose CL-6B e Sephadex G-100, nas mesmas condições descritas para a resina Superdex 200.

### **3.5.3.3. Cromatografias de exclusão molecular no sistema HPLC**

O material concentrado obtido da cromatografia em DEAE Fast-Flow (0,8mg/mL), foi aplicado em coluna de exclusão molecular Superdex 200 (Pharmacia) no sistema HPLC. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,6 contendo 0,15M de NaCl e eluída com o mesmo tampão, com um fluxo de 0,5 mL/min em modo isocrático. O perfil cromatográfico foi monitorado a 280 nm. As frações com atividade hemolítica foram concentradas em Speed Vac e armazenadas a -20°C.

Frações provenientes de cromatografias em resina DEAE Fast-Flow também foram cromatografadas no sistema HPLC nas colunas de exclusão molecular Shimpack Diol (Shimadzu) e Superdex 75 (Pharmacia), nas mesmas condições descritas para a resina Superdex 200.

#### **3.5.3.4. Cromatografia de troca-iônica no sistema HPLC**

Com o objetivo de dessalinizar as frações de EHly provenientes de resinas de gel filtração, alíquotas de 2,5 mL do material cromatografado em resina Superdex 200 foram aplicadas em coluna Sephadex G-25 (P-10, Pharmacia), equilibrada com tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,6. Frações de 3,5 mL/tubo eluídas no mesmo tampão foram coletadas e concentradas em Speed Vac.

Alíquotas do material cromatografado em Sephadex G-25 foram aplicadas em colunas de troca iônica Mono Q HR5/5 no sistema HPLC (Pharmacia). A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,6. Diferentes alíquotas foram aplicadas na coluna, usando diferentes gradientes de sal. Foram utilizados gradientes lineares de 0,0 a 1,0 M; 0,0 a 0,5 M; 0,0 a 0,3 M; 0,0 a 0,2 M e 0,0 a 0,15 M de NaCl no mesmo tampão (30mL), com um fluxo de 0,5 mL/min. As frações coletadas nestas cromatografias (1mL/tubo), foram testadas quanto à atividade hemolítica e armazenadas a -20°C.

---

#### **3.6. Dosagem de proteína**

A concentração de proteínas foi determinada segundo metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando um kit de reagentes da empresa Bio-Rad, contendo a solução de Bradford concentrada (Coomassie Brilliant Blue G-250, 25% de metanol e 50% de ácido fosfórico) e albumina de soro bovino (Bio-Rad) (1,35mg/mL), usada para determinar a curva-padrão.

### **3.7. Análise eletroforética**

#### **3.7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida convencional (PAGE)**

As eletroforeses em gel de poliacrilamida (PAGE) foram realizadas como descrito por Davis (1964), com modificações. Foram utilizados géis de separação de 7,5% e tampões de corrida Tris-glicina 0,05M, pH 8,9 (superior) e Tris-HCl 0,1M, pH 6,8 (inferior). As amostras foram misturadas com tampão de amostra (Tris-glicina 0,05M, pH 8,9; glicerol 50% e azul de bromofenol 0,05%). Nas corridas eletroforéticas foi utilizada amperagem constante de 1,5mA por amostra. Após a corrida, os géis foram corados em solução de prata, segundo metodologia descrita por Blum *et al.* (1987).

#### **3.7.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)**

As corridas em gel de SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) foram realizadas como descrito por Laemmli (1970). Foram utilizados géis de separação de 12% e tampão de corrida contendo Tris-HCl 0,025M, pH 8,3; glicina 0,192M e SDS 0,1%. Para a estimativa do peso molecular da enterohemolisina foram utilizados padrões de peso molecular conhecidos (Pharmacia). ~~Os padrões de peso molecular foram misturados com tampão de amostra (v/v) (Tris-HCl 0,125M, pH 6,8; SDS 4%; glicerol 20%;  $\beta$ -mercaptoetanol 10% e azul de bromofenol 0,02%).~~ As amostras foram misturadas a este mesmo tampão, em condições não-redutoras, utilizando o tampão de amostra sem  $\beta$ -mercaptoetanol. As amostras e padrões foram fervidos por 5 min antes da aplicação no gel. Nas corridas eletroforéticas em cuba de mini-gel (Bio-Rad), foi utilizada amperagem constante de 15mA. Após a corrida, os géis foram corados em solução de prata, segundo metodologia descrita por Blum *et al.* (1987).

### 3.7.3. Coloração dos géis de poliacrilamida

Para a coloração dos géis, foi utilizada a metodologia descrita por Blum *et al.* (1987). Os géis, após a corrida eletroforética, foram colocados por 1h em uma solução fixadora (etanol 50%, ácido acético glacial 12% e formaldeído 0,5ml/l), sendo posteriormente lavados em solução de etanol 50% por 3 vezes sob agitação, em ciclos de 20 min. A seguir os géis foram colocados em uma solução de pré-tratamento (tiosulfato de sódio a 0,02%) por 1 minuto, e lavados três vezes com água destilada. Os géis foram imersos posteriormente em uma solução de impregnação (nitrato de prata a 0,2% e formaldeído 0,075%), com agitação por 20 min, e lavados três vezes com água destilada. A seguir foi utilizada uma solução reveladora (carbonato de sódio 6%, tiosulfato de sódio 0,4% e formaldeído 0,05%), até o surgimento das bandas protéicas. A reação foi interrompida com uma solução de etanol 50% e ácido acético 12%. Após 10 min nesta solução, os géis foram mantidos em uma solução de 5% de ácido acético até a secagem.

### 3.8. Determinação do peso molecular

Uma curva padrão foi construída utilizando os  $R_f$  das proteínas padrões (Pharmacia) e o  $\log_{10}$  de seu peso molecular obtidos em SDS-PAGE. O peso molecular da enterohemolisina foi determinado encontrando seu  $R_f$  na curva padrão e o antilog do peso molecular na ordenada (Bollag & Edelstein, 1991).

### 3.9. Teste de termoestabilidade

Para o teste de termoestabilidade, alíquotas da enterohemolisina foram incubadas a 100°C por 5 min e a 60°C por 20 min. A atividade hemolítica foi testada em microplaca imediatamente após este tratamento.

Para o teste de estabilidade em baixas temperaturas, alíquotas da hemolisina foram mantidas por um período de 4 meses a 4°C e a -20°C, sendo que a atividade destas amostras foi testada periodicamente.

### **3.10. Teste de estabilidade em diferentes soluções**

Para o teste de estabilidade, alíquotas de enterohemolisina diluídas em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,6 foram incubadas a 25°C, 4°C, -20°C e a -70°C com as seguintes soluções: Uréia 1M e 8M (Merck), CaCl<sub>2</sub> 10mM (Merck), MgCl<sub>2</sub> 10mM (Merck), sacarose 50mM (Merck), PMSF 0,5M, 1,0M e 5,0M (Phenylmethyl Sulfonyl fluoride, Sigma), ditiotretitol 100mM (Sigma), glicerol 10%, EDTA 10mM (ethylenediaminetetraacetic acid, Sigma), EGTA 10mM (ethylene Glycol-bis(β-aminoethyl Ether, Sigma) e aprotinina 100U/mL (Bayer).

Estes testes também foram realizados com alíquotas diluídas em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,6 contendo 0,3M de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, tampão fosfato 0,01M, pH 7,2 e tampão fosfato acrescido de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### **3.11. Testes Sorológicos**

#### **3.11.1. Obtenção de antissoro**

Inicialmente, para a produção de antissoro, dois coelhos albinos foram inoculados por via intramuscular com doses de 100µg de enterohemolisina semi-purificada em coluna DEAE Fast-Flow, emulsionada em adjuvante completo de Freund. Após 30 e 60 dias, os coelhos foram reinoculados por via intradérmica com a mesma concentração de hemolisina emulsionada em adjuvante incompleto de Freund. Após 20 dias das inoculações feitas em adjuvante incompleto, foram feitas sangrias para os testes de soroneutralização.

Em uma fase posterior, para a produção de antissoro, dois coelhos albinos adultos foram inoculados com doses de 100µg da enterohemolisina, semi-purificada em coluna convencional de gel filtração Superdex 200 (Pharmacia). Um dos coelhos foi inoculado com a toxina emulsionada em adjuvante incompleto de Freund, através de injeções intradérmicas, segundo a metodologia descrita por Gray *et al.* (1995). Após 10, 21 e 42 dias, os coelhos foram reinoculados com a hemolisina emulsionada neste mesmo adjuvante.

O segundo coelho foi inoculado como descrito por Strocher *et al.* (1993). A EHly foi emulsionada com adjuvante completo de Freund, e aplicada por via intramuscular. No segundo dia foi feita nova inoculação utilizando adjuvante completo. No terceiro, décimo e décimo oitavo dia, o coelho foi inoculado com a toxina emulsionada em adjuvante incompleto. Após seis semanas desta última inoculação, foi dado um reforço com adjuvante completo.

### **3.11.2. Cromatografia em resina Sepharose Proteína A**

Os soros pré- e pós-imunização do coelho inoculado por via intramuscular foram utilizados nas cromatografias em coluna Sepharose Proteína A (Pharmacia), visando separar as IgGs do restante do soro. Foi utilizada a mesma seqüência de purificação para os dois soros. A coluna foi equilibrada com tampão fosfato 0,1M, pH 8,0. Uma alíquota de 1,5 mL do soro foi adicionada à resina, e a mistura resina+soro mantida sob agitação suave por 30 min à temperatura ambiente. A coluna foi eluída novamente com tampão fosfato 0,1M, pH 8,0. O material que não aderiu à coluna, designado eluato livre, foi reservado e utilizado posteriormente no teste de neutralização. A seguir, foi adicionado tampão glicina-HCl 0,1 M, pH 2,8 e frações de 5mL/tubo foram coletadas em banho de gelo. A estes tubos foram adicionadas alíquotas de 500µL de Tampão Tris-HCl 1M, pH 8,0, para neutralizar o baixo pH do tampão glicina. Foi feita a leitura de absorbância a 280 nm. Os tubos com leitura superior a 0,1 foram reunidos e dialisados contra PBS 0,05M, PH 7,2.

### **3.11.3. Testes de soroneutralização**

Para os testes de neutralização, os soros obtidos bem como os soros pré-  
imunes dos coelhos, foram descomplementados através de aquecimento a 56°C por  
30 min.

Aliquotas de 50 µL dos diferentes soros a serem testados foram diluídas na  
razão 2, sucessivamente, em tampão PBS 0,05M, pH 7,2. O mesmo volume da EHly  
foi adicionado a cada orifício das microplacas. As placas foram submetidas a dois  
tempos de incubação diferentes: a 37°C por 1h e a 37°C por 1h seguido de  
incubação a 4°C por 18h. A atividade da EHly foi testada pela adição de 100 µL de  
suspensão de eritrócitos de carneiro lavados e padronizados a cada orifício das  
microplacas, que foram posteriormente incubadas a 37°C por 1h.

Foi considerado como título da soroneutralização a maior diluição do soro  
necessária para a completa neutralização da atividade enterohemolítica.

### **3.12. Teste de hemólise com diferentes hemácias**

O teste de atividade enterohemolítica também foi realizado com hemácias de  
cobaio, cavalo, boi, galinha, coelho e com hemácias humanas dos grupos A, B e O,  
segundo metodologia descrita no item 3.2.3.3.

---

### **3.13. Teste de toxicidade *in vitro* em cultura de células**

#### **3.13.1. Preparo da cultura celular**

As células Vero (rim de macaco verde da África), HeLa (carcinoma de útero  
humano), MDBK (rim de boi Madine-Derby), HEp-2 (carcinoma de laringe  
humana), CHO (ovário de hamster chinês), 3T3 (fibroblasto de camundongo) e  
Caco-2 (enterócito humano) mantidas em nitrogênio líquido, foram descongeladas

em banho-maria a 37°C e transferidas para uma garrafa de cultura de células contendo meio MEM (Meio mínimo essencial de Eagle modificado/Cultilab), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB/Cultilab) e 1% de solução de antibióticos contendo penicilina (1000 U/mL; Sigma) e estreptomicina (250 µg/mL; Sigma). Os frascos de cultura foram incubados em estufa a 37°C, por 48h, até a formação do tapete celular. Os frascos contendo células Caco-2 foram incubados por sete dias, aproximadamente, até a formação do tapete celular.

Após este período, o meio foi descartado, sendo adicionado à cultura celular uma solução de ATV (associação Tripsina-Versene/Cultilab) para o descolamento do tapete. As células foram ressuspensas no meio MEM, acrescido de 10% de SFB e 1% de antibióticos, para um número estimado de  $2,5 \times 10^5$  células/mL. A suspensão de células foi distribuída em microplacas de 96 cavidades (COSTAR), em um volume de 100 µL por cavidade. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24h. A cultura de células Caco-2 foi distribuída em placa com 24 cavidades (COSTAR), em um volume de 1mL por cavidade. A placa foi incubada por 7 dias a 37°C em atmosfera de CO<sub>2</sub>.

### **3.13.2. Realização do teste**

O meio de cultura das placas com as células Vero, HeLa, MDBK, 3T3, CHO e HEp-2 foi removido, e alíquotas de 100 µL do meio (MEM) com 2% de SFB e gentamicina (50µg/mL) foram adicionadas às placas. Alíquotas da enterohemolisina semi-purificada na colunas DEAE Fast-Flow e Superdex 200 foram adicionadas em duplicata, em diluições seriadas na razão dois. Na placa contendo células Caco-2, o meio de cultura foi removido e alíquotas de 1mL foram adicionadas à placa.

As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, e a leitura dos resultados foi feita 24, 48 e 72h após a incubação, com o auxílio de um microscópio invertido (Axiovert-Zeiss).

### **3.14. Teste de patogenicidade *in vivo***

#### **3.14.1. Letalidade em camundongos**

Para o teste de letalidade, foi utilizada a enterohemolisina semi-purificada em coluna DEAE, na concentração de 100µg/animal. Foram utilizados camundongos da raça BALB/c (5 animais/grupo) com peso entre 25-30 g, através de injeções intravenosas (150µL/animal) com seringas de insulina. O teste também foi realizado com camundongos da raça SWISS (5 animais/grupo), com peso entre 25-30g, através de injeções intraperitoniais e intravenosas, utilizando a mesma concentração e volume da toxina. Como controle, grupos de animais foram injetados com a hemolisina aquecida por 5 min a 100°C. Os camundongos foram mantidos em temperatura ambiente e observados diariamente durante 7 dias.

#### **3.14.2. Teste em camundongos recém-nascidos**

Uma alíquota de 0,01mL de uma solução a 2% de Azul de Evans (Sigma), foi adicionada a 0,5 mL do material sonificado, e 0,1 mL desta mistura foi administrada por via intragástrica a camundongos com 4 dias (peso entre 1,9 e 2,3g). Um grupo de camundongos foi mantido à temperatura ambiente por 3h e o outro por 18h. Os animais foram sacrificados com éter, e o grau de acúmulo de fluido intestinal determinado pela taxa de peso do intestino dividido pelo peso da carcaça. Pelos critérios propostos por Dean *et al.* (1972), foram considerados positivos os valores superiores a 0,09.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Detecção da enterohemolisina

#### 4.1.1. Teste em placas

Nos ensaios utilizando placas de ágar-sangue, foram inoculadas amostras padrão produtoras de enterohemolisina (C3279, C3888 e C4169), além de controle negativo e padrão para  $\alpha$ -hemolisina (B3 e P46, respectivamente).

A presença de halo começou a evidenciar-se na amostra P46 após 4h de incubação, enquanto as amostras padrão de enterohemolisina só apresentaram halo de hemólise após 18h de incubação. Este padrão de hemólise foi o mesmo no cultivo em TSA e em ágar Triptose (Tabela 1).

**Tabela 1.** Comparação do padrão hemolítico de amostras produtoras de  $\alpha$ -hemolisina e enterohemolisina

Amostras	TSA				Triptose			
	hemácias lavadas		hemácias não-lavadas		hemácias lavadas		hemácias não-lavadas	
	4h <sup>a</sup>	24h	4h	24h	4h	24h	4h	24h
<b>C3279</b>	-	+	-	-	-	+	-	-
<b>C3888</b>	-	+	-	-	-	+	-	-
<b>C4169</b>	-	+	-	-	-	+	-	-
<b>B3</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>P46</b>	+	+	+	+	+	+	+	+

a. Tempo de incubação.

Os halos das amostras enterohemolisina-positivas foram menores quando comparados à  $\alpha$ -hemolisina, e só foram visualizados nos meios contendo eritrócitos de carneiro lavados. A adição de  $\text{CaCl}_2$  aos meios não alterou os padrões de hemólise em nenhuma das culturas utilizadas.

O teste em placas utilizando sobrenadante de culturas não apresentou bons resultados. Os halos de hemólise foram muito fracos, de difícil visualização.

#### **4.1.2. Teste em meio líquido**

Embora o uso de culturas bacterianas em meio líquido para detectar a presença de enterohemolisina (item 3.2.3.1.) tenha sido repetido 3 vezes, utilizando as mesmas amostras usadas por Beutin *et al.* (1990), não foi detectada atividade hemolítica em nenhum dos testes realizados.

Os demais testes realizados em meio líquido (descritos nos itens 3.2.3.2 e 3.2.3.3), apresentaram resultados satisfatórios. A técnica em tubo, utilizando extratos de cultura, foi muito eficiente, possibilitando a quantificação da hemólise através de leitura em espectrofotômetro. O teste em microplaca, embora subjetivo, mostrou-se bastante prático, uma vez que despence pouco material e é de rápida realização.

Assim, nos métodos subseqüentes de extração, estas duas técnicas foram utilizadas para a detecção da atividade hemolítica.

### **4.2. Extração da enterohemolisina**

#### **4.2.1. Extração por ultra-som**

Os resultados utilizando a sonicação (Tabela 2) mostram que esta técnica foi eficiente na liberação da enterohemolisina. As amostras padrão testadas mostraram

atividade hemolítica semelhante, tanto no teste em tubo como no teste em microplaca.

**Tabela 2.** Atividade hemolítica das amostras padrão de enterohemolisina

Diluição	Amostras			
	C3279	C3888	C4169	B3 <sup>a</sup>
Puro	2,100 <sup>b</sup>	2,119	2,223	0,047
1:2	1,648	1,741	1,708	0,019
1:4	1,304	1,220	1,227	0,023
Microplaca	1:8 <sup>c</sup>	1:8	1:8	0

a. Controle negativo para produção de enterohemolisina.

b. Média de 3 leituras, expressa em absorbância a 540 nm.

c. Última diluição que ainda apresenta 50% de hemólise.

#### 4.2.2. Extração com mitomicina C

**Tabela 3.** Atividade hemolítica da amostra C3888 tratada com mitomicina C

Amostras	mitomicina C (µg/mL)		
	0.1	0.5	1.0
C3888	0.049 <sup>a</sup>	0.788	1.003
B3 <sup>b</sup>	0.086	0.101	0.066

a. Média de 3 leituras, expressa em absorbância a 540 nm.

b. Controle negativo para produção de enterohemolisina.

A melhor concentração de mitomicina C para a liberação de enterohemolisina foi de 1,0µg/mL (Tabela 3). O teste com mitomicina C também foi realizado com as outras culturas-padrão e em microplaca, apresentando os mesmos resultados observados com a cultura C3888.

#### 4.2.3. Extração com polimixina B

Os resultados deste teste mostraram que nenhuma das concentrações de polimixina B empregada, tanto no cultivo de 5h como no de 18h, foram eficientes para provocar a liberação de enterohemolisina (Tabela 4). Extração utilizando polimixina B também foi realizada com a amostra C3279, com resultados negativos.

**Tabela 4.** Atividade hemolítica da amostra C3888 tratada com polimixina B

Incubação	Concentração de polimixina B (mg/mL)							
	0.000	0.069	0.100	0.137	0.275	0.550	1.100	2.200
5h	0.035 <sup>a</sup>	0.032	0.026	0.044	0.041	0.033	0.025	0.048
18h	0.049	0.030	0.027	0.029	0.032	0.032	0.040	0.031

a. Média de 3 leituras, expressa em absorbância a 540 nm.

#### 4.2.4. Extração por criofratura

Os resultados obtidos utilizando a técnica de congelamento e descongelamento foram variáveis (Tabela 5). Quando utilizamos 3 ciclos curtos de congelamento e descongelamento, de 1h cada um, não observamos a liberação da enterohemolisina. Ao empregarmos ciclos de 6 a 15h de congelamento, e descongelamento por 1h, verificamos a liberação da hemolisina, tanto em ensaio em tubo quanto em microplaca.

**Tabela 5.** Atividade hemolítica das amostras tratadas por criofratura

Ciclos	Amostras			
	C3888	C3279	C4169	B3 <sup>a</sup>
Curto	0,034 <sup>b</sup>	0,022	0,037	0,035
Longo	1,452	1,479	1,508	0,040

a. Controle negativo para produção de enterohemolisina.

b. Média de 3 leituras, expressa em absorbância a 540 nm.

Concluimos que o método mais indicado para extração da enterohemolisina é a sonicação. Esta técnica foi empregada nos experimentos posteriores realizados com as amostras produtoras de enterohemolisina.

#### **4.3. Cultivo em diferentes meios de cultura**

Os resultados da atividade hemolítica da amostra C3888, cultivada em diferentes meios de cultura, mostraram, com exceção do cultivo em Meio Mínimo, não haver variações em função dos diferentes meios empregados (Tabela 6). O uso de CaCl<sub>2</sub> também não alterou os níveis de enterohemolisina produzidos.

O meio TSB foi o meio escolhido para a produção da enterohemolisina em testes posteriores e para os processos de purificação.

#### **4.4. Variação do pH do meio de cultura**

Não detectamos variações significativas na atividade hemolítica dos cultivos utilizando meio TSB com diferentes valores de pH.

**Tabela 6. Atividade hemolítica da amostra C3888 cultivada em diferentes meios de cultura**

Meios	Diluições				
	Puro	1:2 <sup>a</sup>	1:4	1:8	Micro <sup>b</sup>
<b>TSB</b>	1,94 <sup>c</sup>	1,57	1,47	1,19	1:8 <sup>d</sup>
<b><u>TSB</u></b> <sup>e</sup>	1,85	1,67	1,57	1,36	1:8
<b>BHI</b>	1,73	1,55	1,43	1,51	1:8
<b><u>BHI</u></b>	1,87	1,73	1,56	1,35	1:8
<b>M.M.</b>	1,32	1,37	0,97	0,57	1:2
<b><u>M.M.</u></b>	1,37	1,31	0,92	0,51	1:2
<b>Triptose</b>	1,95	1,93	1,62	1,37	1:8
<b><u>Triptose</u></b>	1,99	1,73	1,63	1,35	1:8
<b>LB</b>	1,95	1,97	1,72	1,24	1:8
<b><u>LB</u></b>	1,96	1,87	1,72	1,40	1:8

a. Diluição da cultura tratada com sonicação.

b. Teste em microplaca.

c. Leitura da absorbância a 540nm.

d. Última diluição que apresenta 50% de hemólise.

e. Com adição de CaCl<sub>2</sub>.

#### **4.5. Cultivo com diferentes quelantes de ferro**

Nos primeiros testes utilizando quelantes de ferro, verificamos que no tempo normalmente usado de 18h para o crescimento bacteriano, os cultivos contendo Chelex e Dipiridil apresentavam um crescimento muito menor, quando comparados

ao meio TSB controle. Afim de igualar os crescimentos, os diferentes meios foram cultivados durante 40h e, em diferentes intervalos de tempo, alíquotas deste material foram retiradas e a absorbância lida em espectrofotômetro.

Na tabela 7 podemos observar que o meio contendo EDDA mostra um crescimento próximo ao do controle no mesmo tempo de cultivo. Entretanto, nos meios tratados com Chelex e contendo Dipiridil, o crescimento foi bem menor, mesmo com o cultivo mais prolongado.

No teste de atividade (Tabela 7), verificamos que o meio contendo EDDA aumentou um pouco a atividade hemolítica. Os meios com os outros quelantes inibiram o crescimento bacteriano e foram ineficazes em induzir a produção de enterohemolisina.

**Tabela 7.** Crescimento bacteriano e atividade hemolítica da amostra C3888 em meio TSB com diferentes quelantes de ferro

Tempo (h)	Meios de cultura			
	TSB	TSB+EDDA	TSB+Dipiridil	TSB+Chelex
18	1,74	1,69	1,48	0,47
20	1,75	1,75	1,50	0,50
24	1,83	1,76	1,52	0,49
40	n/d <sup>a</sup>	n/d	1,53	0,50
<b>Atividade<sup>b</sup></b>	1/16 <sup>c</sup>	1/32	1/2	0

a. Leitura não determinada.

b. A atividade foi determinada utilizando alíquotas dos cultivos de 20h.

c. Última diluição que apresentou 50% de hemólise.

#### 4.5.1. Cultivo em meio TSB e TSB+EDDA

Após os testes realizados com quelantes de ferro, verificamos que o meio TSB contendo EDDA aumentou ligeiramente a produção de hemolisina. Com o intuito de aumentar ainda mais esta produção, cultivos em meio TSB e TSB+EDDA foram feitos em diferentes intervalos de tempo.

Podemos observar, na Tabela 8, que o meio TSB acrescido de EDDA, após 22h de cultivo, foi o que apresentou maior atividade hemolítica. Embora os valores obtidos com este meio não sejam muito diferentes dos obtidos no cultivo em TSB sem quelante, passamos a empregar estas condições de cultivo em novos lotes de material preparado para purificação.

**Tabela 8.** Atividade hemolítica do cultivo em meio TSB e TSB+EDDA

Meios	Tempo de incubação (h)				
	15	18	20	22	24
<b>TSB</b>	1/8 <sup>a</sup>	1/16	1/16	1/16	1/16
<b>EDDA</b>	1/16	1/16	1/16	1/32	1/16

<sup>a</sup> Última diluição que apresentou 50% de hemólise.

#### 4.6. Purificação da enterohemolisina

##### 4.6.1. Precipitação com sulfato de amônio

Nos testes de precipitação em diferentes saturações de sulfato de amônio, verificamos que a atividade hemolítica se encontra no material submetido a 60% de saturação (Tabela 9).

**Tabela 9.** Atividade hemolítica da amostra C3888 sob diferentes saturações de sulfato de amônio

Diluição <sup>a</sup>	Saturação com sulfato de amônio (%)				
	0	20	40	60	80
<b>Puro</b>	1,205 <sup>b</sup>	0,010	0,011	1,401	0,031
<b>1:2</b>	0,821	0,009	0,010	1,206	0,020
<b>1:4</b>	0,332	0,010	0,010	0,830	0,030
<b>1:8</b>	0,003	0,008	0,001	0,404	0,004
<b>1:16</b>	0,001	0,001	0,000	0,011	0,020
<b>Microplaca</b>	1:8 <sup>c</sup>	0	0	1:16	0

a. Diluição da cultura tratada com sonicação.

b. Média de 3 leituras, expressa em absorbância a 540 nm.

c. Última diluição que apresenta 50% de hemólise.

Nos processos posteriores, o sonicado de cultura foi precipitado inicialmente em 45% de saturação com sulfato de amônio, sendo o sobrenadante resultante precipitado com 60% de saturação, dialisado e empregado nas diferentes cromatografias realizadas.

#### 4.6.2. Cromatografias

##### 4.6.2.1. Cromatografias de troca-iônica

Uma alíquota de 20 mL do material sonicado (21mg/mL), precipitado com 60% de sulfato de amônio, foi aplicado em coluna de DEAE Fast Flow. As frações

que apresentaram atividade (tubos 68 a 74, Figura 1), foram concentradas (XM-50, Amicon), até o volume de 2,5 mL. A atividade hemolítica foi testada em microplaca (item 3.2.3.3), apresentando um título de 1:32. Posteriormente este material foi concentrado em Speed Vac e utilizado nas diferentes cromatografias de exclusão molecular testadas.

Na cromatografias realizadas em resina Q-Sepharose, verificamos que a atividade também se encontra na fração eluída com o tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,6 acrescido de 0,1M de NaCl. Entretanto, constatamos perda da atividade hemolítica, com uma diminuição da atividade enterohemolítica de 1:64 do material aplicado para 1:2 da fração coletada. Na cromatografias realizadas em resina Cibacron, encontramos o mesmo perfil cromatográfico encontrado na resina DEAE Fast-Flow (dados não mostrados).

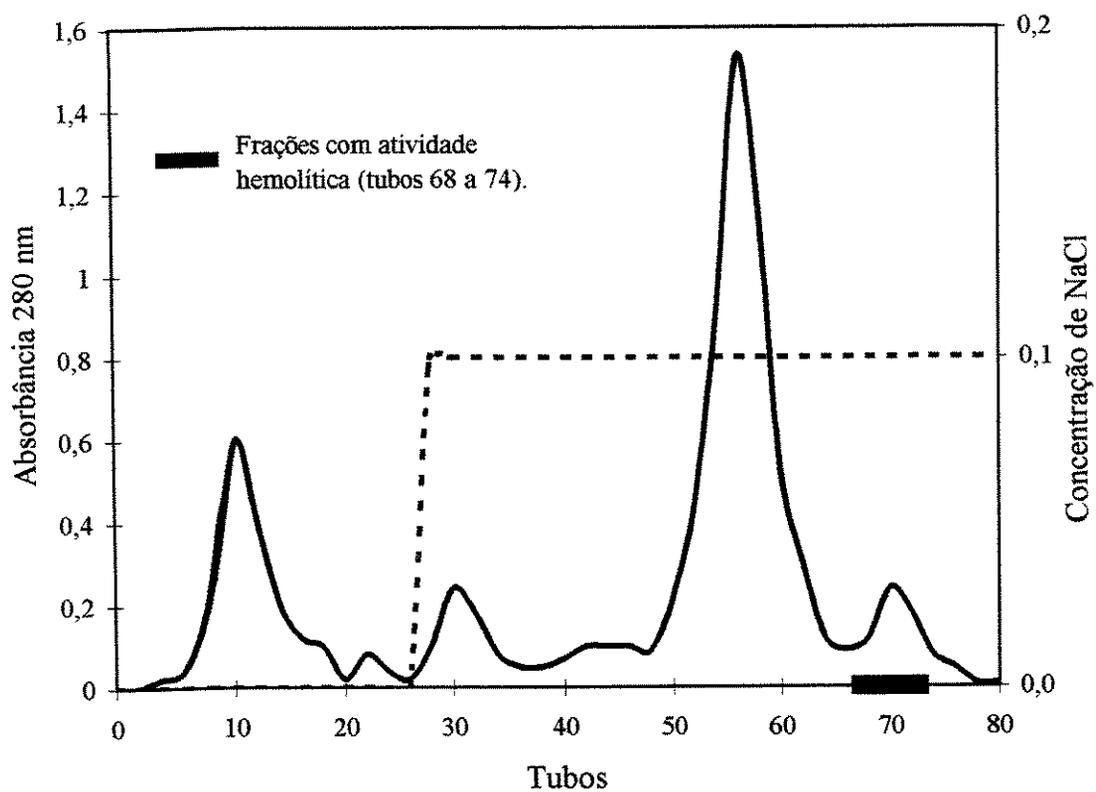
#### **4.6.2.2. Cromatografias de exclusão molecular convencionais**

O material cromatografado em DEAE Fast-Flow, concentrado em Amicon e Speed Vac até o volume de 2,5 mL, foi aplicado na coluna de gel filtração Superdex 200, em uma concentração de 0,81 mg/mL. As frações com atividade hemolítica (tubos 23 e 24, Figura 2), foram concentradas em Speed Vac e armazenadas a -20°C.

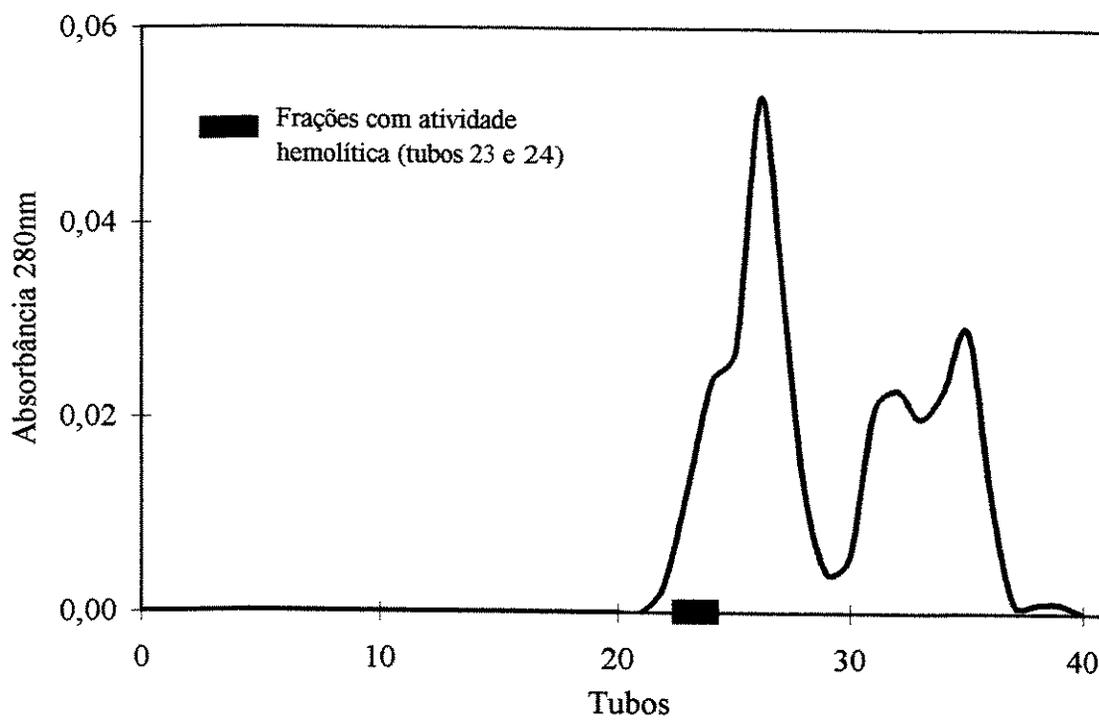
A eletroforese em PAGE mostrou que o padrão de bandas do material cromatografado em resina Sepharose CL-6B e Sephadex G-100 foi muito semelhante ao padrão encontrado na cromatografia em DEAE Fast-Flow (dados não mostrados).

#### **4.6.2.3. Cromatografias de exclusão molecular no sistema HPLC**

O material cromatografado em DEAE Fast-Flow, concentrado em Amicon e Speed Vac para um volume de 2,5 mL, foi aplicado em diferentes colunas de



**Figura 1.** Padrão de eluição da enterohemolisina em coluna de troca iônica DEAE Sepharose Fast-Flow (33,7 cm x 4 cm), com fluxo de 8mL/min em tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,6 (10mL por tubo).



**Figura 2.** Cromatografia de enterohemolisina em coluna de exclusão molecular Superdex 200 (90 cm x 1,6 cm), com fluxo de 1mL/min em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,6 e NaCl 0,15M (2,5mL por tubo).

exclusão molecular, no sistema HPLC, em uma concentração de 0,81 mg/mL, com um fluxo de 0,5mL/min.

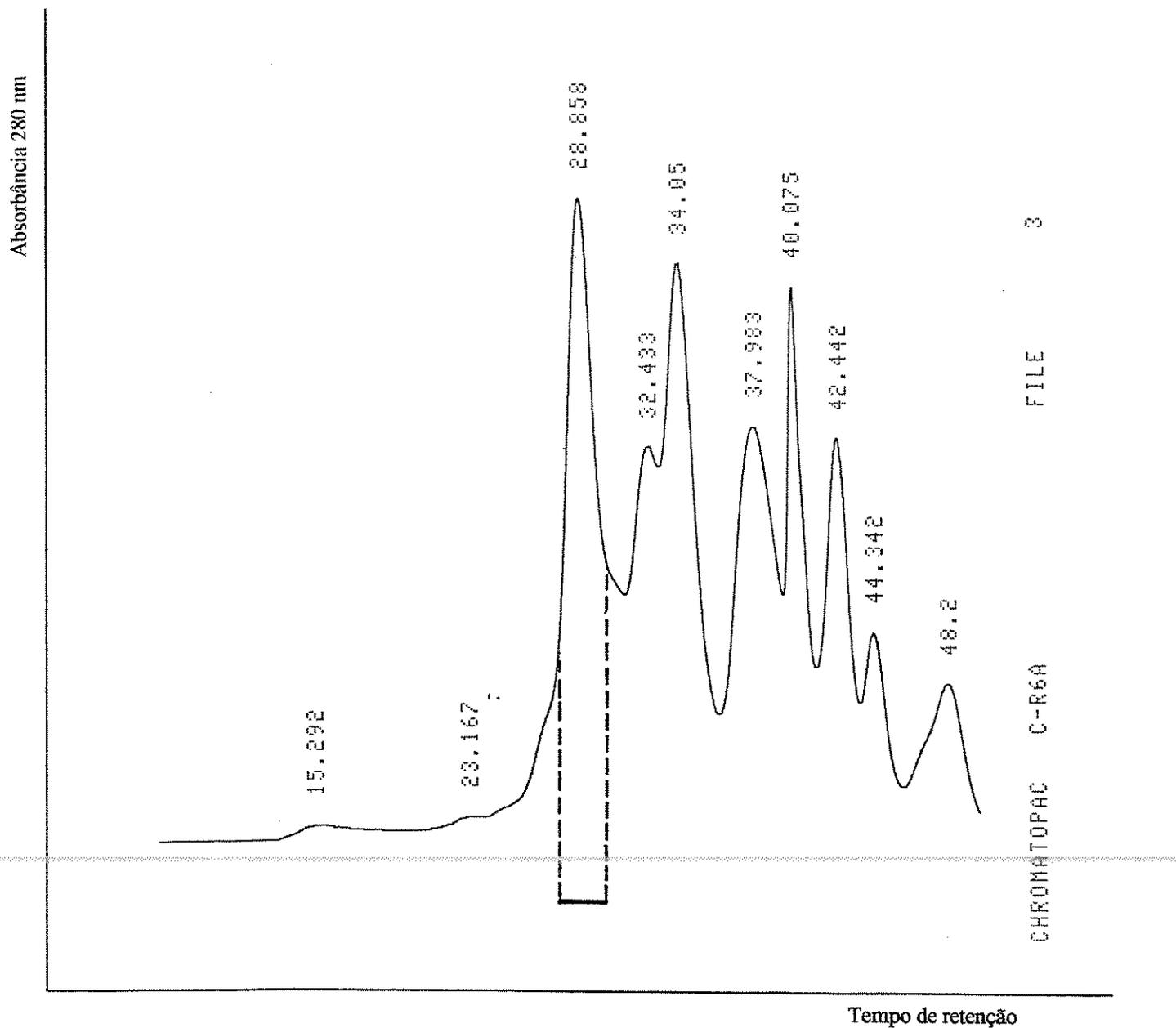
O perfil encontrado nas diferentes cromatografias foi bastante semelhante. Nas cromatografias realizadas em coluna de gel filtração Shimpack Diol, Superdex 200 e Superdex 75, a fração com atividade hemolítica se encontra no primeiro pico de eluição, variando apenas o tempo de retenção. Na coluna Superdex 200, o tempo de retenção foi de 28 min (Figura 3), na resina Superdex 75, de 20 min (Figura 4) e na coluna Shimpack Diol, de 26 min (Figura 5).

O perfil destes diferentes picos em gel de PAGE e SDS-PAGE foi muito semelhante ao encontrado para as frações com atividade da cromatografia em resina Superdex 200 convencional (Figuras 7 e 8).

Para dar continuidade ao processo de purificação, as frações coletadas das cromatografias em resina Superdex 200 foram concentradas em Speed Vac e dessalinizadas em coluna Sephadex G-25, sendo posteriormente utilizadas em cromatografias na resina Mono Q no sistema HPLC.

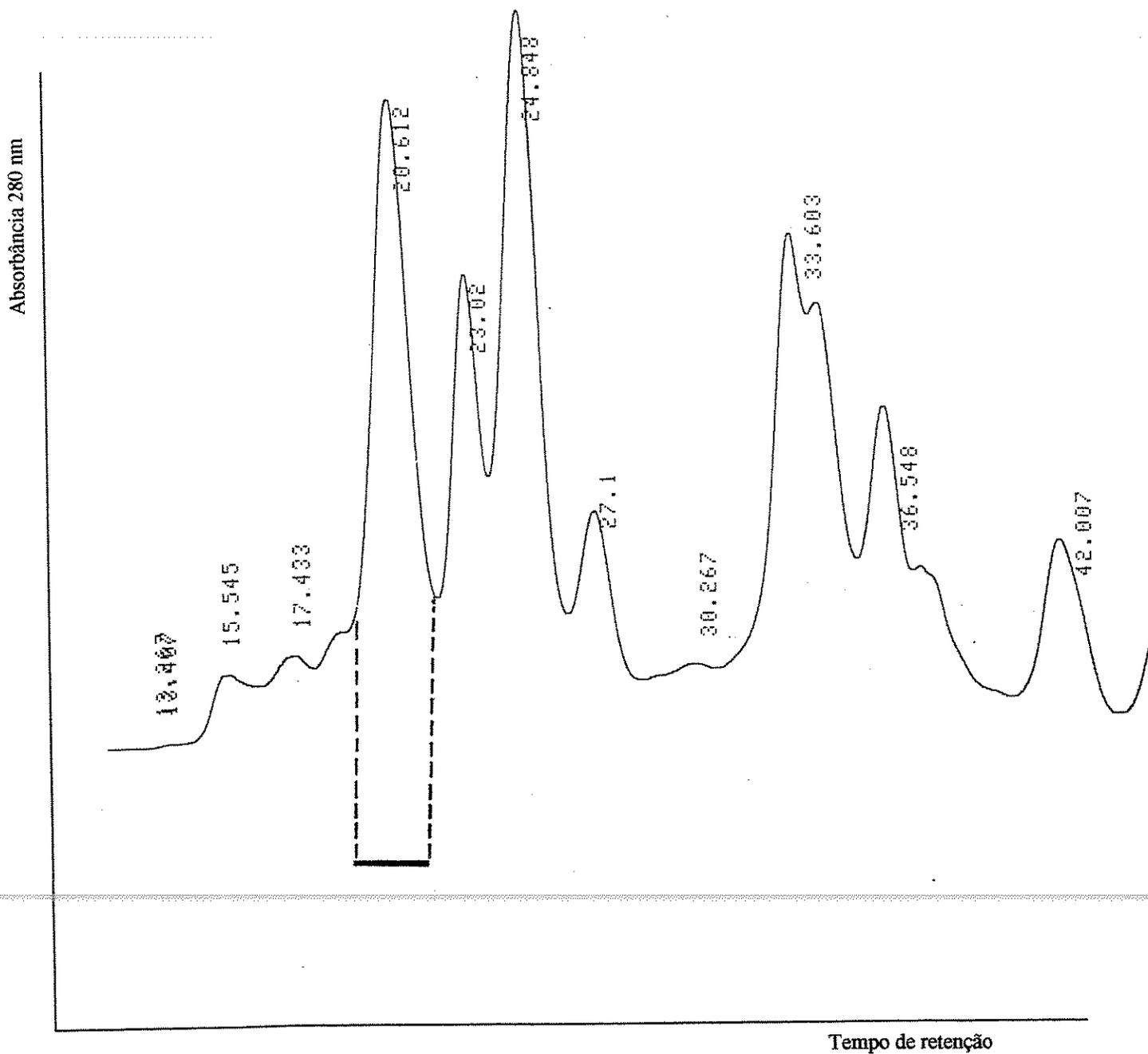
#### **4.6.2.4. Cromatografia em coluna de HPLC Mono Q**

Aliquotas do material cromatografado em resina Superdex 200 e dessalinizadas, foram submetidas a diferentes corridas na coluna Mono Q, utilizando diferentes gradientes de sal e fluxo de 0,5mL/min. O perfil encontrado nas diferentes cromatografias mostrou que, quanto menor a concentração de sal utilizada, melhor é a separação entre os diferentes picos de eluição. Na cromatografia empregando gradiente de 0,0 a 1,0M de NaCl, os picos saíram muito próximos, e a atividade foi detectada nos primeiros e maiores picos de eluição. Nas outras cromatografias, com o decréscimo na concentração de sal, a fração com atividade hemolítica se deslocou para o final da eluição (Figura 6).



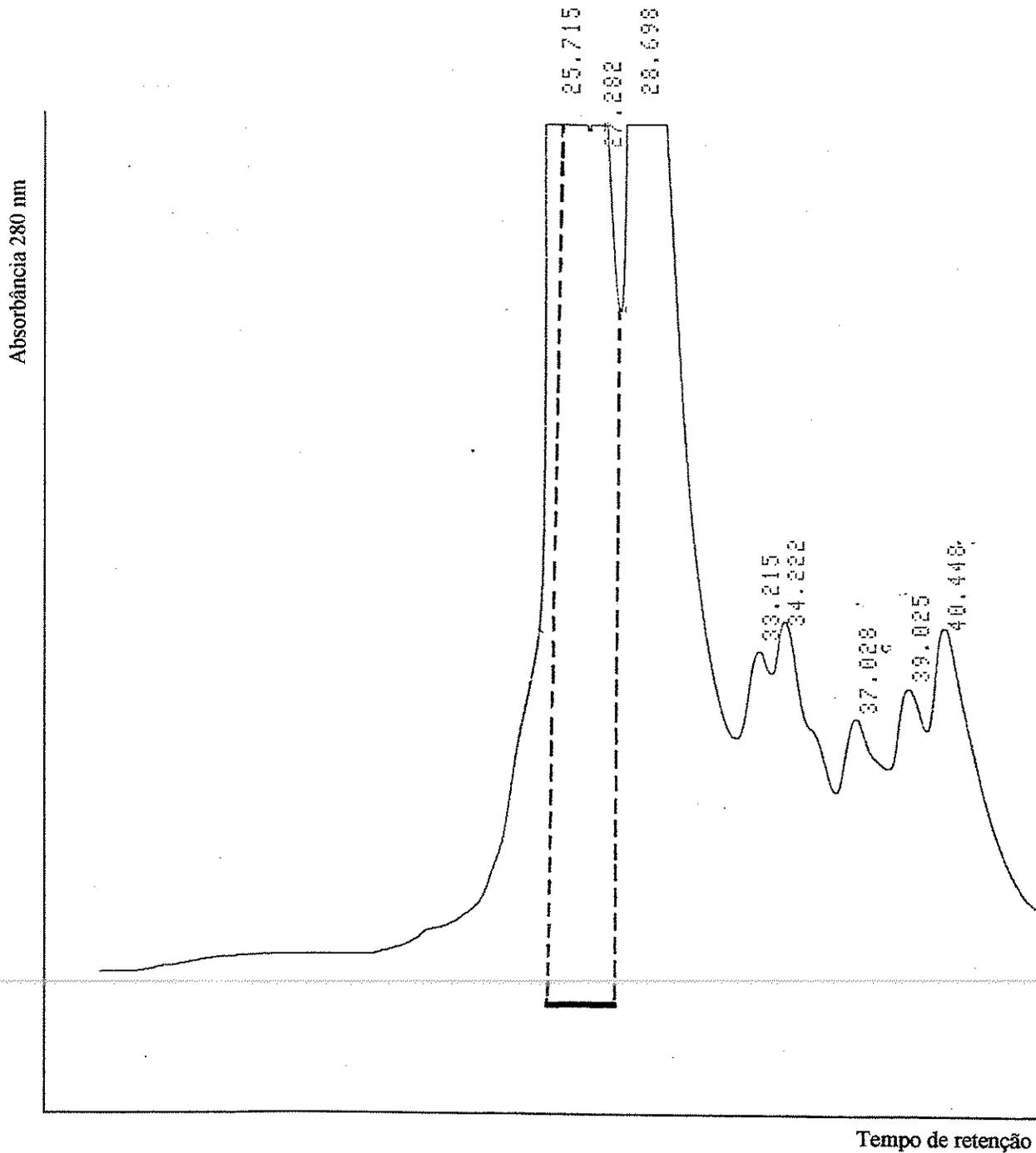
**Figura 3.** Padrão de eluição da enterohemolisina em resina de exclusão molecular Superdex 200, no sistema HPLC, com fluxo de 0,5ml/min, em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,6 contendo NaCl 0,15M (1mL por tubo).

— Atividade hemolítica



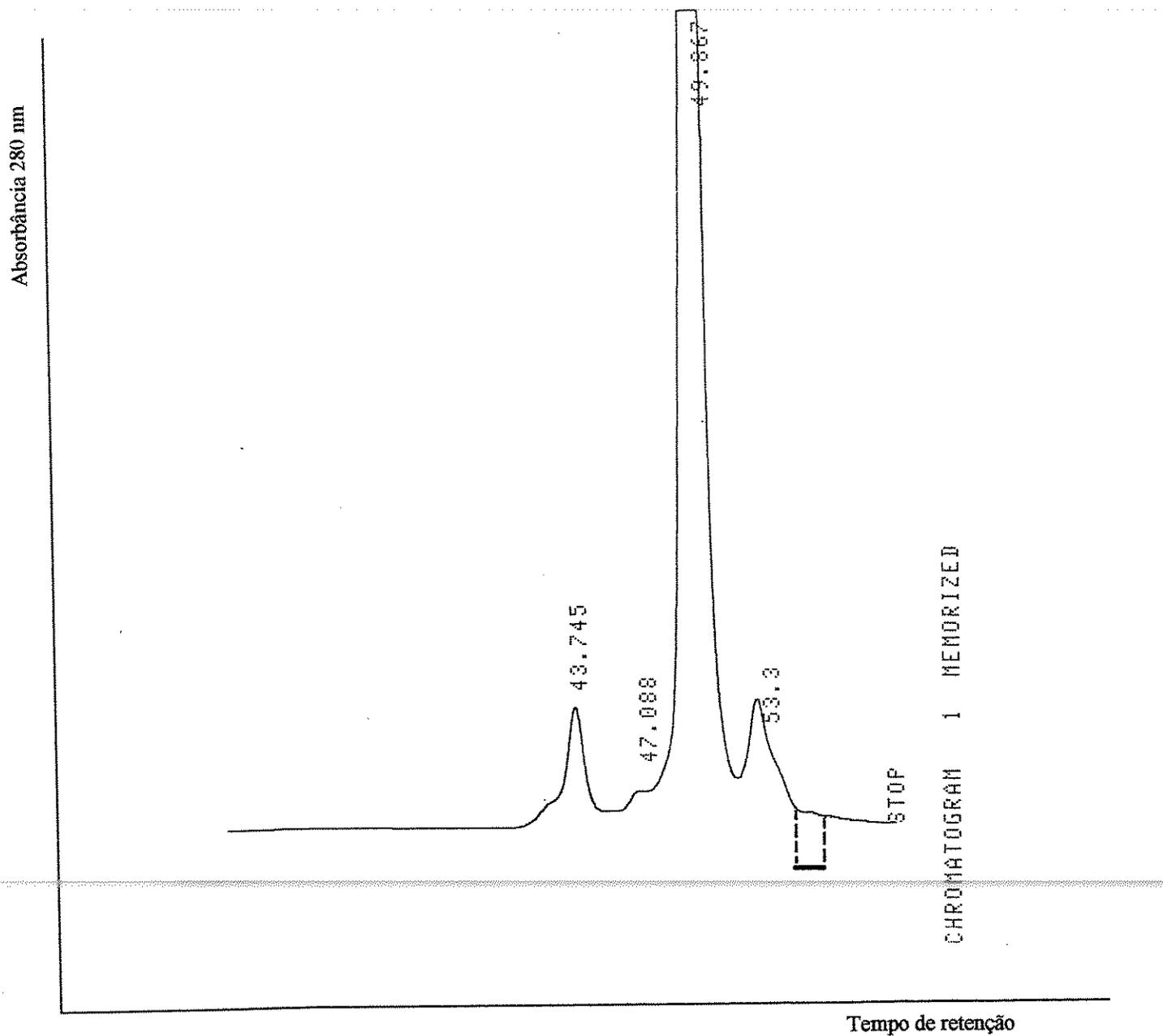
**Figura 4.** Padrão de eluição da enterohemolisina em resina de exclusão molecular Superdex 75, no sistema HPLC, com fluxo de 0,5ml/min, em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,6 contendo NaCl 0,15M (1mL por tubo).

— Atividade hemolítica



**Figura 5.** Padrão de eluição da enterohemolisina em resina de exclusão molecular Shimpack Diol, no sistema HPLC, com fluxo de 0,5ml/min, em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,6 contendo NaCl 0,15M (1mL por tubo).

— Atividade hemolítica



**Figura 6.** Padrão de eluição da enterohemolisina em resina de troca-iônica Mono Q, no sistema HPLC, com fluxo de 0,5ml/min, em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,6 com gradiente de 0,0 a 0,15M de NaCl (1mL por tubo).

— Atividade hemolítica

O perfil de bandas destas diferentes cromatografias foi analisado em eletroforese de SDS-PAGE, sem o redutor  $\beta$ -mercaptoetanol. Em conformidade com o perfil cromatográfico observado, verificamos uma diminuição gradativa no número de bandas protéicas (Figura 10), à medida que diminuiu a concentração de NaCl.

Na cromatografia utilizando gradiente de sal de 0,0 a 0,15M de NaCl, a fração com atividade, em gel de SDS-PAGE (Figura 11), apresentou apenas uma banda protéica.

#### 4.6.3. Determinação do peso molecular

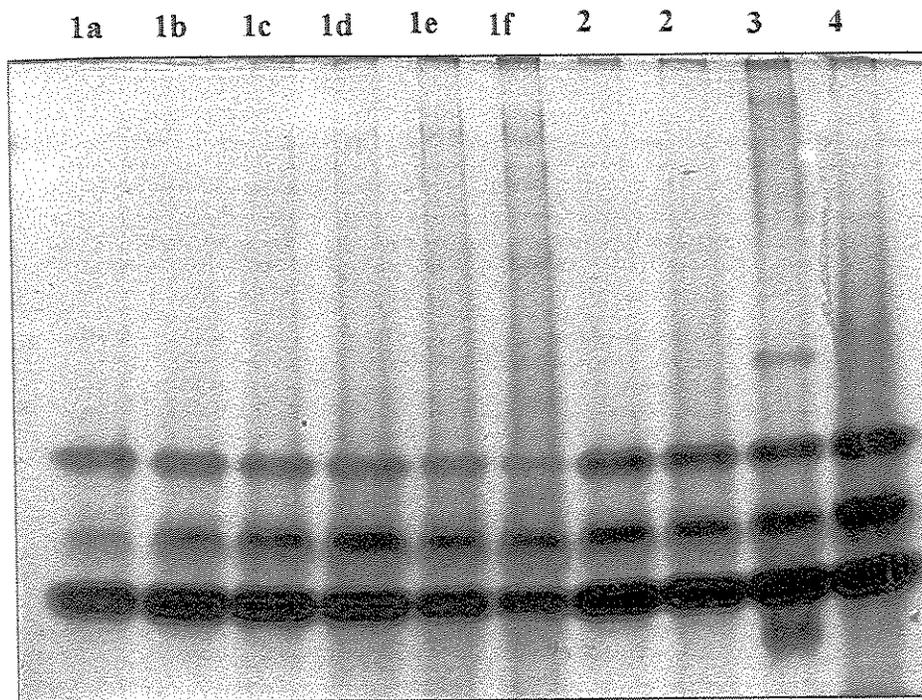
O peso molecular da enterohemolisina purificada foi estimado em 60 kDa, a partir da sua mobilidade eletroforética ( $R_f$ ) em SDS-PAGE, utilizando padrões de baixo peso molecular conhecidos.

**Tabela 10.** Seqüência de purificação da enterohemolisina (EHly)

Frações	Volume (mL)	Total de prot.(mg)	Ativ. Total <sup>a</sup> (UH)	Ativ. Esp. (UH/mg)	Atividade relativa	Recup. (%)
Sonicado <sup>b</sup>	100	1140	$3,2 \times 10^4$	28,07	1	100
Prec	20	421	$2,5 \times 10^4$	59,70	2,12	78,12
DEAE	2,5	2,44	$8,0 \times 10^2$	327,9	11,68	2,5
Sup. 200	1,0	0,23	$1,6 \times 10^2$	695,6	24,78	0,5
Mono Q	0,5	0,007	$0,2 \times 10^2$	2857,0	101,78	0,06

a. A atividade foi determinada misturando-se 100 $\mu$ L de solução de EHly com 100 $\mu$ L de suspensão de eritrócitos de carneiro a 1% em tampão PBS, com incubação por 1h a 37°C. A unidade hemolítica (UH) foi expressa como a recíproca da maior diluição da EHly que apresentou 50% de hemólise.

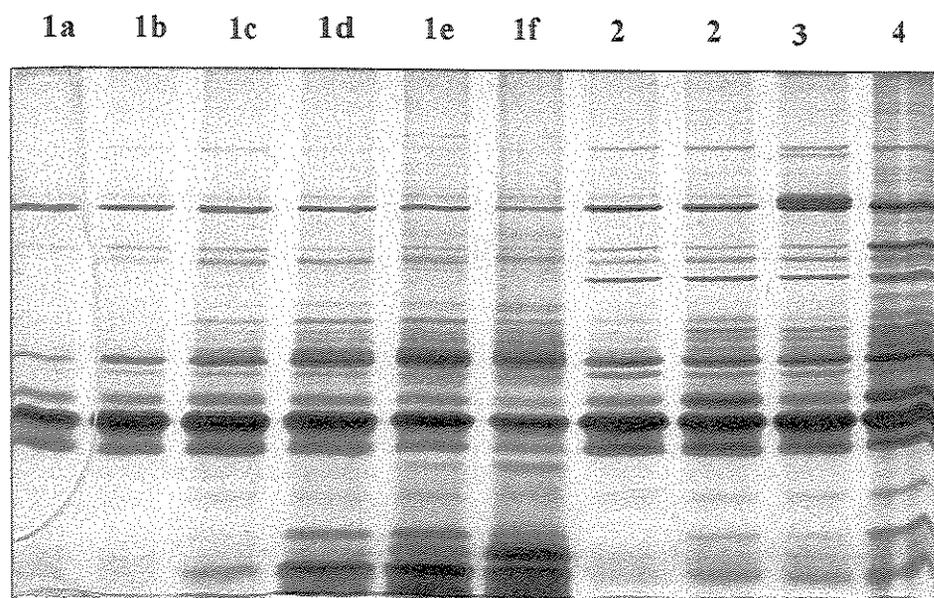
b. Material sonificado a partir de 2500 mL de cultivo em meio TSB com EDDA.



**Figura 7.** Frações de cromatografia em diferentes resinas de exclusão molecular, em gel PAGE

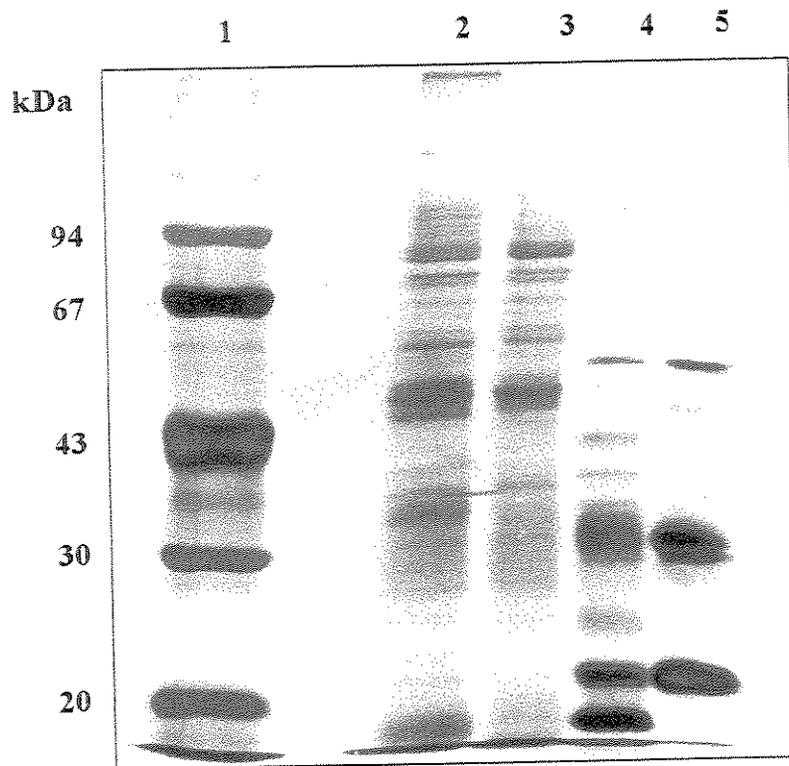
(5 $\mu$ g de proteína/canaleta)

1. Superdex 200 convencional (tubos a até f)
2. Superdex 200 HPLC
3. Shimpack Diol HPLC
4. Superdex 75 HPLC



**Figura 8.** Frações de cromatografia em diferentes resinas de exclusão molecular, em gel SDS-PAGE.  
(5 $\mu$ g de proteína/canaleta)

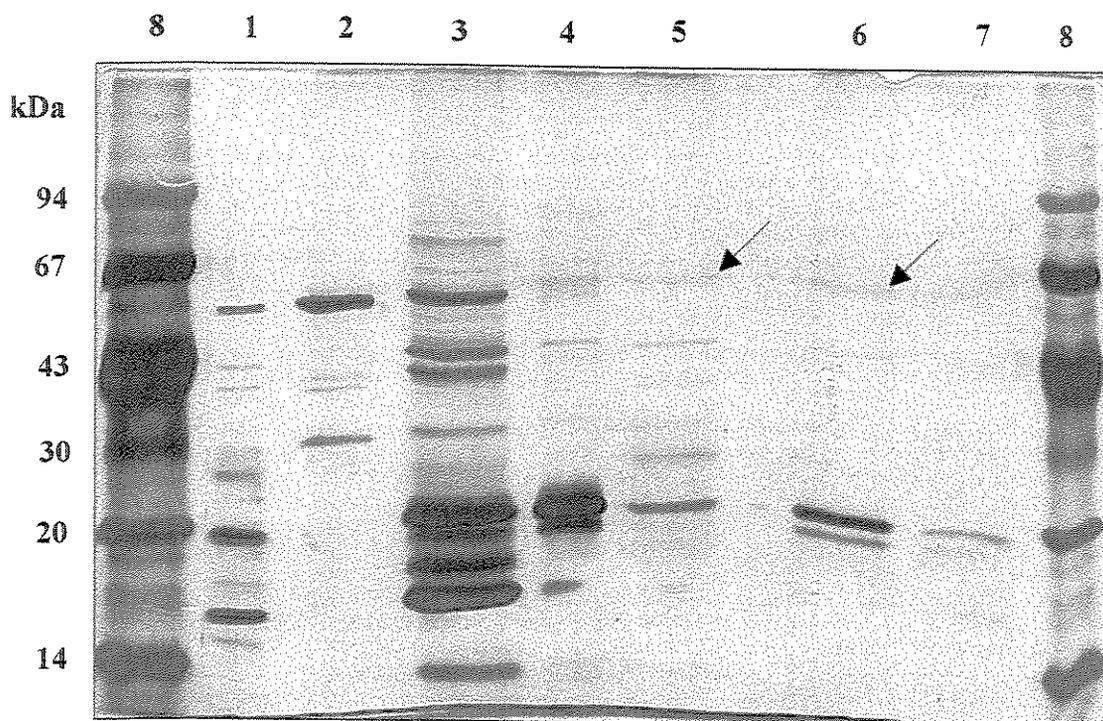
- 
1. Superdex 200 convencional (tubos a até f)
  2. Superdex 200 HPLC
  3. Shimpack Diol HPLC
  4. Superdex 75 HPLC



**Figura 9.** Perfil eletroforético das frações cromatográficas durante os diferentes processos de purificação em gel SDS-PAGE.

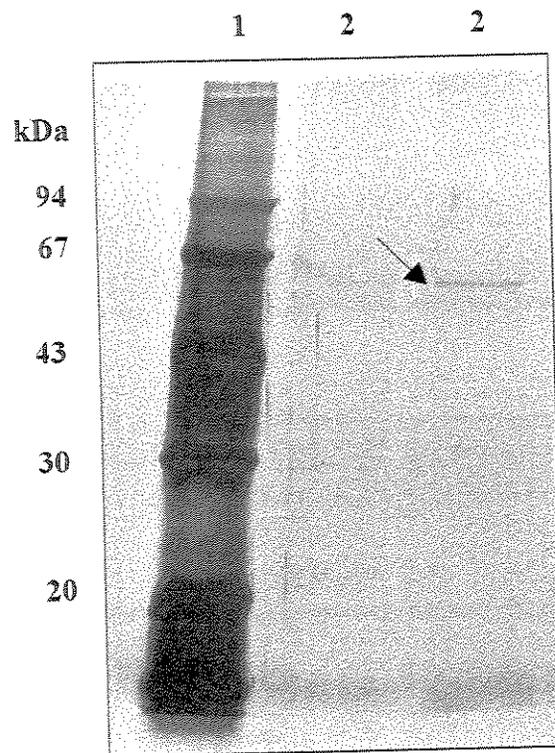
(2 $\mu$ g de proteína/canaleta)

1. Padrão de baixo peso molecular
2. Fração correspondente ao sonicado de cultura
3. Fração correspondente à precipitação com sulfato de amônio
4. Fração da cromatografia em resina DEAE Fast-Flow
5. Fração da cromatografia em resina Superdex 200



**Figura 10.** Frações de cromatografia em resina Mono Q, em gel SDS-PAGE.  
(2µg de proteína/canaleta)

1. Cromatografia em Superdex 200
2. Fração “a” com atividade, em gradiente de 0,0 a 1,0M de NaCl
3. Fração “b” com atividade, em gradiente de 0,0 a 1,0M de NaCl
4. Fração “a” com atividade, em gradiente de 0,0 a 0,5M de NaCl
5. Fração “b” com atividade, em gradiente de 0,0 a 0,5M de NaCl
6. Fração com atividade, em gradiente de 0,0 a 0,3M de NaCl
7. Fração com atividade, em gradiente de 0,0 a 0,2M de NaCl
8. Padrão de baixo peso molecular



**Figura 11.** Perfil eletroforético da enterohemolisina em gel de SDS-PAGE.  
(2 $\mu$ g de proteína/canaleta)

1. Padrão de baixo peso molecular
2. Fração da cromatografia em coluna Mono Q em condições não-redutoras

#### 4.7. Ensaio de termoestabilidade

Quando aquecida a 100°C por 5 min e a 60°C por 20 min, a enterohemolisina perdeu sua atividade hemolítica. No teste de estabilidade a baixas temperaturas, verificamos que o armazenamento da enterohemolisina a -20°C propicia uma ótima estabilidade da hemolisina. Após 120 dias de armazenamento nesta temperatura, a atividade hemolítica se manteve estável. À temperatura de 4°C, observamos que a atividade se mantém constante nos primeiros dias, diminuindo gradativamente.

Tabela 11. Teste de estabilidade da enterohemolisina a 4°C e a -20°C

Temperatura	Período (dias)					
	10	20	30	60	90	120
4°C	1: 16 <sup>a</sup>	1:8	1:8	0	0	0
-20°C	1: 16	1: 16	1: 16	1: 16	1: 16	1:16

a. Última diluição que apresenta 50% de hemólise.

#### 4.8. Teste de estabilidade com diferentes soluções

Realizamos alguns testes, procurando a melhor condição para manter estável a atividade da enterohemolisina. Na Tabela 12, podemos verificar os resultados obtidos quando a enterohemolisina foi incubada a 25°C. Nas alíquotas incubadas em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,6 contendo Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a atividade manteve-se estável por 24h, sendo detectada em quase todas as alíquotas testadas. Nas alíquotas em que o tampão não continha sulfato de sódio, a atividade permaneceu estável apenas naquelas contendo CaCl<sub>2</sub> (100% de atividade) e MgCl<sub>2</sub> (50% de atividade). Nos testes utilizando tampão fosfato 0,01M, pH 7,2 com e sem sulfato de sódio,

encontramos resultados semelhantes aos descritos para o tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,6.

**Tabela 12.** Teste de estabilidade da enterohemolisina a 25°C

Tampões	Soluções													
	1M uréia	8M uréia	CaCl <sub>2</sub> 10mM	MgCl <sub>2</sub> 10mM	Sac (a)	PMSF 0,5M	PMSF 1,0M	PMSF 5,0M	DTT 0,1M	Gli (b)	EDTA 10mM	EGTA 10mM	Apr (c)	Ctr (d)
Tris	0 <sup>1</sup>	0	100	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tris+Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50	0	100	90	50	50	50	50	80	80	50	50	50	50

(a) Sacarose 50mM; (b) Glicerol 10%; (c) Aprotinina 100U/mL; (d) Controle.

1. Porcentagem da atividade em relação ao sonicado de cultura.

Nos testes realizados com alíquotas incubadas a 4°C, -20°C e -70°C, verificamos que a presença de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e/ou CaCl<sub>2</sub> também aumentou a estabilidade da enterohemolisina. A hemolisina se mantém estável por muito mais tempo quando armazenada a temperaturas mais baixas (-20°C e -70°C). Embora a adição de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e/ou CaCl<sub>2</sub> tenha aumentado a estabilidade da toxina a 4°C, este tempo ainda é menor quando comparado à alíquotas armazenadas em temperaturas inferiores.

Das outras soluções usadas no teste de estabilidade, verificamos que o inibidor de protease PMSF e a solução de uréia 8M inibiram a atividade da enterohemolisina em todas as temperaturas testadas. O restante das soluções utilizadas (1M de Uréia, 50mM de sacarose, 100mM de DTT, 10% de glicerol, 10mM de EDTA, 10mM de EGTA e 100U/mL de aprotinina) não inibiu a estabilidade da hemolisina, mas também não contribuiu para o aumento de sua estabilidade.

#### 4.9. Obtenção de antissoro e testes de soroneutralização

**Tabela 13.** Título de soroneutralização (material DEAE)

Antissoro	Período de incubação do soro + toxina	
	37°C/1h	37°C/1h + 4°C/18h
Pré-imune	0	32 <sup>a</sup>
1 <sup>b</sup>	0	32
2 <sup>c</sup>	0	32

a. O título é expresso como a recíproca da maior diluição de 50µl de volume de soro que neutraliza a atividade da EHly.

b. Soro obtido após a primeira inoculação com adjuvante incompleto.

c. Soro obtido após a segunda inoculação com adjuvante incompleto.

Como pode ser observado na Tabela 13, nenhuma neutralização foi observada quando a toxina e o soro foram incubados por apenas 1h. Nos testes de neutralização com incubação por 1h a 37°C, seguido de incubação por 18h a 4°C, observamos a neutralização da atividade hemolítica até um título de 1:32. Entretanto, este título também foi observado com o soro pré-imune.

Iniciamos duas novas seqüências de inoculação, utilizando o material cromatografado em resina Superdex 200. Infelizmente, nos testes realizados com os soros obtidos nestas duas vias de inoculação, tivemos os mesmos resultados já anteriormente observados (Tabela 14). Os soros pré- e pós-imunização dos dois coelhos neutralizaram a ação da enterohemolisina da mesma maneira.

**Tabela 14.** Título de soroneutralização (material Superdex 200)

<b>Antissoro</b>	<b>Intradérmica<sup>a</sup></b>	<b>Intramuscular<sup>b</sup></b>
<b>Pré-imune</b>	40 <sup>c</sup>	40
<b>Soro-imune</b>	40	40

a. Soro do coelho inoculado por via intradérmica.

b. Soro do coelho inoculado por via intramuscular.

c. O título é expresso como a recíproca da maior diluição de 50µl de volume de soro que neutraliza a atividade da EHly.

Em função destes resultados, decidimos verificar se estaria ocorrendo produção de IgGs específicas contra a enterohemolisina ou se a neutralização da atividade hemolítica estaria sendo causada por outros componentes do soro. Assim, os soros pré- e pós-ímenes do coelho inoculado por via intramuscular foram cromatografados em resina de afinidade Sepharose Proteína A. Através da cromatografia nesta coluna, foi possível separar as IgGs do restante do soro, e realizar novos testes de neutralização, utilizando as diferentes frações obtidas na cromatografia.

**Tabela 15.** Título de neutralização dos eluatos da cromatografia em Sepharose Proteína A

<b>Soro</b>	<b>Eluato livre</b>	<b>Pool (IgG)</b>
<b>Pré-imune</b>	40 <sup>a</sup>	0
<b>Soro-imune</b>	40	0

a. O título é expresso como a recíproca da maior diluição de 50µl de volume de soro que neutraliza a atividade da EHly.

Podemos observar, pelos resultados obtidos, que o componente responsável pela neutralização da enterohemolisina não é uma IgG, e está presente no soro normal de coelho (Tabela 15).

#### 4.10. Atividade hemolítica frente a diferentes eritrócitos

**Tabela 16.** Atividade hemolítica de C3888 frente a eritrócitos de diferentes espécies

<b>ERITRÓCITOS</b>	<b>TÍTULO DE ATIVIDADE</b>
Coelho	0
Cobaio	1:16 <sup>a</sup>
Cavalo	1:32
Carneiro	1:32
Boi	1:16
Homem /tipo A	1:16
Homem /tipo B	1:8
Homem/tipo O	1:8
Galinha	1:4

a. Última diluição que apresenta 50% de hemólise.

Podemos verificar pelos resultados obtidos (Tabela 16), que as hemácias mais sensíveis à enterohemolisina são as hemácias de cavalo e carneiro, com um título de 1:32 nos testes em microplaca, seguidas pelas hemácias de cobaia, homem e boi, com um título de 1:16 e/ou 1:8. As hemácias de galinha apresentaram um título de apenas 1:4, e as hemácias de coelho não se mostraram sensíveis à ação da enterohemolisina.

#### 4.11. Teste de toxicidade *in vitro* em cultura de células

Tabela 17. Atividade biológica da EHly em diferentes linhagens celulares

Linhagens celulares	Título de atividade	
	DEAE	Superdex
Vero	16 <sup>a</sup>	8
HeLa	8	4
HEp-2	32	32
3T3	16	8
MDBK	16	8
Caco-2	32	32
CHO	32	32

a. Atividade é expressa como a recíproca da maior diluição que provocou efeito nas culturas celulares.

Na maioria das linhagens celulares testadas (Vero, HeLa, HEp-2, MDBK, 3T3 e Caco-2), a enterohemolisina semi-purificada proveniente das cromatografias em resina DEAE e Superdex provocaram alterações morfológicas, como arredondamento das células e descolamento do tapete celular (Figuras 12 e 13). O efeito citotóxico começou a ser evidenciado após 5h da inoculação, atingindo o máximo de atividade após 24h.

Nas células CHO, observamos um efeito citopático sem descolamento do tapete celular. As células sofreram alongamento e apresentaram um aumento de granulação e aparente condensação do núcleo, quando comparadas as células controle (Figura 13). Estes efeitos começaram a ser observados 5h após a inoculação, atingindo o máximo de atividade após 24h.

## **4.12. Testes de patogenicidade *in vivo***

### **4.12.1. Letalidade em camundongos**

---

Os camundongos da raça BALB/c (5 animais/grupo) inoculados por via intravenosa e os camundongos da raça SWISS (5 animais/grupo), inoculados por via intraperitonal e intravenosa, não apresentaram nenhuma sintomatologia durante 7 dias de observação.

### **4.12.2. Teste em camundongos recém-nascidos**

Os camundongos inoculados com material sonicado não apresentaram acúmulo de líquido durante o período de observação. Para todos os animais testados, a relação de peso intestino/carcaça foi inferior a 0,09.

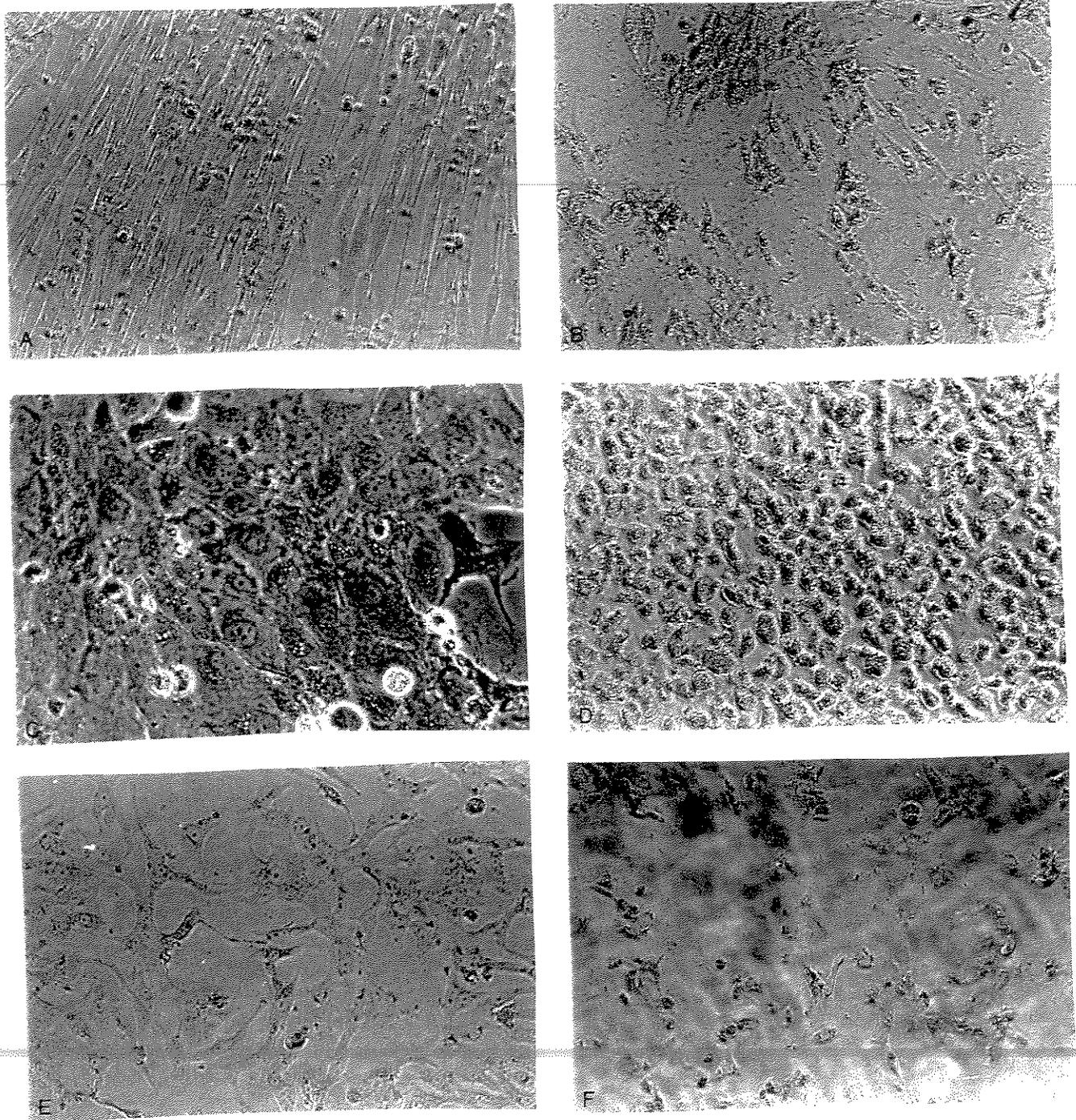


Figura 12. Efeito da atividade biológica de enterohemolisina semi-purificada em células 3T3, MDBK e HeLa. A. células 3T3 controle; B. células 3T3 tratadas com EHly; C. células MDBK controle; D. células MDBK tratadas com EHly; E. células HeLa controle; F. células HeLa tratadas com EHly.

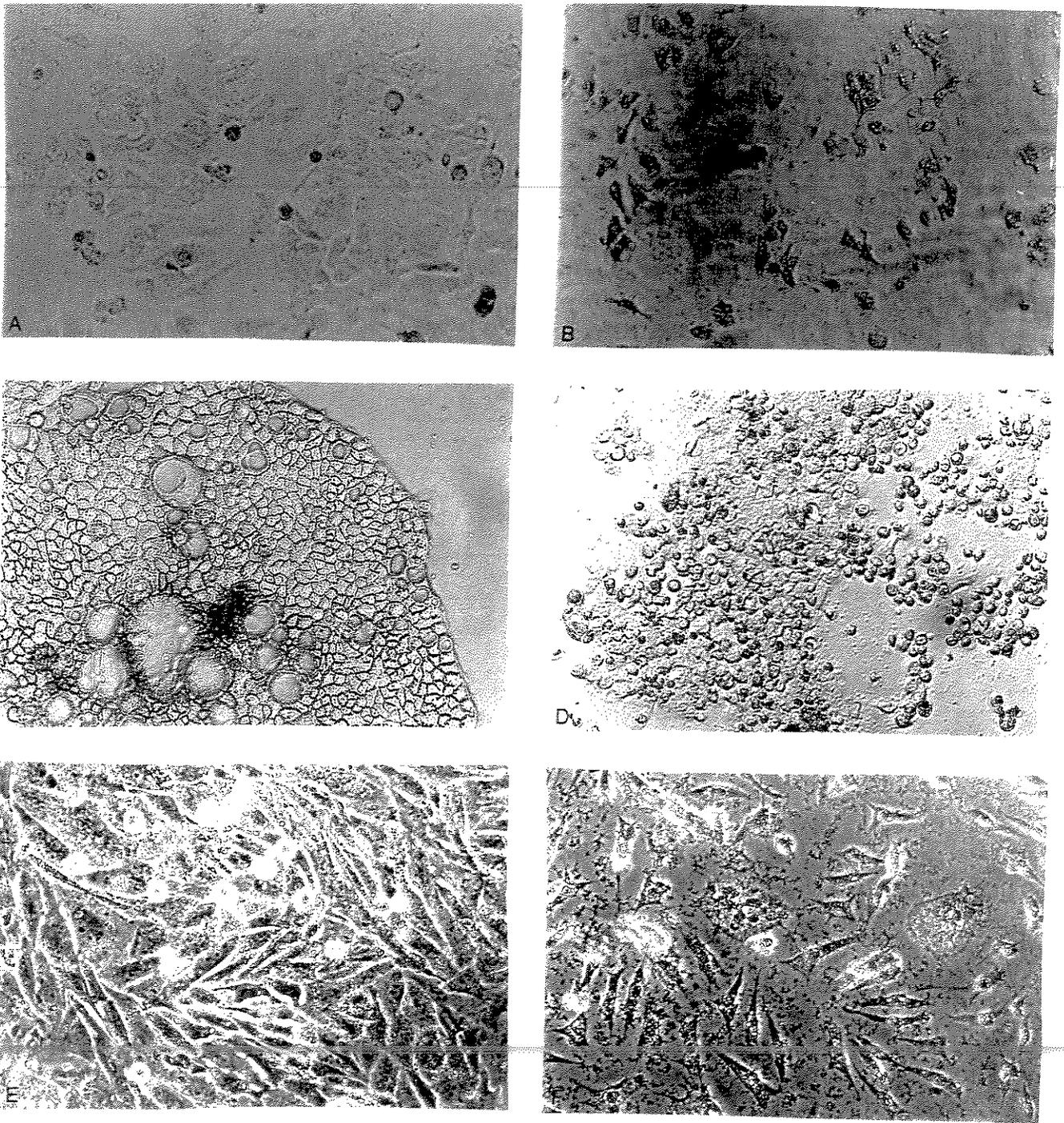


Figura 13. Efeito da atividade biológica de enterohemolisina semi-purificada em células HEp-2, Caco-2 e CHO. A. células HEp-2 controle; B. células HEp-2 tratadas com EHly; C. células Caco-2 controle; D. células Caco-2 tratadas com EHly; E. células CHO controle; F. células CHO tratadas com EHly.

## 5. DISCUSSÃO

Como primeiro passo no processo de purificação e caracterização da enterohemolisina, procuramos encontrar os melhores métodos para detecção da atividade hemolítica. Assim, inicialmente, cultivamos diferentes amostras produtoras de enterohemolisina em dois diferentes meios de cultura, usando como padrões uma amostra não hemolítica (B3) e um padrão de  $\alpha$ -hemolisina (P46).

De acordo com os dados encontrados na literatura (Beutin, 1991), foi possível diferenciar as amostras produtoras de enterohemolisina da amostra produtora de  $\alpha$ -hemolisina, através do tempo de incubação necessário para a detecção de halo de hemólise (18h e 4h, respectivamente), e pelo cultivo em placas de ágar-sangue lavado e não-lavado (Tabela 1). Como descrito anteriormente, (Beutin *et al.*, 1988; Wieler *et al.*, 1992), os halos de hemólise da enterohemolisina foram menores em comparação com os produzidos pela  $\alpha$ -hemolisina, e só foram visualizados em placas de ágar-sangue lavado. Embora na literatura seja recomendado o uso de meio de ágar Triptose para a detecção de EHly (Beutin *et al.*, 1988), não encontramos diferenças no padrão hemolítico quando usamos meio Triptose ou meio TSA.

A atividade hemolítica da EHly em meios com ou sem cálcio não apresentou diferenças (Tabela 1), confirmando os resultados descritos por Beutin *et al.* (1990), que relataram que  $\text{Ca}^{2+}$  não é essencial para a atividade da enterohemolisina. É descrito por um grande número de pesquisadores, que o cálcio é essencial para a atividade da  $\alpha$ -hemolisina (Rennie *et al.*, 1974; Short & Kurtz, 1971; Ludwig *et al.*, 1988; Boehm *et al.*, 1990). Entretanto em nossos resultados, e de acordo com outros pesquisadores (Lovell & Rees, 1960; Smith, 1963; Van den Bosch *et al.*, 1980), não encontramos diferença na atividade hemolítica da  $\alpha$ -hemolisina quando a amostra P46 foi cultivada em meios em presença e ausência de cálcio. Segundo Cavalieri *et al.* (1984), uma explicação para estas diferenças estaria nos diferentes meios utilizados para o cultivo das amostras produtoras de  $\alpha$ -hemolisina. Muitos destes

meios podem conter pequenas quantidades de cálcio, que seriam suficientes para ativar a reação hemolítica, não sendo necessária a adição de cálcio exógeno.

Nos testes realizados utilizando material sonicado em placas, tubos e microplacas, procuramos encontrar a metodologia mais rápida e eficaz para a detecção da enterohemolisina durante o processo de purificação e caracterização. O teste em placas utilizando sobrenadante de cultura não apresentou bons resultados. Diferentemente do que foi descrito para a detecção de hemolisina de *Staphylococcus aureus* (Turner & Pickard, 1980), onde foram utilizadas placas de ágar-sangue com sobrenadante de cultura produtora de hemolisina, os halos de hemólise produzidos pela EHly foram muito pequenos, de difícil visualização. Procuramos também realizar o teste com o sonicado utilizando lâminas recobertas por agarose acrescida de hemácias de carneiro, segundo a metodologia descrita por Honda e Finkelstein (1979). Segundo estes autores, é possível fazer uma correlação entre o número de unidades hemolíticas (UH) e o diâmetro da zona de hemólise, após a incubação das lâminas a 37°C por 1h. Em nossos testes, entretanto, encontramos os mesmos resultados obtidos com o teste em placa. Os halos de hemólise foram muito reduzidos, mesmo quando empregamos concentrações mais elevadas de sonicado de cultura.

Nos testes em tubo, utilizando as culturas produtoras de enterohemolisina, não obtivemos os resultados encontrados por Beutin *et al.* (1990). Embora utilizando as mesmas culturas utilizadas por estes autores, no tempo de incubação recomendado, não detectamos atividade hemolítica empregando esta metodologia. Os resultados obtidos nos testes em tubo e microplaca utilizando sonicado de cultura foram extremamente satisfatórios, sendo de fácil realização, especialmente o método em microplaca. Estes métodos de detecção têm sido amplamente empregados para diferentes hemolisinas, em testes de caracterização e purificação (Yamamoto *et al.*, 1984; Gray *et al.*, 1995; Shinoda *et al.*, 1993). Estes dois métodos foram utilizados nos testes subseqüentes de purificação e caracterização da enterohemolisina.

Na metodologia utilizando ultra-som para a extração da enterohemolisina, obtivemos bons resultados com todas as amostras empregadas (Tabela 2), estando de acordo com os resultados obtidos por Beutin *et al.* (1990), que utilizou esta técnica para extrair a EHly da célula. Além deste método, utilizamos também polimixina B, mitomicina C e extração “freeze-thawing”, para averiguar qual destas quatro metodologias seria mais eficiente na extração da enterohemolisina.

A polimixina B tem sido empregada na extração da toxina VT, onde altos títulos de VT intracelular são obtidos, após o cultivo das culturas produtoras por 5h, e incubação por 10 min com uma concentração de 0,1mg/mL de polimixina B (Karmali *et al.*, 1985). No caso da enterohemolisina, nos dois diferentes tempos de cultivo (5h e 18h), não detectamos atividade hemolítica no sobrenadante de cultura em nenhuma das concentrações de polimixina B empregadas (Tabela 4). Como esta metodologia tem sido utilizada para a extração de toxina VT, que é naturalmente exportada para o meio de cultura, consideramos que este não seria um método apropriado para a extração de EHly, que não é exportada espontaneamente para o exterior da célula. Entretanto, Della Colleta (1997), trabalhando com culturas produtoras de CNF, que também não é exportada para o meio de cultivo, obteve bons resultados em extração empregando polimixina B, bem como mitomicina C, sonicação e “freeze-thawing”.

Na extração por congelamento e descongelamento (“freeze-thawing”), obtivemos resultados variáveis, de acordo com o tempo empregado de congelamento das culturas (Tabela 5). Na referência bibliográfica consultada para a realização deste ensaio (Tabouret e Rycke, 1990), os autores não especificam os tempos utilizados no congelamento e descongelamento. Quando utilizamos 3 ciclos curtos de congelamento e descongelamento, de 1h cada um, a enterohemolisina não foi liberada. Ao empregarmos ciclos de 6 a 15h de congelamento e descongelamento por 1h, verificamos a liberação da hemolisina.

Tabouret e Rycke (1990) mencionam, em seu trabalho com amostras de CNF, que a técnica de criofatura comparada à sonicação, provoca liberação de maior

quantidade de toxina, e é mais adequada para ser usada com um grande número de amostras. Entretanto, em nosso trabalho empregando as amostras padrão de enterohemolisina, só obtivemos resultados positivos ao usar ciclos longos de congelamento, o que dificulta bastante o trabalho. Também não observamos uma maior liberação de hemolisina utilizando esta técnica, em comparação com a metodologia de sonicação. Estes resultados também foram encontrados por Della Colleta (1997), onde foi observado que a técnica de sonicação e “freeze-thawing” tiveram praticamente a mesma eficiência na liberação da toxina CNF2.

A mitomicina C tem sido utilizada na extração de toxinas de *E. coli*, com um aumento de até 100 vezes na produção de toxinas VT (verotoxina) e LT (toxina termolábil), empregando concentrações de 1µg/mL de mitomicina C (al-Jumaili *et al.*, 1992; Gemski *et al.*, 1987). Entretanto, Parreira (1998) não detectou aumento de atividade em amostras produtoras de toxina VT de *E. coli* isoladas de galinhas com SCI (Síndrome da Cabeça Inchada), quando empregou este agente alquilante. A mitomicina C também tem sido usada para a extração de CNF, principalmente em trabalhos onde são analisadas grandes quantidades de amostras (Blanco *et al.*, 1988; Blanco *et al.*, 1992).

Nos diferentes testes realizados para a extração da enterohemolisina, observamos que a melhor concentração de mitomicina C para a extração é de 1µg/mL (Tabela 3), como descrito por outros autores (al-Jumaili *et al.*, 1992; Gemski *et al.*, 1987). Entretanto, observamos que a mitomicina C perde sua capacidade de provocar a liberação da enterohemolisina da célula rapidamente. Embora a mitomicina C tenha sido preparada e armazenada segundo as especificações, isto é, filtrada e armazenada no escuro a -20°C, conseguimos resultados positivos somente logo após o preparo da mitomicina C. Frascos armazenados e usados posteriormente não se mostraram eficientes na liberação da enterohemolisina.

De acordo com os resultados obtidos utilizando estas diferentes metodologias, a extração por ultra-som foi empregada nos testes realizados

posteriormente e no preparo em larga escala de enterohemolisina para os processos de purificação.

Em diferentes trabalhos de purificação de hemolisinas, observamos que, de acordo com o meio escolhido para o cultivo da amostra produtora, os níveis de hemolisina são bastante variáveis, demonstrando a importância da escolha do meio apropriado para a produção da hemolisina em grande quantidade. Honda e Finkestein (1979), relataram que o cultivo de amostra padrão produtora de hemolisina de *Vibrio cholerae* biotipo El Tor, é intensificado quando esta amostra é cultivada em meio HI (infusão de coração), em cultura estacionária a 37°C, acrescida de glicerol. Yamamoto *et al.* (1984) constataram que o meio mais indicado para a produção de hemolisina de *Vibrio cholerae* N-O1 seria o meio Syncase, em cultura estacionária a 30°C, também acrescido de 3% de glicerol.

Nos resultados obtidos com o cultivo da amostra produtora de enterohemolisina em diferentes meios, observamos que não foram encontradas grandes variações nos diversos meios empregados, com exceção do meio mínimo, onde a atividade hemolítica foi menor. A adição de cálcio também não alterou os níveis de EHly obtidos (Tabela 6). Em testes posteriores (dados não mostrados), a mostra C3888 também foi cultivada nestes mesmos meios acrescidos de glicerol, com cultivo estacionário e sob agitação, e novamente não obtivemos variações na produção da enterohemolisina.

O meio TSB foi escolhido para os cultivos posteriores da cultura C3888. Este meio foi preparado em diferentes valores de pH, variando de 6,0 a 8,5 e não encontramos diferenças significativas na produção de enterohemolisina. Portanto, para a produção da enterohemolisina em larga escala, utilizamos o meio TSB sem ajuste no pH (pH 7,3).

Nos experimentos utilizando quelantes de ferro, verificamos que os quelantes Chelex e Dipiridil reduziram o crescimento bacteriano e a expressão da EHly. O meio contendo EDDA aumentou um pouco a atividade hemolítica, mas não de maneira significativa, como tem sido descrito para outras hemolisinas. Chart *et al.*

(1998), trabalhando com enterohemolisina de amostras enterohemorrágicas (EHEC-EHly), mostraram também que o quelante EDDA aumentou a atividade desta hemolisina. Entretanto, como estes autores trabalharam com culturas inoculadas em placas, não foi feita uma quantificação deste aumento de atividade. Experimentos com  $\alpha$ -hemolisina de *E. coli* (Lebek & Gruenig, 1985) mostraram que a secreção de  $\alpha$ -Hly foi drasticamente reduzida com a adição de  $\text{FeCl}_3$  ao meio, mas aumentou significativamente na presença do quelante de ferro dipiridil ( $400\mu\text{M}$ ). Estes mesmos resultados foram observados por Carbonell e Vidotto (1992) com hemolisina de *Serratia marcescens*, onde foi descrito um aumento de até 100 vezes na expressão da atividade hemolítica na presença de  $200\mu\text{M}$  de dipiridil.

O meio TSB acrescido de EDDA, após 22h de cultivo, foi o que apresentou maior atividade hemolítica. Embora os valores obtidos com este meio não sejam muito diferentes dos obtidos no cultivo em TSB sem quelante, passamos a empregar estas condições de cultivo nos lotes de material preparados para purificação.

Como primeiro passo no processo de purificação da enterohemolisina, utilizamos o fracionamento por sulfato de amônio, que tem sido amplamente usado em processos de purificação de hemolisinas de diferentes espécies bacterianas (Sakurai *et al.*, 1973; Yamamoto *et al.*, 1984; Haque *et al.*, 1992; Ding & Lammler, 1996). Todas estas hemolisinas são exportadas para o meio de cultura, e a precipitação utilizando sulfato de amônio torna-se necessária para concentrar a hemolisina presente no meio de cultivo. No caso da enterohemolisina, embora a concentração do material não seja necessária, devido ao pequeno volume do sonificado (100 mL) a precipitação com sulfato foi utilizada em duas etapas, visando eliminar contaminantes como RNA e DNA, que poderiam comprometer a purificação. Assim, foi utilizado um fracionamento inicial com 45% de saturação, e o sobrenadante resultante foi submetido a uma saturação com 60% de sulfato. O precipitado com atividade hemolítica foi utilizado nos passos subsequentes de purificação.

Nesta primeira etapa da purificação, tentamos também utilizar a precipitação ácida, como uma alternativa à precipitação com sulfato de amônio. No trabalho de Miyake *et al.* (1988), é empregada como passo inicial na purificação a precipitação com HCl. Os autores relataram que, além de ser uma técnica simples e de baixo custo, a atividade específica da hemolisina aumentou em 100 vezes. Os resultados da precipitação da enterohemolisina com ácido não foram satisfatórios. A hemolisina perdeu toda sua atividade após a precipitação com HCl.

Os processos cromatográficos foram iniciados com colunas de troca iônica. Em testes preliminares, verificamos que a enterohemolisina era adsorvida por resinas de troca aniônica, e não se ligava a resinas de troca catiônica. Utilizamos três diferentes colunas aniônicas, e obtivemos melhores resultados com as colunas DEAE Fast-Flow e Cibacron, com perda de atividade hemolítica no precipitado cromatografado em resina Q-sepharose. O perfil cromatográfico nas colunas DEAE e Cibacron foi muito semelhante, com eluição da EHly nestas duas colunas na faixa de 0,1M NaCl. Nos processos cromatográficos posteriores, utilizamos a cromatografia em resina DEAE Fast-Flow como primeiro passo nos processos cromatográficos.

Nas cromatografias empregando resinas de gel filtração, não obtivemos bons resultados utilizando as colunas convencionais Sepharose CL-6B e Sephadex G-100. Nas cromatografias realizadas nestas duas colunas, não observamos uma diminuição no número de bandas protéicas (dados não mostrados), em relação à cromatografia em DEAE Fast-Flow. Realizamos também cromatografias em coluna de hidrofobicidade Phenyl-Sepharose CL-4B (Pharmacia), e não obtivemos resultados satisfatórios, com perda da atividade hemolítica nas duas cromatografias realizadas nesta coluna.

Nas cromatografias em resina Superdex 200 (convencional e no sistema HPLC), Superdex 75 e Shimpack-Diol encontramos perfis cromatográficos parecidos (Figuras 2 a 5), e o mesmo perfil de bandas protéicas em SDS-PAGE e PAGE (Figuras 7 e 8). A atividade hemolítica nestas resinas se encontra no primeiro

pico de eluição, com alteração apenas no tempo de retenção. A cromatografia em resina Superdex 200 (convencional e no sistema HPLC) foi utilizada em cromatografias posteriores realizadas, e alíquotas provenientes destas cromatografias foram aplicadas em coluna Mono Q. Na Figura 9, podemos observar as etapas de purificação em SDS-PAGE, sem o redutor  $\beta$ -mercaptoetanol, tendo como seqüência de purificação a precipitação com 60% de sulfato, cromatografias em resina DEAE Fast-Flow e Superdex 200.

Nas cromatografias em coluna Mono Q no sistema HPLC, observamos uma diminuição acentuada no número de bandas protéicas (Figura 10), à medida que diminuiu a concentração de NaCl. Na cromatografia em resina Mono Q utilizando gradiente de sal de 0,0 a 0,15M, a fração com atividade apresentou apenas uma banda protéica em gel de SDS-PAGE, de peso molecular aproximado de 60kDa (Figura 11). Este resultado está de acordo com os resultados encontrados por Beutin *et al.* (1990), onde os autores descrevem a presença de uma proteína de membrana de aproximadamente 60kDa, associada à enterohemolisina. Em um trabalho posterior, Stroehler *et al.* (1993), utilizando amostras EHly<sup>+</sup> e EHly<sup>-</sup>, encontraram proteínas de membrana de 33-35kDa e 65kDa, que estariam associadas à enterohemolisina e, possivelmente, a proteína de 65kDa seria uma agregação ou dimerização da proteína de 33-35kDa. O estudo de genes do determinante EHly1, revelou uma seqüência de 789bp que codifica uma proteína de aproximadamente 30kDa, que provavelmente é a proteína de 33-35kDa encontrada na extração de membrana descrita por Stroehler *et al.* (1993).

No processo de purificação da enterohemolisina, embora a atividade específica tenha sido bastante elevada (aproximadamente 2800 vezes), percebemos que os resultados obtidos na purificação foram muito inferiores aos descritos para outras hemolisinas (Tabela 10). No trabalho de Sakurai *et al.* (1973), com hemolisina de *Vibrio parahaemolyticus*, é descrito um aumento final de 457 vezes na purificação, e uma porcentagem de recuperação de aproximadamente 10%. No trabalho de Yoh *et al.* (1986), com hemolisina de *Vibrio hollisae*, o aumento na

purificação foi de 2087,7 vezes, com uma porcentagem de recuperação de 3,2%. No trabalho de Honda e Finkestein (1979), com hemolisina de *Vibrio cholerae*, estes valores são inferiores aos descritos anteriormente, com um incremento de pureza da apenas 138 vezes, valor próximo ao obtido para a enterohemolisina, onde foi observado um aumento de aproximadamente 100 vezes na purificação. Entretanto, em relação à porcentagem de recuperação, embora estes autores tenham obtido um baixo rendimento (0,5%), este é ainda maior do que o obtido para a enterohemolisina, de apenas 0,06%.

Durante o processo de purificação, outro problema encontrado foi a manutenção da atividade hemolítica, em especial nas fases finais da purificação. A fim de contornar este problema, realizamos alguns testes, procurando a melhor condição para manter estável a atividade da enterohemolisina.

Na literatura encontramos dois trabalhos realizados com toxinas do gênero *Bordetella* (Horiguchi *et al.*, 1990; Zhang & Sekura, 1991) que, semelhantes à enterohemolisina, não são liberadas espontaneamente para o meio de cultura, e perdem sua atividade ao longo do processo de purificação. No trabalho realizado com a espécie *Bordetella bronchiseptica* (Horiguchi *et al.*, 1990), alíquotas da toxina foram incubadas com diferentes soluções, nas temperaturas de 4°C, -20°C e -80°C, e os autores observaram que a 4°C, utilizando tampão fosfato contendo Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3M e 1M de uréia, a toxina pura se manteve estável por três meses. No trabalho com toxina de *Bordetella pertussis* (Zhang & Sekura, 1991), foram testados vários inibidores de protease, mantendo a toxina incubada por 18h a 25°C. Estes autores conseguiram evitar a perda de atividade da toxina adicionando ao tampão, em todos os passos da purificação, três diferentes inibidores de protease.

Em nossos experimentos, fizemos uma fusão das técnicas descritas nestes dois trabalhos, mantendo alíquotas da hemolisina incubadas nas temperaturas 25°C, 4°C, -20°C e -70°C, com diferentes soluções, incluindo os inibidores de protease PMSF e aprotinina.

Na Tabela 12, verificamos que a presença de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e CaCl<sub>2</sub> aumentou a estabilidade da enterohemolisina nas alíquotas incubadas a 25°C, bem como nas outras temperaturas testadas. Nos processos de purificação realizados a seguir, utilizamos o tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,6 contendo Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3M e CaCl<sub>2</sub> 0,01M nos passos finais da purificação, mas não conseguimos manter a estabilidade da enterohemolisina. Embora esta hemolisina se mantenha estável quando armazenada a -20°C nas fases iniciais da purificação (Tabela 11), a hemolisina obtida após a cromatografia em Mono Q perde toda sua atividade após 24h de armazenamento a -20°C. Embora a atividade hemolítica inicial da enterohemolisina seja pequena quando comparada a outras hemolisinas estudadas, é possível que esta hemolisina seja instável quando pura, perdendo a estabilidade que apresenta quando associada a outros componentes do extrato de cultura.

Verificamos, nos testes de estabilidade realizados, que a enterohemolisina presente no sonicado de cultura mantém sua atividade hemolítica por até um mês quando armazenada a 4°C, e que esta estabilidade se mantém inalterada por vários meses quando as alíquotas de sonicado são estocadas a -20°C (Tabela 11). Quando aquecida a 100°C por 5 min e a 60°C por 20 min, a enterohemolisina perde sua atividade hemolítica. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Beutin *et al.* (1990), que demonstraram que o material obtido por sonicação de culturas produtoras de enterohemolisinas é termosensível, perdendo sua atividade hemolítica quando pré-incubados sob altas temperaturas.

Ao iniciarmos os testes de soroneutralização com o antissoro anti-EHly, baseamo-nos em metodologias descritas para outras hemolisinas (Yoh *et al.*, 1986; Honda *et al.*, 1988 e Haque *et al.*, 1992), onde o tempo de incubação da toxina mais o soro varia de 30 min a 1h a 37°C. Como pode ser observado na Tabela 13, nossos resultados não estão de acordo com os encontrados por estes autores, já que nenhuma neutralização foi observada neste tempo de incubação.

Nos trabalhos de MacLeod & Gyles (1990) e Stroehrer *et al.* (1993), o tempo de incubação empregado nos testes de neutralização é de 1h a 37°C, seguido de

incubação por 18h a 4°C. Com este tempo de incubação, observamos a neutralização da atividade hemolítica até um título de 1:32. Entretanto, este título também foi observado com o soro pré-imune (Tabela 13).

No trabalho de Stroecher *et al.* (1993), onde é descrita a produção de um antissoro contra uma proteína de membrana de 65KDa associada à EHly, é relatado que o soro pré-imune também é capaz de neutralizar a ação da enterohemolisina, numa concentração próxima à que encontramos. Os títulos obtidos por Stroecher *et al.* (1993) com o soro pós-imunização foram de aproximadamente 1:80 a 1:160, um pouco maiores do que o obtido para o soro pré-imune, mas ainda muito baixos, comparados a títulos encontrados em testes com outras hemolisinas, onde foi descrita atividade neutralizante do soro com títulos entre 1:1000 e 1:10.000 (Yamamoto *et al.*, 1984).

Embora a metodologia de produção de antissoros mostre grandes variações de um trabalho para outro, tornando difícil escolher qual a melhor seqüência de imunização a ser empregada, nossos resultados iniciais de soroneutralização mostraram que os esquemas de imunização utilizados não foram eficientes para estimular de maneira satisfatória a produção de anticorpos contra a enterohemolisina.

Estes resultados preliminares também mostraram que, diferentemente de outras hemolisinas (Honda *et al.*, 1988), e de acordo com os resultados encontrados por Stroecher *et al.* (1993), a enterohemolisina é neutralizada pelo soro pré-imune de coelho. Em testes de soroneutralização feitos em nosso laboratório, com soro de porcos não imunizados, obtivemos os mesmos títulos de neutralização encontrados com soro de coelhos.

Nas duas novas seqüências de inoculação utilizando o material cromatografado em resina Superdex 200, tivemos os mesmos resultados já anteriormente observados. (Tabela 14). Os soros pré- e pós-imunização dos dois coelhos neutralizaram a ação da enterohemolisina da mesma maneira. Através da cromatografia em resina de afinidade Sepharose Proteína A, observamos que o

componente responsável pela neutralização da enterohemolisina não é uma IgG, e está presente no soro normal de coelho (Tabela 15). Apesar de termos empregado dois diferentes métodos de inoculação para a produção de antissoro e um destes métodos ter sido descrito especificamente para a produção de antissoro anti-EHly (Stroher *et al.*, 1993), nenhum deles foi capaz de estimular a produção de anticorpos específicos contra a enterohemolisina.

Nos primeiros trabalhos realizados com a enterohemolisina (Beutin *et al.*, 1988, 1989), é descrita sua capacidade de lisar um grande número de eritrócitos, sem que, no entanto, fosse descrita qual a hemácia mais sensível à ação desta hemolisina. Em todos os relatos posteriores sobre a enterohemolisina, sempre foi utilizada a hemácia de carneiro para os testes de hemólise, e adotamos esta hemácia nos testes realizados durante este trabalho. Posteriormente realizamos testes de hemólise com diferentes eritrócitos, visando detectar qual seria a hemácia mais sensível à enterohemolisina, o que poderia facilitar sua detecção em fases posteriores da purificação. Podemos verificar pelos resultados obtidos (Tabela 16), que as hemácias mais sensíveis à enterohemolisina são as hemácias de cavalo e carneiro, com um título de 1:32 nos testes em microplaca.

Para  $\alpha$ -hemolisina de *E. coli*, Rennie e Arbuthnott (1974), relataram que eritrócitos de carneiro e coelho foram os mais suscetíveis, enquanto os humanos e de camundongo os menos suscetíveis. Em testes realizados com hemolisinas do gênero *Vibrio*, a sensibilidade dos eritrócitos encontrada varia grandemente de uma espécie para a outra. As hemácias mais sensíveis à hemolisina de *Vibrio parahaemolyticus* são as de carneiro e boi (Honda *et al.*, 1988), enquanto que para as hemolisinas das bactérias *V. metschnikovii* (Miyake *et al.*, 1988) e *V. hollisae* (Yoh *et al.*, 1986) são as hemácias de boi e galinha, respectivamente. Nos testes de atividade realizados com a hemolisina de *V. cholerae* (Yamamoto *et al.*, 1984) são empregados eritrócitos de coelho, que apresentam 5 vezes mais sensibilidade à hemolisina que os eritrócitos de carneiro, diferindo da enterohemolisina, onde as hemácias de coelho aparentemente não apresentam sensibilidade.

Nos testes em culturas de células realizados com material semi-purificado, detectamos ação citotóxica, com alterações morfológicas características, como arredondamento celular e descolamento do tapete na maioria das culturas utilizadas (Vero, HeLa, Hep-2, Caco-2, 3T3 e MDBK). Nos testes utilizando a cultura CHO, diferentemente do que foi observado para as outras culturas, encontramos um efeito citopático, com alongamento celular e presença de grânulos (Figura 13). Estes resultados diferem dos resultados encontrados por Beutin *et al.* (1988, 1989). Em testes utilizando culturas de células Vero, HeLa e HEp-2, estes autores não encontraram efeitos tóxicos usando sonicados de cultura. Posteriormente Beutin (1991) relatou que enterócitos humanos eram grandemente afetados pela enterohemolisina, sem especificar, entretanto, se utilizou sonicação de cultura, a linhagem celular utilizada ou o título citotóxico encontrado. Em nossos testes, detectamos que as linhagens mais sensíveis à ação dos extratos contendo enterohemolisina foram as culturas de enterócitos humanos (Caco-2), carcinoma de laringe humana (HEp-2) e ovário de hamster chinês (CHO) (Tabela 17). Como não utilizamos a enterohemolisina purificada nestes testes, não é possível afirmar que a ação observada nestas células seja causada pela enterohemolisina, e apenas testes com a hemolisina purificada poderiam confirmar sua ação nestas diferentes linhagens celulares.

Nos testes realizados *in vivo*, utilizando enterohemolisina semi-purificada, ~~não detectamos atividade tóxica ou letalidade em nenhuma das linhagens de camundongos utilizadas.~~ Em testes utilizando  $\alpha$ -hemolisina, a maioria dos autores detectou atividade tóxica e letal através de injeções intravenosas em camundongos (Smith, 1963; Fried *et al.*, 1971; Smith e Huggins, 1985). Emody *et al.* (1980) não conseguiram demonstrar uma diferença substancial de toxicidade entre culturas Hly<sup>+</sup> e derivados não hemolíticos, através de injeções intravenosas em camundongos. Entretanto, quando introduzidas por via intraperitoneal ou intranasal, as culturas hemolíticas foram claramente mais tóxicas. Nos testes com a enterohemolisina,

utilizamos duas vias de inoculação, a intravenosa e a intraperitoneal, mas nenhuma atividade foi detectada.

Nos testes em camundongos recém-nascidos, também não detectamos acúmulo de líquido nos diferentes tempos testados. Estes resultados também foram encontrados para  $\alpha$ -hemolisina de *E. coli*, onde amostras  $\alpha$ -hemolíticas foram incapazes de causar acúmulo de líquido em camundongos e em coelhos (Beutin, 1991). Diferentemente dos resultados encontrados com as hemolisinas de *E. coli*, no trabalho realizado com a hemolisina de *V. metschnikovii*, Miyake *et al.* (1988) relataram que esta hemolisina causa acúmulo de líquido em intestino de camundongos recém-nascidos em apenas trinta minutos, chegando ao máximo em 2h e se mantendo por 18h.

Desde 1988, após o primeiro relato da presença de enterohemolisinas em amostras de *E. coli* isoladas de crianças com diarreia (Beutin *et al.*, 1988), a EHly tem sido intensamente investigada em amostras de EHEC (EHly-EHEC) produtoras de verotoxinas (VT), causadoras de um grande número de surtos diarreicos, principalmente na Alemanha, Japão, Estados Unidos e Canadá (Goldwater & Bettelheim, 1998). Entretanto, estas hemolisinas que apresentam halos pequenos e turvos em placas de ágar-sangue, denominadas enterohemolisinas, não estão caracterizadas quanto a seus aspectos bioquímicos e estruturais, como ocorre com a  $\alpha$ -hemolisina de *E. coli*.

No Brasil, são escassos os estudos epidemiológicos com as enterohemolisinas, tanto em amostras de *E. coli* isoladas de fezes humanas como de animais (Della Colleta, 1997; Saridakis *et al.*, 1997). São necessários estudos mais abrangentes com enterohemolisinas, visando a esclarecer sua importância como fator de virulência, além de sua possível relação com outros fatores já conhecidos, produzidos por amostras de *Escherichia coli* causadoras de diarreias em homens e animais.

---

## 6. CONCLUSÕES

1. Os melhores métodos para detecção da enterohemolisina foram os testes em tubo e em microplaca, utilizando os sobrenadantes dos sonicados das células bacterianas da amostra C3888.
2. O melhor método para a extração da enterohemolisina, entre as quatro diferentes metodologias testadas (sonicação, mitomicina C, polimixina B e criofratura) foi a extração utilizando ultra-som.
3. A melhor condição de cultivo encontrada para a produção de enterohemolisina pela amostra C3888 foi o meio TSB, acrescido de EDDA (12,5µg/mL), por 22h a 37°C, com agitação a 150rpm.
4. A atividade hemolítica da enterohemolisina da amostra C3888 encontra-se na fração submetida a 60% de saturação com sulfato de amônio.
5. A melhor seqüência encontrada para a purificação da enterohemolisina foi a precipitação em 60% de saturação com sulfato de amônio e cromatografias em resina DEAE Fast-Flow, Superdex 200 e Mono Q no sistema HPLC.
6. O peso molecular da enterohemolisina foi estimado em aproximadamente 60kDa, a partir da análise de sua mobilidade eletroforética em gel de SDS-PAGE.
7. No processo de purificação da enterohemolisina, foi observado um aumento na atividade específica de 2800 vezes, um aumento de 100 vezes na atividade relativa e 0,06% de recuperação.

8. Nos testes de estabilidade realizados, a enterohemolisina manteve sua atividade hemolítica estável quando armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-70^{\circ}\text{C}$ , perdendo sua atividade quando aquecida a  $60^{\circ}\text{C}$  e  $100^{\circ}\text{C}$ .
9. Alíquotas de sonicação de cultura mantiveram sua atividade estável por mais tempo, quando armazenados em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,6 contendo  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,3M e  $\text{CaCl}_2$  0,1M.
10. A atividade hemolítica da enterohemolisina purificada é bastante instável, perdendo-se após 24h de armazenamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
11. Nenhuma das três diferentes metodologias empregadas para a obtenção de antissoro foi capaz de estimular a produção de anticorpos específicos contra a enterohemolisina. Nos testes de neutralização realizados, constatou-se que o soro de animais não imunizados (coelhos e porcos) é capaz de neutralizar a ação da enterohemolisina.
12. As hemácias mais sensíveis à ação da enterohemolisina são as de carneiro e cavalo.
13. Nos testes realizados com as culturas de células Vero, HeLa, Hep-2, MDBK, 3T3 e Caco-2, a enterohemolisina semi-purificada provocou efeito citotóxico, com arredondamento das células e descolamento do tapete celular. Nas células CHO, foi observado efeito citopático, com alongamento celular, aumento da granulação e aparente condensação do núcleo.
14. Nos testes realizados *in vivo*, utilizando enterohemolisina semi-purificada, não foi detectada atividade tóxica ou letalidade em camundongos adultos e recém-nascidos.

---

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Al-Jumaili, I.; Burke, D. A., Scotland, S. M.; Al-Mardini, H. and Record, C. O. A method of enhancing verocytotoxin production by *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.** **93**: 121-26, 1992.
- Bamforth, J. and Dudgeon, J. A. The haemolytic activity of *Bact. coli*. **J. Pathol. Bacteriol.** **64**: 751-61, 1952.
- Bhakdi, S. and Tranum-Jensen, J. Damage to cell membranes by pore-forming bacterial cytolysins. **Prog. Allergy** **40**: 31-43, 1986.
- Benz, R.; Maier, E. and Genteshev, I. Tol C of *Escherichia coli* functions as an outer membrane channel. **Zentralbl. Bakteriол. Hyg. Abt. [A]** **278**: 187-96, 1993.
- Benz, R.; Schmid, A.; Wagner, W. and Goebel, W. Pore formation by the *Escherichia coli* hemolysin: evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates. **Infect. Immun.** **57**: 887-95, 1989.
- Beutin, L. The different hemolysins of *Escherichia coli*. **Med. Microbiol. Immunol.** **180**: 167-82, 1991.
- Beutin, L.; Bode, L.; Özel, M. and Stephan, R. Enterohemolysin production is associated with a temperate bacteriophage in *Escherichia coli* serogroup O26 strains. **J. Bacteriol.** **172**: 6469-75, 1990.

Beutin, L.; Geier, D.; Steinrück, H.; Zimmermann, S. and Scheutz, F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **J. Clin. Microbiol.** **31**: 2483-88, 1993.

Beutin, L. and Montenegro, M. Enteroahemolysin and Shiga-like toxin genes in *E. coli*. **Vet. Rec.** **127**: 316, 1990.

Beutin, L.; Montenegro, M.; Orskov, I.; Orskov, F.; Prada, J. Zimmermann, S. and Stephan, R. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.** **27**: 2559-64, 1989.

Beutin, L.; Prada, J.; Zimmermann, S.; Stephan, R.; Orskov, I. and Orskov, F. Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Zentralbl. Bakteriol. Hyg. Abt. [A]** **267**: 576-88, 1988.

Bhakdi, S.; Greulich, S.; Muhly, M.; Eberspächer, B.; Becker, H.; Thiel, A. and Hugo, F. Potent leucocidal action of *Escherichia coli* hemolysin mediated by permeabilization of target cell membranes. **J. Exp. Med.** **169**: 737-54, 1989.

Bhakdi, S.; Mackman, N.; Nicaud, J. M. and Holland, I. B. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. **Infect. Immun.** **52**: 63-9, 1986.

Bhakdi, S. and Tranum-Jensen, J. Membrane damage by pore-forming bacterial cytolytins. **Microb. Pathog.** **1**: 5-14, 1986.

Bhakdi, S. and Tranum-Jensen, J. Damage to cell membranes by pore-forming bacterial cytolysins. **Prog. Allergy** **40**: 1-43, 1988.

Bhakdi, S.; Muhly, M.; Korom, S. and Schmidt, G. Effects of *Escherichia coli* hemolysin on human monocytes. **J. Clin. Invest.** **85**: 1746-53, 1990.

Blanco, J.; Blanco, M.; Alonso, M. P.; Blanco, J. E.; González, E. A. and Garabal, J. I. Characteristics of haemolytic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF1). **Res. Microbiol.** **143**: 869-78, 1992.

Blanco, J.; Blanco, M.; González, E. A.; Alonso, M. P. and Garabal, J. I. Comparative evaluation of three test for the detection of *Escherichia coli* cytotoxin necrotizing factors (CNF1 and CNF2) using filtrates of cultures treated with mitomycin C. **FEMS Microbiol. Lett.** **69**: 311-16, 1990.

Blanco, J.; González, E. A.; García, S.; Blanco, M.; Regueiro, B. and Bernázdez, I. Production of toxin by *Escherichia coli* strains isolated from calves with diarrhoea in Galicia (North-Western Spain). **Vet. Microbiol.** **18**: 297-311, 1988.

~~Blum, H.; Beier, H. and Gross, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis** **8**: 93-9, 1987.~~

Boehm, D. F.; Welch, R. and Snyder, I. Calcium is required for the binding of *Escherichia coli* hemolysin to erythrocyte membranes. **Infect. Immun.** **58**: 1951-58, 1990.

Bohach, G. A.; Cavalieri, S. J. and Snyder, I. S. Purification of *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin. **Methods. Enzymol.** **165**: ,137-46, 1988.

Bohach, G. A. and Snyder, I. S. Chemical and immunological analysis of the complex structure of *Escherichia coli* alpha-hemolysin. **J. Bacteriol.** **164**: 1071-80, 1985.

---

Bollag, D. M. and Edelstein, S. J. Protein methods. New York: Wiley-liss, 1991.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** **72**: 248-54, 1976.

Brooks, H. J. L.; O'Grady, F.; McSherry, M. A. and Catell, W. R. Uropathogenic properties of *Escherichia coli* in recurrent urinary-tract infection. **J. Med. Microbiol.** **13**: 57-68, 1980.

Caprioli, A., Falbo, V.; Roda, L. G.; Ruggeri, F. M. and Zona, C. Partial purification and characterization of *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. **Infect. Immun.** **39**: 1300-06, 1983.

Carbonell, G. V. and Vidotto, M.C. Virulence factors in *Serratia marcescens*: cell-bound hemolysin and aerobactin. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **25**: 1-8, 1992.

---

Cavalieri, S. J.; Bohach, G. A. and Snyder, I. S. *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. **Microbiol. Rev.** **48**: 326-43, 1984.

Cavalieri, S. J. and Snyder, I. S. Effect of *Escherichia coli* alpha-hemolysin on human peripheral leukocyte viability *in vitro*. **Infect. Immun.** **36**: 455-61, 1982.

- Chart, H.; Jenkins, C.; Smith, H. R.; Hedges, D. and Rowe, B. Haemolysin production by strains of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Microbiology** 144: 103-7, 1998.
- Chaturvedi, U. C.; Mather, A., Khan, A. M. and Mehrotra, R. M. L. Cytotoxicity of filtrates of hemolytic *Escherichia coli*. **J. Med. Microbiol.** 2: 211-18, 1969.
- Cooke, E. M. and Ewins, S. P. Properties of strains of *Escherichia coli* isolated from a variety of sources. **J. Med. Microbiol.** 8: 107-11, 1975.
- Davis, B. J. Disc-electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 121: 404-27, 1964.
- Dean, A. G.; Ching, Y. C.; Willians, R. G. and Harden, L. B. Test for *E. coli* enterotoxin using infant mice: application in the study of diarrhea in children in Honolulu. **J. Infect. Dis.** 125: 407-11, 1972.
- DeBoy, J. M.; Wachsmuth, K. and Birkness, K. Plasmids and serotypes of hemolytic fecal serotypes of hemolytic fecal *Escherichia coli*. **Curr. Microbiol.** 8: 273-7, 1983.
- DeBoy, J. M.; Wachsmuth, K. and Davis, B. R. Hemolytic activity in enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.** 12: 193-8, 1980.
- De la Cruz, F.; Zabala, J. C. and Ortiz, J. M. Hemolysis determinant common to *Escherichia coli* strains of different O serotypes and origins. **Infect. Immun.** 41: 881-7, 1983.

Della Colleta, H. H. M. Purificação e caracterização do fator necrosante citotóxico do tipo 2 (CNF2) produzido por *Escherichia coli*. Campinas, 1997. [Dissertação de Mestrado - I.B.- Universidade Estadual de Campinas].

De Rycke, J.; González, E. A., Blanco, J.; Oswald, E.; Blanco, M. and Boivin, R. Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.** **28**: 694-9, 1990.

Ding, H. and Lämmle, C. Purification and further characterization of a haemolysin of *Actinomyces pyogenes*. **J. Vet. Med.** **43**: 179-88, 1996.

Elliot, S. J.; Srinivas, S.; Albert, M. J.; Alam, K.; Robins-Browne, R. M.; Gunzburg, S. T.; Mee, B. J, and Chang, B. J. Characterization of the roles of hemolysin and other toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic *Escherichia coli* linked to human diarrhea. **Infect. Immun.** **66**: 2040-51, 1998.

Emody, L.; Batai, I.; Kerenyi, M. and Voros, S. Transfer of *Escherichia coli* haemolysin plasmid into *Proteus morgani* in the mouse intestine. **FEMS Microbiol. Lett.** **16**: 35-8, 1983.

~~Emody, L.; Pal, T.; Safonova, N. V.; Kuch, B. and Golutva, N. K. Alpha-haemolysin: an additive virulence factor in *Escherichia coli*. **Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.** **27**: 333-42, 1980.~~

Evans, D. J.; Evans, D. G.; Hohne, C.; Noble, M. A., Haldane, E. V.; Lior, H. and Young, L. S. Hemolysin and K antigens in relation to serotype and hemagglutination type of *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections. **J. Clin. Microbiol.** **13**: 171-8, 1981.

- Falbo, V.; Famiglietti, M. and Caprioli, A. Gene block encoding production of cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin in *Escherichia coli* isolates from extraintestinal infections. **Infect. Immun.** 60: 2182-87, 1992.
- Felmlee, T.; Pellet, S. and Welch, R. A. Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. **J. Bacteriol.** 163: 94-105, 1985.
- Fried, F. A., Vermeulen, C. W.; Ginsburg, M. J. and Cone, C. M. Etiology of pyelonephritis: further evidence associating the production of experimental pyelonephritis with hemolysis in *Escherichia coli*. **J. Urol.** 106: 351-4, 1971.
- Fried, F. A., and Wong, R. J. Etiology of pyelonephritis: significance of hemolytic *Escherichia coli*. **J. Urol.** 103: 718-21, 1970.
- Gemski, P.; O'Brien, A. D. and Wohlhieter, J. A. Cellular release of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* by bacteriophage induction. **Infect. Immun.** 19: 1076-82, 1987.
- Goebel, W. and Hedgpeth, J. Cloning and functional characterization of the plasmid-encoded hemolysin determinant of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 151: 1290-98, 1982.
- Goebel, W. Royer-Pokora, B.; Lindenmaier, W. and Bujard, H. Plasmids controlling synthesis of hemolysin in *Escherichia coli*: molecular properties. **J. Bacteriol.** 118: 964-73, 1974.
- Goldwater, P. N. and Bettelheim, K. A. New perspectives on the role of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohaemorrhagic *E. coli* serotypes in human disease. **J. Med. Microbiol.** 47: 1039-45, 1998.

Gray, J. T.; Fedorka-Cray, P. J. and Rogers, D. G. Partial characterization of a *Moraxella bovis* cytolysin. **Vet. Microbiol.** **43**: 183-96, 1995.

---

Gray, L.; Mackman, N. Nicaud, J-M and Holland, I. B. The carboxy-terminal region of haemolysin 2001 is required for secretion of the toxin from *Escherichia coli*. **Mol. Gen. Genet.** **205**: 127-33, 1986.

Grimminger, F.; Walmrath, D.; Birkemeyer, R. G.; Bhakdi, S. and Seeger, W. Leukotriene and hidroxyeicosatetraeniocacid generation elicited by low doses of *Escherichia coli* hemolysin in rabbits lungs. **Infect. Immun.** **58**: 2659-63, 1990.

Hacker, J.; Bender, L.; Ott, M.; Wingender, J.; Lund, B. Marre, R. and Goebel, W. Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur "in vitro" and "in vivo" in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. **Microb. Pathog.** **8**: 213-25, 1990.

Hacker, J.; Hugues, C.; Hof, H. and Goebel, W. Cloned hemolysin genes from *Escherichia coli* that cause urinary tract infection determine different levels of toxicity in mice. **Infect. Immun.** **42**: 57-63, 1983.

~~Hacker, J.; Ott, M.; Blum, G.; Marre, R.; Heesemann, J.; Tschäpe, H. and Goebel, W. Genetics of *Escherichia coli* uropathogenicity: analysis of the O6:K15:H31 isolate 536. **Zentralbl. Bakteriол. Hyg. [A]** **276**: 165-75, 1992.~~

Haque, A., Sugimoto, N.; Horiguchi, Y.; Okabe, T.; Miyata, T.; Iwanaga, S. and Matsuda, M. Production, purification, and characterization of botulinolysin, a thiol-activated hemolysin of *Clostridium botulinum*. **Infect. Immun.** **60**: 71-8, 1992.

- Honda, T. and Finkelstein, R. A. Purification and characterization of a hemolysin produced by *Vibrio cholerae* biotype El Tor: another toxic substance produced by cholera vibrios. **Infect. Immun.** **26:** 1020-27, 1979.
- Honda, T.; Ni, Y. and Miwatani, T. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. **Infect. Immun.** **56:** 961-5, 1988.
- Horiguchi, Y; Nakai, T. and Kume, K. Simplified procedure for purification of *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotic toxin. **FEMS Microbiol. Lett.** **66:** 39-44, 1990.
- Hugues, C.; Hacker, J.; Robertes, A. and Goebel, W. Hemolysin production as a virulence marker in symptomatic and asymptomatic urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** **39:** 546-51, 1983.
- Hugues, C.; Phillips, R. and Roberts, A. P. Serum resistance among *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in relation to O type and the carriage of hemolysin, colicin, and antibiotic resistance determinants. **Infect. Immun.** **35:** 270-5, 1982.
- Hull, S. I.; Hull, R. A., Minshew, B. H. and Falkow, S. Genetics of hemolysin of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** **151:** 1006-12, 1982.
- Jonas, D.; Schultheis, B.; Klas, C.; Krammer, P. H. and Bhakdi, S. Cytocidal effects of *Escherichia coli* hemolysin on human T lymphocytes. **Infect. Immun.** **61:** 1715-21, 1993.

- Karmali, M. A.; Petric, M.; Lim, C. Cheung, R. and Arbus, G. S. Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use colony sweeps and polymycin extraction of verotoxin. **J. Clin. Microbiol.** **22:** 614-9, 1985.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature** **277:** 680-5, 1970.
- Lebek, G. and Gruenig, H-M. Relation between the hemolytic property and iron metabolism in *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** **50:** 682-6, 1985.
- Lovell, R. and Rees, T. A. A filterable haemolysin from *Escherichia coli*. **Nature** **188:** 755-6, 1960.
- Ludwig, A.; Garcia, F.; Bauer, S.; Jarchau, T.; Benz, R.; Hoppe, J. and Goebel, W. Analysis of the *in vivo* activation of hemolysin (HlyA) from *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** **178:** 5422-30, 1996.
- Ludwig, A.; Jarchau, T. Benz, R. and Goebel, W. The repeat domain of *Escherichia coli* haemolysin (Hly A) is responsible for its Ca<sup>2+</sup>-dependent binding to erythrocytes. **Mol. Gen. Genet.** **214:** 553-61, 1988.
- Ludwig, A., Schmid, A., Benz, R. and Goebel, W. Mutations affecting pore formation by haemolysin from *Escherichia coli*. **Mol. Gen. Genet.** **226:** 198-208, 1991.
- Ludwig, A.; Vogel, M. and Goebel, W. Mutations affecting activity and transport of haemolysin in *Escherichia coli*. **Mol. Gen. Genet.** **206:** 238-45, 1987.

- Mackman, N. and Holland, I. B. Secretion of a 107 K Dalton polypeptide into the medium from a haemolytic *E. coli* K12 strain. **Mol. Gen. Genet.** **193:** 312-5, 1984.
- 
- Mackman, N.; Nicaud, J. M.; Gray, L. and Holland, I. B. Identification of polypeptides required for the export of haemolysin 2001 from *E. coli*. **Mol. Gen. Genet.** **201:** 529-36, 1985.
- Mackman, N.; Nicaud, J. M.; Gray, L. and Holland, I. B. Secretion of haemolysin of *Escherichia coli*. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** **125:** 159-81, 1986.
- MacLeod, D. L. and Gyles, C. L. Purification and characterization of an *Escherichia coli* Shiga-like toxin II variant. **Infect. Immun.** **58:** 1232-9, 1990.
- Miller, J. H. Experiments in molecular biology. Cold Spring: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.
- Minshew, B. H.; Jorgensen, J.; Counts, G. W. and Falkow, S. Association of hemolysin production, hemagglutination of human erythrocytes, and virulence for chicken embryos of extraintestinal *Escherichia coli* isolates. **Infect. Immun.** **20:** 50-4, 1978.
- 
- Miyake, M.; Honda, T. and Miwatani, T. Purification and characterization of *Vibrio metschnikovii* cytolysin. **Infect. Immun.** **56:** 954-60, 1988.
- Moayeri, M. and Welch, R. A. Effects of temperature, time, and toxin concentration on lesion formation by the *Escherichia coli* hemolysin. **Infect. Immun.** **62:** 4124-34, 1994.

- Mobley, H. L. T.; Green, D. M.; Trifillis, A. L.; Johnson, D. E.; Chippendale, G. R.; Lockatell, C. V.; Jones, B. D. and Warren, J. W. Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. **Infect. Immun.** **58**: 1281-89, 1990.
- Nicaud, J-M.; Mackman, N.; Gray, L. and Holland, I. B. Regulation of haemolysin synthesis in *E. coli* determined by Hly genes of human origin. **Mol. Gen. Genet.** **199**: 111-6, 1985.
- O'Brien, A., Melton, A. R.; Schmitt, C. K.; McKee, M. L.; Batts, M. L. and Griffin, D. E. Profile of *Escherichia coli* O57:H7 pathogen responsible for hamburger-borne outbreak of hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome in Washington. **J. Clin. Microbiol.** **31**: 2799-801, 1993.
- O'Hanley, p.; Lalonde, G. and Ji, G. Alpha-hemolysin contributes to the pathogenicity of piliated digalactoside-binding *Escherichia coli* in the kidney: efficacy of an alpha hemolysin vaccine in preventing renal injury in the BALB/c mouse model of pyelonephritis. **Infect. Immun.** **59**: 1153-61, 1991.
- Orepeza-Wekerle, R.-L.; Speth, W.; Imhof, B.; Gentschev, I. and Goebel, W. Translocation and compartmentalization of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA). **J. Bacteriol.** **172**: 3711-17, 1990.
- Ostalaza, H.; Bartalome, B.; Ortiz de Zarate, I.; De la Cruz, F. and Goñi, F. M. Release of vesicle contents by the bacterial protein toxin  $\alpha$ -haemolysin. **Biochim. Biophys. Acta** **1147**: 81-8, 1993.

- Ostalaza, H.; Bartalome, B.; Serra, J. L.; De la Cruz, F. and Goñi, F. M.  $\alpha$ -Haemolysin from *E. coli*. Purification and self-aggregation properties. **FEBS Lett.** **280**: 195-8, 1991.
- Parreira, V. R. Caracterização de uma citotoxina produzida por amostras de *Escherichia coli* de origem aviária. São Paulo, 1998. [Dissertação de Doutorado - I.C.B.- Universidade de São Paulo].
- Prada, J.; Baljer, G.; de Rycke, J.; Steinrueck, H.; Zimmermann, S.; Stephan, R. and Beutin, L. Characteristics of alpha-hemolytic strains of *Escherichia coli* isolated from dogs with gastroenteritis. **Vet. Microbiol.** **29**: 59-73, 1991.
- Pohl, P. Les *Escherichia coli* verotoxinogènes isolées des bovins. **Ann. Med. Vet.** **135**: 569-76, 1991.
- Pohl, P.; Lintermans, P; Mainil, J. Daube, G. and Kaeckenbeeck, A. Enterohaemolysin and Shiga-like toxin genes in *E. coli*. **Vet. Rec.** **125**: 585, 1990.
- Rennie, R. P. and Arbuthnott, J. P. Partial characterization of *Escherichia coli* haemolysin. **J. Med. Microbiol.** **7**: 179-88, 1974.
- Rennie, R. P.; Freer, J. H. and Arbuthnott, J. P. The kinetics of erythrocyte lysis by *Escherichia coli* haemolysin. **J. Med. Microbiol.** **7**: 189-95, 1974.
- Robinson, G. L. The haemolytic of *Bacterium coli*. **J. Gen. Microbiol.** **5**: 788-92, 1951.

Sakurai, J.; Matsuzaki, A. and Miwatani, T. Purification and characterization of thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. **Infect. Immun.** **8**: 775-80, 1973.

---

Saridakis, H. O.; El Gared, S. A., Vidotto, M. and Guth, B. E. C. Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic (EPEC) serogroups isolated from calves with diarrhea. **Vet. Microbiol.** **54**: 145-53, 1997.

Schmidt, H.; Beutin, L. and Karch, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. **Infect. Immun.** **63**: 1055-61, 1995.

Schmidt, H.; Karch, H. and Beutin, L. The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli*  $\alpha$ -hemolysin family. **FEMS Microbiol. Lett.** **117**: 189-96, 1994.

Scotland, S. M.; Willshaw, G. A., Smith, H. R. and Rowe, B. Properties of strains of *Escherichia coli* O26:H11 in relation to their enteropathogenic or enterohemorrhagic classification. **J. Infect. Dis.** **162**: 1069-74, 1990.

---

Shinoda, S.; Ishida, K.; Oh, E.-G.; Sasahara, K.; Miyoshi, S.; Chowdhury, M. A. R. and Yasuda, T. Studies on hemolytic action of a hemolysin produced by *Vibrio mimicus*. **Microbiol. Immunol.** **37**: 405-9, 1993.

Short, E. C. and Kurtz, H. Properties of the hemolytic activities of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** **3**: 678-87, 1971.

Smith, H. W. The haemolysins of *Escherichia coli*. **J. Pathol. Bacteriol.** **85**: 197-211, 1963.

---

Smith, H. W.; Green, P. and Parsell, Z. Vero cells toxins in *Escherichia coli* and related bacteria: Transfer by and conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens and pigs. **J. Gen. Microbiol.** **129**: 3121-37, 1983.

Smith, H. W. and Halls, S. The transmissible nature of the genetic factor in *Escherichia coli* that controls haemolysin production. **J. Gen. Microbiol.** **47**: 153-61, 1967.

Smith, H. W. and Huggins, M. B. The toxic role of alpha-haemolysin in the pathogenesis of experimental *Escherichia coli* infection in mice. **J. Gen. Microbiol.** **131**: 395-403, 1985.

Smith, H. W. and Linggood, M. A. Observations on the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhoea. **J. Med. Microbiol.** **4**: 467-85, 1971.

Snyder, I. S., and Zwadyk, P. Some factors affecting production and assay of *Escherichia coli* haemolysins. **J. Gen. Microbiol.** **55**: 139-43, 1969.

Stroeher, U. H.; Bode, L.; Beutin, L. and Manning, P. A. Characterization and sequence of a 33-KDa enterohemolysin (EHly1)-associated protein in *Escherichia coli*. **Gene** **132**: 89-94, 1993.

Tabouret, M. and de Rycke, J. Detection of cytotoxin necrotising factor (CNF) in extracts of *E. coli* strains by enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Med. Microbiol.** **32**: 73-81, 1990.

- Turner, W. H. and Pickard, D. J. A new haemolysin from *Staphylococcus aureus* which lyses horse erythrocytes. **J. Gen. Microbiol.** 116: 237-41, 1980.
- Van Den Bosch, J. F.; Postma, P.; Graaff, J. and MacLaren, D. M. Determination of the  $\alpha$ -haemolysin activity of haemolytic urinary *Escherichia coli* strains. **FEMS Microbiol. Lett.** 8: 75-7, 1980.
- Wagner, W. Kuhn, M. and Goebel, W. Active and inactive forms of hemolysin (HlyA) from *Escherichia coli*. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler** 369: 39-46, 1988.
- Wagner, W.; Vogel, M.; and Goebel, W. Transport of hemolysin across the outer membrane of *Escherichia coli* requires two functions. **J. Bacteriol.** 154: 200-10, 1983.
- Walton, J. R. and Smith, D. H. New hemolysin ( $\gamma$ ) produced by *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 98: 304-5, 1969.
- Wandersman, C. and Delepelaire, P. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. **Proc. Nat. Aca. Sci. USA** 87: 4776-80, 1990.
- Welch, R. A., Dellinger, E. P.; Minshew, B. and Falkow, S. Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections. **Nature** 294: 665-7, 1981.
- Welch, R. A.; Hull, R. and Falkow, S. Molecular cloning and physical characterization of a chromosomal hemolysin from *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 42: 178-86, 1983.

Wieler, L. H.; Bauerfeind, R and Baljer, G. Characterization of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (SLTEC) isolated from calves with and without diarrhoea. **Zentralbl. Bakteriol. Hyg. [A] 276: 243-53, 1992.**

---

Williams, P. H. Novel iron uptake system specified by Col V plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. **Infect. Immun. 26: 925-32, 1979.**

Wray, C.; Piercy, D. W. T.; Carrol, P. J. and Cooley. Experimental infection of neonatal pigs with CNF toxin producing strains of *Escherichia coli*. **Res. Vet. Sci. 54: 290-8, 1993.**

Yamamoto, K.; Al-Omani, M. Honda, T; Takeda. Y. and Miwatani, T. Non-O1 *Vibrio cholerae* hemolysin: Purification, partial characterization, and immunological relatedness to El Tor hemolysin. **Infect. Immun. 45: 192-6, 1984.**

Yoh, M.; Honda, T. and Miwatani, T. Purification and partial characterization of a *Vibrio hollisae* hemolysin that relates to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. **Can. J. Microbiol. 32: 632-6, 1986.**

---

Zhang, Y. L. & Sekura, R. D. Purification and characterization of the heat-labile toxin of *Bordetella pertussis*. **Infect. Immun. 59: 3754-59, 1991.**