

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

**Silvia Simi**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DE  
UMA HEMOLISINA DE BAIXO PESO MOLECULAR  
PRODUZIDA POR LINHAGEM CLÍNICA DE  
*Enterobacter cloacae***

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
DOUTOR em Genética e Biologia  
Molecular na área de MICROBIOLOGIA.

Orientador:

**Prof. Dr. Tomomasa Yano**

Co-orientador:

**Profa. Dra. Gleize V. Carbonell**

Campinas

2004

**Simi, Silvia**

Caracterização biológica de uma hemolisina de baixo peso molecular produzida por amostras clínicas de *Enterobacter cloacae*

Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Tomomasa Yano

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.

Instituto de Biologia.

1.Hemolisina. 2. Toxina. 3. Enterobacter. I. Yano, Tomomasa. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**DATA DA DEFESA: 14/04/2004**

**BANCA EXAMINADORA**

***Titulares:***

Prof. Dr. Tomomasa Yano (Orientador) \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini \_\_\_\_\_

Dra. Rosabel Falcón Marquez \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Clarice Weis Arns \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Maria Silvia V. Gatti \_\_\_\_\_

***Suplentes:***

Dra. Cleide Ferreira Catani \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Wanderlei Dias da Silveira \_\_\_\_\_

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Para a sua realização nos foi concedida bolsa de doutorado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (00/00169-5).

*"A coisa mais bela que podemos  
experimentalizar é o mistério. Essa é a  
fonte de toda a arte e ciências  
verdadeiras."*

*Albert Einstein*

## ***Agradecimentos***

Ao meu orientador, Prof. Dr. *Tomomasa Yano*, por todo apoio e empenho no desenvolvimento deste trabalho em todas as fases de sua concepção e realização, por sua amizade, confiança e incentivo oferecidos durante todos estes anos.

À Dra. *Gleize V. Carbonell*, por sua co-orientação e importantes contribuições dadas a este trabalho e, é claro, por sua inestimável amizade.

À Profa. Dra. *Maria Silvia V. Gatti*, por seu apoio e valiosos ensinamentos, por suas correções e participação na Banca Examinadora da Pré-Defesa.

Ao Prof. Dr. *Paulo P. Joazeiro* por sua colaboração, disponibilidade constante, sugestões e, participação na Banca Examinadora da Pré-Defesa.

À Prof. Dra. *Elisabeth Pelosi Teixeira*, por seu carinho, incentivo e amizade desde o início da minha atividade científica e por seu auxílio na conclusão final deste trabalho como Banca Examinadora da Pré-Defesa.

Aos Doutores, *Ana Lúcia Darini*, *Rosabel Falcón Marquez*, *Clarice Weis Arns*, *Maria Sílvia V. Gatti*, *Wanderley D. da Silveira* e *Cleide F. Catani* pela colaboração e participação como membros da Banca Examinadora definitiva.

Aos professores e colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP pelos ensinamentos e auxílio na realização deste trabalho.

Aos Professores Drs. *Sérgio Marangoni* e *José Camilo Novello* pelo empréstimo de equipamentos para a purificação da hemolisina estudada e agradeço a disponibilidade e boa vontade dos funcionários Paulinho e Marino deste laboratório.

Ao Prof. Dr. *Marcos Eberlin* e ao Dr. *Leonardo Silva Santos* do Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas, do Instituto de Química da Unicamp, pela disponibilidade constante nos experimentos de espectrometria de massas.

Ao Dr. *Domingos da Silva Leite*, por suas sugestões e empréstimo de equipamentos e materiais e aos colegas desse laboratório *Alex, Claudia, Erivaldo, Monique, Patrícia*, pelo alegre convívio e colaboração neste trabalho.

Aos colegas do laboratório, *Aldo, Ana Claudia, Ana Rita, Carol Yaeko, Claudio Amorín, Claudio Ventura, Daniel, Daniela, Jaqueline, Jane Martha, Lucinha, Márcia Regina, Márcia Tommy, Márcia Amaducci, Mariana, Patrícia, Rosimary*. Agradeço a troca de experiências que enriqueceram a minha vida.

Aos funcionários *Ana Soledade, Sandra e Evandro* do Departamento de Microbiologia pelos auxílios prestados.

À secretárias *Lúcia e Lurdes* do Departamento de Microbiologia e Imunologia e às secretárias do curso de Pós-Graduação.

À *Stella*, por sua disponibilidade, assistência técnica, amizade e incentivo durante todos estes anos.

Aos amigos *Mário Paulo, Rosabel, Gleize, Cleide, Eneida, Luciano e Geórgio* pela agradável convivência e, principalmente, pelas alegrias, tristezas e carinho compartilhados nos inúmeros “cafés”.

Ao *César* por todo seu amor, confiança e por constantemente me incentivar.

Aos meus pais, *Claudio e Marielene* pelos inestimáveis ensinamentos de vida. E ao meu irmão *Marcelo* pelo apoio.

À FAPESP, pelos subsídios financeiros aplicados nesta pesquisa.

## Resumo

*Enterobacter cloacae* tem se destacado como importante agente etiológico de infecções hospitalares. Neste estudo, sete de 50 linhagens clínicas de *E. cloacae* causaram hemólise parcial em ágar sangue preparado com hemácias de cavalo e carneiro. Das diferentes condições de cultivo testadas, o cultivo estacionário de *E. cloacae* em meio TSB suplementado com 0,5% de D-glicose em pH entre 7,0 e 7,5, proporcionou maior título de atividade hemolítica. A hemolisina foi parcialmente purificada por ultrafiltração (membrana PM-10), tratamento com acetona e cromatografia de fase reversa em HPLC, em coluna hidrofóbica C<sub>18</sub> preparativa, seguida por C<sub>18</sub> analítica. A hemolisina se mostrou termoestável (100°C, 30 min), solúvel em solventes orgânicos (etanol, metanol, acetona), resistente a enzimas proteolíticas (tripsina, proteinase K, pepsina) e estável em pH ácido (2,0-6,0). Porém, mostrou-se sensível em pH maior do que 7,0. EGTA (100 mM) inibiu a atividade hemolítica, enquanto o íon cálcio não alterou sua atividade biológica. Verificou-se que a hemolisina de *E. cloacae* é predominantemente extracelular e seu mecanismo de lise de eritrócitos eqüinos tem início após 1 min e alcança 100% em 30 min, não é temperatura dependente ocorrendo a 4, 25 e 37°C. Dos protetores osmóticos testados (adonitol, arabinose, frutose, galactose, glicose, inositol, maltose, manose, sacarose, sorbitol, dextran 4, rafinose) somente o dextran 4 inibiu a hemólise, sugerindo que os poros formados pela hemolisina de *E. cloacae* tenham um diâmetro ao redor de 3 a 4nm. A microscopia eletrônica de varredura de eritrócitos tratados com a hemolisina revelou perda do volume celular, alteração geral da membrana e presença de estruturas globulares na superfície celular. Estes resultados sugerem que a propriedade formadora de poros atua no mecanismo de ação da hemolisina de *E. cloacae*. Em testes *in vitro* com células Vero e de Glioma humano a hemolisina causou efeito citopático. Em jejuno de ratos e coelhos, pelo teste de alça ligada do intestino, a hemolisina causou acúmulo de fluido e induziu severas alterações morfológicas em células epiteliais intestinais de rato, como alteração da estrutura, fusão, atrofia e descamação das vilosidades. A análise ultraestrutural por microscopias de transmissão e varredura confirmou as lesões nas vilosidades, caracterizadas pela perda do volume e desarranjo estrutural. Como a produção de hemolisinas e enterotoxinas são considerados importantes fatores de virulência, a hemolisina-enterotóxica estudada pode ser um possível fator de virulência deste microrganismo.



## Abstract

*Enterobacter cloacae* have been recognized as important pathogen in recent years. In the present study, seven of 50 *E. cloacae* strains from clinical isolates produced partial hemolysis in horse and sheep blood agar plates. The *E. cloacae* culture in TSB pH 7.0-7.5 with 0.5% D-Glucose by stationary incubation at 37°C yielded the higher title of hemolysin. The hemolysin was partially purified from the culture supernatant of *E. cloacae* by ultrafiltration (PM-10 membrane), treatment with acetone and chromatography in HPLC on preparative C<sub>18</sub> followed by analytic C<sub>18</sub> resins. Hemolysin was thermostable (100°C, 30 min), soluble in organic solvents (acetone, ethanol, methanol), resistant to proteolytic enzymes (trypsin, proteinase K, pepsin) and stable in acid pH. However the hemolysin was sensible to pH greater than 7.0. EGTA inhibited the hemolytic activity, but the presence of CaCl<sub>2</sub> had no influence on its biological activity. The hemolysin was extracellular, the lysis of erythrocytes by hemolysin began after 30 s and reached 100% within 30 min, was not temperature dependent and occurred at 4, 25 and 37°C. Reduction with 2-mercaptoethanol did not alter the hemolytic activity, suggesting that this hemolysin is not thiol activated. Of the osmotic protectants tested (fructose, sorbitol, maltose, adonitol, mannose, inositol, raffinose, galactose, sucrose, glucose, dextran 4, arabinose) only dextran 4 inhibited the hemolysis, suggesting that the pores formed by *E. cloacae* hemolysin has radius around 3 to 4 nm. The scanning electron microscopy of the hemolysin-treated erythrocytes revealed a general architecture disarrangement of the cell membrane surface. This result suggests the possibility that the pore-forming properties of the hemolysin play a role in the mechanism of the hemolysis. In Vero and Human Glyoma cells hemolysin caused cytopathic effects. In the rat and rabbit jejunum in the intestinal loop assay, hemolysin caused fluid accumulation and induced severe damages in the mucosa, characterized by architecture disarrangement of intestinal epithelial cells atrophy, fusion and necrosis of the villus. Ultrastructural analysis by scanning and transmission microscopy confirms the general architecture disarrangement and detachment of the villus. These findings indicate that the studied *E. cloacae* produce a low-molecular mass heat-stable enterotoxic hemolysin smaller than 10 kDa that may be a putative virulence factor of this microorganism.

## Índice

<b>1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
2.1. Linhagens bacterianas.....	12
2.2. Detecção da atividade hemolítica.....	12
2.2.1. Pesquisa de hemolisina em meio sólido.....	12
2.2.2. Atividade hemolítica no sobrenadante de cultura (Teste em microplaca).....	12
2.3. Influência de diferentes condições de cultivo na expressão da hemolisina de <i>E. cloacae</i> .....	13
2.3.1. Cultivo em diferentes meios.....	13
2.3.2. Cultivo em TSB na presença de D-glicose.....	13
2.3.3. Valores de pH do meio de cultura.....	13
2.3.4. Diferentes condições atmosféricas de cultivo.....	13
2.3.5. Cultivo na presença de agentes quelantes e antibiótico.....	14
2.4. Purificação da hemolisina.....	14
2.4.1. Preparo da hemolisina bruta.....	14
2.4.1.1. Ultrafiltração com membrana PM-10.....	14
2.4.1.2. Tratamento com acetona.....	14
2.4.2. Processos cromatográficos (hemolisina semi-purificada).....	14
2.4.3. Determinação da concentração protéica.....	15
2.4.4. Análise eletroforética.....	15
2.4.4.1. Eletroforese em SDS-PAGE.....	15
2.4.4.2. Eletroforese em gel Tricina-SDS-PAGE.....	16
2.4.4.3. Coloração dos géis.....	16
2.5. Influência de tratamentos físico-químico sobre a atividade biológica da hemolisina.....	16
2.5.1. Teste de termoestabilidade.....	16
2.5.2. Estabilidade em diferentes valores de pH.....	17
2.5.3. Tratamento com solventes orgânicos.....	17
2.5.4. Efeito de enzimas proteolíticas.....	17
2.5.5. Atividade hemolítica na presença de quelantes e cálcio.....	17
2.5.6. Atividade hemolítica na presença de periodato de sódio.....	17

2.5.7. Tratamento com agente redutor 2-mercaptoetanol.....	17
2.6. Mecanismo de ação da hemolisina em eritrócitos.....	18
2.6.1. Teste de hemólise com protetores osmóticos.....	18
2.6.2. Inibição da atividade hemolítica por soro.....	18
2.6.3. Detecção da atividade hemolítica ligada à célula bacteriana.....	18
2.6.3.1. Rompimento das células bacterianas.....	18
2.6.3.2. Atividade hemoplítica do sobrenadante de cultura e células bacterianas em diferentes tempos e temperaturas de reação.....	18
2.6.4. Avaliação das alterações ultraestruturais induzidas pela hemolisina em hemácias eqüinas.....	19
2.7. Caracterização biológica da hemolisina de <i>E. cloacae</i> .....	19
2.7.1. Teste de toxicidade <i>in vitro</i> em diferentes culturas de células.....	19
2.7.1.1. Preparo da cultura celular.....	19
2.7.1.2. Teste de citotoxicidade.....	20
2.7.1.3. Coloração com azul de toluidina.....	20
2.7.1.3. Teste de viabilidade celular.....	21
2.7.2. Ensaio em animais.....	21
2.7.2.1. Teste de alça ligada em coelhos.....	21
2.7.2.2. Teste de alça ligada em ratos.....	22
2.7.2.3. Teste em camundongos recém-nascidos.....	22
2.7.2.4. Ensaio em pele de coelho.....	23
2.7.2.5. Letalidade em camundongos.....	23
2.7.3. Estudo das alterações morfológicas em células epiteliais de rato.....	23
2.7.3.1. Microscopia de luz.....	23
2.7.3.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	24
2.7.3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	24
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
3.1. Detecção da atividade hemolítica.....	26
3.1.1. Pesquisa de hemolisina em meio sólido.....	27
3.1.2. Atividade hemolítica no sobrenadante de cultura.....	27
3.2. Influência de diferentes condições de cultivo na expressão da hemolisina de <i>E. cloacae</i> .....	27
3.2.1. Influência de agentes quelantes e antibiótico.....	28

3.3. Purificação da hemolisina.....	30
3.3.1. Produção da hemolisina bruta.....	30
3.3.1.1. Ultrafiltração do sobrenadante de cultura.....	30
3.3.1.2. Precipitação com acetona.....	30
3.3.2. Processos cromatográficos (hemolisina semi-purificada).....	30
3.3.3. Determinação da concentração protéica.....	31
3.3.4. Análise eletroforética.....	31
3.4. Influência de tratamentos físico-químicos sobre a atividade biológica da hemolisina.....	33
3.5. Caracterização do mecanismo de ação da hemolisina de <i>E. cloacae</i> em eritrócitos.....	35
3.5.1. Proteção osmótica da hemólise por diferentes carboidratos.....	35
3.5.2. Inibição da atividade hemolítica por soro.....	36
3.5.3. Detecção da atividade hemolítica ligada à célula bacteriana.....	36
3.5.3.1. Rompimento das células bacterianas por ultrassom.....	36
3.5.3.2. Ensaio líquido de hemólise e influência da temperatura de reação.....	36
3.5.4. Estudo das alterações ultraestruturais induzidas pela hemolisina em hemácias eqüinas.....	37
3.6. Caracterização biológica da hemolisina de <i>E. cloacae</i> .....	39
3.6.1. Testes de toxicidade <i>in vitro</i> .....	39
3.6.1.1. Efeito citopático da hemolisina de <i>E. cloacae</i> em células Vero.....	39
3.6.1.2. Ensaio de viabilidade celular em células Vero e NG 97.....	39
3.6.2. Atividade biológica <i>in vivo</i> .....	42
3.6.2.1. Teste de alça ligada em intestino de coelhos e ratos.....	42
3.6.2.2. Teste em camundongos recém-nascido, dorso de coelhos e letalidade em camundongos.....	43
3.6.3. Alterações morfológicas induzidas pela hemolisina de <i>E. cloacae</i> em células epiteliais intestinais de rato.....	44
3.6.3.1. Microscopia de luz.....	44
3.6.3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	46
3.6.3.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	48
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>63</b>

## Índice de figuras

<b>FIGURA 1.</b>	Perfil de eluição obtido em cromatografia de fase reversa em HPLC em resina hidrofóbica C <sub>18</sub> preparativa, usando um gradiente linear (0–100%) de acetronitrila 66% em TFA 1,5%. O traço vermelho indica o pico com atividade hemolítica.....	32
<b>FIGURA 2.</b>	Perfil de eluição obtido em cromatografia de fase reversa em HPLC em resina hidrofóbica C <sub>18</sub> analítica, usando um gradiente linear (0–100%) de acetronitrila 66% em TFA 1,5%. O traço vermelho indica o pico com atividade hemolítica.....	32
<b>FIGURA 3.</b>	Aspectos ultraestruturais de eritrócitos eqüinos tratados com dose sublítica de hemolisina semi-purificada de <i>E. cloacae</i> EC118 por 10 min, utilizando MEV.....	38
<b>FIGURA 4.</b>	Fotomicrografia do efeito biológico produzido pela hemolisina da linhagem EC118 em células Vero.....	40
<b>FIGURA 5.</b>	Cinética de morte celular provocada pela hemolisina produzida por <i>E. cloacae</i> em cultura de células Vero. Após 48 h de tratamento com a hemolisina nas diferentes diluições indicadas, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico com o vermelho neutro.....	41
<b>FIGURA 6.</b>	Cinética de morte celular provocada pela hemolisina semi-purificada de <i>E. cloacae</i> em cultura de células NG 97. Após 48 h de tratamento com a hemolisina nas diferentes diluições indicadas, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico com o vermelho neutro.....	41
<b>FIGURA 7.</b>	Fotomicrografia dos cortes histológicos das alças de ratos após tratamento com hemolisina semi-purificada de <i>E. cloacae</i> (Simi <i>et al.</i> , 2003).....	45
<b>FIGURA 8.</b>	Análise ultraestrutural das alças de ratos tratadas com hemolisina semi-purificada através de MEV.....	46
<b>FIGURA 9.</b>	Microscopia eletrônica de varredura das células epiteliais intestinais de rato tratadas com hemolisina semi-purificada de <i>E. cloacae</i> .....	47
<b>FIGURA 10.</b>	Aspectos ultraestruturais obtidos na mucosa intestinal de ratos após o tratamento com a hemolisina semi-purificada de <i>E. cloacae</i> , utilizando MET.....	48

## Índice de tabelas

<b>TABELA 1.</b>	Expressão da hemolisina de <i>E. cloacae</i> em placas TSA-sangue com diferentes hemácias, observada em diferentes tempos de cultivo.....	26
<b>TABELA 2.</b>	Título de atividade hemolítica do sobrenadante de cultura de <i>E. cloacae</i> com eritrócitos de diferentes origens animais.....	27
<b>TABELA 3.</b>	Títulos de atividade hemolítica obtidos no cultivo da linhagem de <i>E. cloacae</i> EC118 em diferentes condições de cultivo.....	29
<b>TABELA 4.</b>	Etapas de purificação da hemolisina de <i>E. cloacae</i> EC118.....	31
<b>TABELA 5.</b>	Títulos de atividade hemolítica em hemácias eqüinas da hemolisina de <i>E. cloacae</i> sob diferentes tratamentos físico-químicos.....	34
<b>TABELA 6.</b>	Títulos de atividade hemolítica de <i>E. cloacae</i> na presença de diferentes carboidratos.....	35
<b>TABELA 7.</b>	Deteção da atividade hemolítica ligada à célula bacteriana de <i>E. cloacae</i> , em diferentes temperaturas e períodos de incubação.....	37
<b>TABELA 8.</b>	Resultados obtidos no teste de alça ligada intestinal de coelho e rato e coeficientes RIL obtidos no teste de alça ligada de coelho.....	42
<b>TABELA 9.</b>	Resultados da caracterização biológica <i>in vivo</i> da hemolisina de <i>E. cloacae</i> em diferentes sistemas.....	43

## ***Lista de abreviaturas***

<b>ATV</b>	Associação tripsina-versene
<b>BHI</b>	Infusão de cérebro e coração
<b>CDT</b>	Toxina citoletal distensora
<b>CN</b>	Caldo nutriente
<b>CNF</b>	Fator necrosante citotóxico
<b>EAST</b>	Enterotoxina termoestável de <i>E. coli</i> enteroagregativa
<b>EDDA</b>	Etileno-di (o-hidroxifenol) ácido acético
<b>EDTA</b>	Etilenodiamina-tetra ácido acético
<b>EGTA</b>	Etileno glicol-bis $\beta$ -aminoetil éter
<b>ETEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
<b>HEp-2</b>	Células de carcinoma de laringe humana
<b>HI</b>	Infusão de coração
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta performance
<b>LB</b>	Meio Luria Bertani
<b>LT</b>	Toxina termolábil
<b>MEM</b>	Meio mínimo essencial de Eagle
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>MET</b>	Microscopia eletrônica de transmissão
<b>MM</b>	Meio mínimo
<b>NG 97</b>	Células de glioma humano
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salina
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>ST</b>	Toxina termoestável
<b>STX</b>	Toxina de shiga
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil) aminometano
<b>TSA</b>	Ágar tríptico de soja
<b>TSB</b>	Caldo tríptico de soja
<b>2ME</b>	2-mercaptoetanol

# ***Introdução e Objetivos***



## **1. Introdução e Objetivos**

*Enterobacter cloacae*, bacilos Gram-negativos que pertencem à tribo *Klebsiellae*, são móveis por flagelos peritríqueos, anaeróbicos facultativos, fermentam a glicose com produção de ácido e gás, são positivos no ensaio em Voges-Proskauer, assimilam o citrato e são negativos no teste de vermelho de metila (Sanders & Sanders, 1997). Em razão da produção de grande quantidade de gás, por muitos anos essa bactéria foi denominada de *Aerobacter aerogenes*, sendo a designação alterada para *Enterobacter* por Hormaeche & Edwards em 1960.

*Enterobacter cloacae* é uma bactéria amplamente distribuída na natureza, ocorrendo nos mais variados ambientes incluindo, entre outros, a superfície de plantas, frutos e legumes, água de fontes e esgotos, solos, insetos, ambiente hospitalar. É também comensal na pele e no trato intestinal do homem e animais (Andresen *et al.*, 1994; Sanders & Sanders, 1997).

As espécies de *Enterobacter* receberam destaque no início dos anos 70, quando sepses causadas por esse microrganismo ocorreram em 25 hospitais americanos atingindo 378 pacientes que estavam recebendo soluções intravenosas contaminadas (Chow *et al.*, 1994). Dados obtidos no “National Nosocomial Infections Surveillance System” (NNIS) nos Estados Unidos, entre 1976 a 1989, mostraram que *Enterobacter* spp. estavam envolvidas em 5 a 7% dos casos de bacteremias (Jarvis *et al.*, 1984). Porém, outros dados mostram que a importância deste microrganismo como um patógeno nosocomial vem aumentando (Jarvis & Martone, 1992). Estudos realizados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) dos Estados Unidos revelaram que a *Enterobacter* spp. é o terceiro patógeno isolado do trato respiratório (11%), o quarto mais isolado de feridas cirúrgicas (10%), o quinto comumente recuperado do trato urinário (6%) e o quinto mais isolado do sangue (5%) (Jarvis & Martone, 1992).

Sucessivos estudos vêm demonstrando que *E. cloacae* tem se destacado como importante agente etiológico de infecções hospitalares (National Survey of Infection in Hospitals, 1981; Gallagher, 1990), causando infecções do trato respiratório e urinário, infecções em feridas cirúrgicas e, em certos casos, sepse e meningite (Sanders & Sanders, 1997). Dados da literatura revelam surtos de infecção em unidades de terapia intensiva para neonatos, unidades cardíacas de tratamento intensivo, centros cirúrgicos e unidades de queimados (Haertl & Bandlow, 1993).

As infecções em corrente sanguínea após cirurgias cardíacas constituem uma

complicação pós-operatória bem conhecida, com dados da literatura demonstrando de 12,4 a 34,3 casos por 1000 procedimentos realizados. Em estudo realizado com nove pacientes submetidos a cirurgia cardíaca, e que tiveram bacteremia por bactérias Gram-negativas, foi demonstrada a presença dos seguintes microrganismos: *Enterobacter cloacae* (6 casos), *Pseudomonas aeruginosa* (5 casos), *Klebsiella pneumoniae* (3 casos), *Serratia marcescens* (2 casos) e *Klebsiella oxytoca* (1 caso); cinco dos nove pacientes em estudo tiveram bacteremia polimicrobiana (Rudnick *et al.*, 1996). Segundo Falkiner (1992) a *E. cloacae* vem se tornando a causa mais comum de bacteremia em pacientes neutropênicos. Relatos de bacteremia por *E. cloacae* são ocasionais (Mayhall *et al.*, 1979; Buchard *et al.*, 1986).

Dados da literatura ilustram surtos nosocomiais polimicrobianos em corrente sanguínea causados por *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas aeruginosa* (Archibald *et al.*, 1998).

A epidemiologia molecular de surtos nosocomiais causados por *E. cloacae* tem sido bem documentada em anos recentes (Garaizar *et al.*, 1991; Grattard *et al.*, 1994). Isto, porém, não é o caso nos países em desenvolvimento, onde as infecções nosocomiais constituem um problema crescente e ainda pouco estudado. O poder discriminatório das técnicas de fenotipagem não é adequado para as análises epidemiológicas de surtos causados por *E. cloacae*, aumentando as dificuldades de realização dos estudos epidemiológicos em países em desenvolvimento, onde os recursos limitados restringem o uso rotineiro de técnicas moleculares (van Nierop *et al.*, 1998).

No Brasil, este microrganismo tem sido considerado importante devido a surtos de infecção hospitalar (Gonçalves *et al.*, 2000; Kuboyama *et al.*, 2003). Em 1985, foi relatado 34% de predominância do grupo *Klebsiella/Enterobacter* em crianças hospitalizadas no Rio de Janeiro (Herdy *et al.*, 1985). Um estudo realizado na unidade neonatal da UNICAMP demonstrou que 32% dos pacientes estavam colonizados por cepas multiresistentes de *E. cloacae* (Calil *et al.*, 2001). Em 1995 e 1997 *E. cloacae* foi associada a óbitos de neonatos em unidades do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) e Hospital de Clínicas (HC) da Unicamp, devido nutrição parenteral contaminada (Pisani *et al.*, 1997). Ribeiro & Moreira (1999) descreveram que a *E. cloacae* foi 4º bactéria mais prevalente nos casos de sepse em crianças em estudo durante 1993-1994, no hospital infantil Albert Sabin do Ceará.

No ambiente hospitalar, amostras de *E. cloacae* têm sido encontradas contaminando várias soluções e equipamentos hospitalares, bem como água destilada e soluções de limpeza (Chow *et al.*, 1994).

Os fatores predisponentes à bacteremia por *E. cloacae* nos pacientes, em geral incluem diabetes, neoplasias, neutropenia e hospitalização, particularmente em pacientes expostos à terapia antimicrobiana e a procedimentos invasivos como cateteres venosos-centrais. Há, ainda, relatos de disseminação do microrganismo pelas mãos dos profissionais da saúde e também vias soluções endovenosas (Tresoldi *et al.*, 2000).

Embora infecções por *Enterobacter* na comunidade possam ocorrer, a maioria das infecções por essas bactérias são nosocomiais (Karnad *et al.*, 1987). A infecção por *E. cloacae* pode ter origem endógena (a própria microflora do paciente, especialmente do trato gastrointestinal) ou exógena (resultando da natureza ubíqua dessa bactéria) (Flynn *et al.*, 1987; Falkiner, 1992). Flynn *et al.* (1987) e Andersen *et al.* (1989) relataram casos de infecção por *E. cloacae* em pacientes que sofreram cirurgias cardíacas e chegaram a conclusão que as infecções se originaram tanto da microflora dos pacientes como de infecção cruzada.

Johnson & Ramphal (1990) relataram, por sua vez, que pacientes submetidos a terapia antimicrobiana contraíram infecção por *E. cloacae* possivelmente de materiais utilizados na administração destas soluções. Porém, Flynn *et al.* (1987) indicaram que a frequência de infecções por *E. cloacae* em pacientes pós-operatório é maior quando originada da microflora do paciente.

A partir da década de 80, fazendo-se uso de metodologias para análise do perfil plasmidial de amostras de *E. cloacae*, observou-se que surtos de origem comum por esse microrganismo são pouco frequentes, predominando os relatos de infecção cruzada (Falkiner, 1992).

Estes microrganismos são naturalmente resistentes a vários antimicrobianos e têm a habilidade de rapidamente adquirir genes de resistência a cefalosporinas e penicilinas. Surtos por esses microrganismos nas Unidades de Terapia Intensiva causam uma significativa morbidade e mortalidade, pois o controle da infecção é complicado pela sua resistência a múltiplos antimicrobianos (Andersen *et al.*, 1994; Sanders & Sanders, 1997).

*Enterobacter cloacae* possui genes cromossômicos para  $\beta$ -lactamases que podem ser induzidos por certos antimicrobianos. Ao contrário das  $\beta$ -lactamases mediadas por plasmídios, essas enzimas não são normalmente expressas. O gene é ativado e a enzima é expressa apenas sob influência de um indutor, ou após mutação. Portanto, esses microrganismos portadores de genes para  $\beta$ -lactamases induzíveis podem mostrar uma falsa sensibilidade quando estudados em estado não-induzido. Desse modo, antimicrobianos, como cefalosporinas de terceira geração, são geralmente evitados durante

o tratamento da infecção por *E. cloacae*, pois mutantes resistentes podem aparecer rapidamente (Sanders & Sanders, 1997).

As amostras de *E. cloacae* são patógenos oportunistas e raramente causam doenças em indivíduos sadios. Como oportunistas que recentemente se tornaram importante causa de infecção hospitalar, os mecanismos envolvidos na patogenicidade deste microrganismo ainda não estão bem esclarecidos, sendo que poucos trabalhos relatam seus fatores de virulência. Recentemente, Keller *et al.* (1998) estudando os fatores de virulência em *E. cloacae*, observaram que a maioria das amostras analisadas apresentavam resistência sérica, produziam aerobactina e hemaglutinação do tipo manose-sensível e todas as amostras aderiram e invadiram células HEp-2 (carcinoma de laringe humana). Além disso, estudos realizados em nosso laboratório com *E. cloacae* isoladas de humanos, demonstraram a adesão do tipo agregativa e resistência à D-manose em diferentes linhagens celulares, o que se assemelha à adesão mediada por amostras de *Escherichia coli* enteroagregativa (Namasu *et al.*, 2004, artigo submetido à publicação).

As toxinas bacterianas têm sido definidas como substâncias que alteram o metabolismo normal das células do hospedeiro, com efeitos prejudiciais ao mesmo, e representam o mais potente fator de virulência bacteriano (Popoff, 1998). Entretanto, existem poucos relatos na literatura sobre a produção de toxinas por *E. cloacae* e, até o momento, estas não estão claramente definidas.

Sendo microrganismos Gram-negativos, as espécies de *Enterobacter* possuem endotoxina e, dessa forma, possuem todas as propriedades de patogenicidade relacionadas a este fator de virulência (Bone, 1993).

Outro fator de virulência discutido em *E. cloacae* é a produção de hemolisinas (Prada & Beutin, 1991; Barnes *et al.* 1997, 2001; Albesa *et al.*, 2000). Hemolisinas produzidas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas representam um grupo de toxinas bacterianas que, diferentemente de muitas outras toxinas, não são internalizadas pelas células mamárias, atuando como agentes ativos de membrana levando à lise e morte celular (Gordon *et al.*, 1989). Além de lisarem eritrócitos, as hemolisinas podem também lisar outras células eucarióticas como fibroblastos humanos, monócitos, granulócitos e células endoteliais (Jürgens *et al.*, 2002).

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 com a célula, foi chamado de  $\beta$ -hemolisina. Ambas  $\alpha$ - e  $\beta$ -hemolisinas provocam hemólise com zonas claras de lise ao redor das colônias bacterianas em meio de ágar-sangue, podendo ser detectadas após 3 h de incubação.

A síntese de hemolisinas pode ser dependente de uma série de fatores presentes no meio de cultura (Mackman *et al.*, 1986). Em presença de quelantes de ferro, a atividade hemolítica de algumas amostras de *E. coli* aumenta (Mackman *et al.*, 1986). O cálcio foi descrito como sendo essencial para a ativação da  $\alpha$ -hemolisina, para a sua estabilidade e para a ligação da toxina às membranas dos eritrócitos (Boehm *et al.*, 1990).

O mecanismo de ação das hemolisinas na membrana da célula alvo varia, podendo ser enzimático que degrada os lipídeos da membrana, como no caso da fosfolipase da *Pseudomonas aeruginosa* (Chakraborty *et al.*, 1987), formador de poros, como as toxinas RTX (Welch, 1991), tiol-ativadas (Braun & Focareta, 1991) ou ainda, agir como surfactantes, que solubilizam a membrana celular por sua ação detergente, como a delta toxina do *Staphylococcus aureus* (Rowe & Welch, 1994).

As hemolisinas formadoras de poros atuam formando poros nas membranas das células alvo, causando a lise osmótica celular pelo influxo de água. O influxo de água pode ser prevenido por açúcares e polissacarídeos (Bhakdi *et al.*, 1986), sendo a proteção contra a lise proporcional ao tamanho molecular e concentração do mesmo. Para que a proteção ocorra, o tamanho molecular do agente protetor deve ser maior do que o tamanho do poro formado pela toxina (Rowe & Welch, 1994). Bhakdi *et al.* (1986) descreveram que 30 mM de dextran 4, com um diâmetro molecular de aproximadamente 3 nm, previne a lise de eritrócitos pela  $\alpha$ -hemolisina de *E. coli*, enquanto que 30 mM de sucrose (0,9 nm) ou rafinose (1,3 nm) não oferecem proteção.

A família de hemolisinas tiol-ativadas é um proeminente grupo de toxinas bacterianas, do qual mais de 20 espécies de bactérias Gram-positivas fazem parte, sendo a Estreptolisina O (SLO) o protótipo deste grupo. A principal característica do grupo, é a sensibilidade da atividade citolítica ao oxigênio, e sua ativação por agentes redutores (tiol-ativação), sendo o colesterol o principal receptor para esta toxina (Billington *et al.*, 2000).

O primeiro relato da produção de hemolisinas em amostras de *E. cloacae* foi realizado por Prada & Beutin (1991), que estudando amostras fecais de 200 crianças, identificaram em ensaios com anticorpos monoclonais e hibridização, uma amostra de *E. cloacae* que

expressava a  $\alpha$ -hemolisina de *E. coli*. Os autores relataram ainda que o gene da  $\alpha$ -hemolisina de *E. cloacae* era cromossômico.

Dentro deste contexto, Barnes *et al.* (1997, 2001) e Albesa *et al.* (2000) reportaram uma toxina extracelular com atividade leucotóxica e hemolítica em *E. cloacae*. Os autores relataram ainda, que a toxina seria sensível ao oxigênio e que o efeito tóxico em leucócitos e hemácias somente era evidenciado pelo tratamento da cultura bacteriana com o agente redutor 2-mercaptoetanol. Com base neste dado, sugeriram que a citotoxina de *E. cloacae* por eles estudada era do tipo tiol-ativada. Entretanto, os autores não descreveram a atividade citotóxica desta toxina em linhagens de células em cultura.

Em outras bactérias patogênicas, as atividades hemolítica e enterotóxica podem aparecer juntas. Em *Aeromonas hydrophila*, Ljung *et al.* (1981) relataram a presença de atividade enterotóxica e a produção de hemolisinas em amostras isoladas de humanos. Barret & Blake (1981) examinaram a prevalência do *Vibrio cholerae* biotipo El Tor hemolítico, durante a sétima pandemia, pois este microrganismo enterotóxico foi historicamente caracterizado por sua habilidade de hemolisar.

Está bem estabelecido que *Escherichia coli* e outras bactérias Gram-negativas podem causar diarreia por produzirem enterotoxinas termoestáveis (ST) ou termolábeis (LT) (Back *et al.*, 1980). Portanto, o isolamento de algumas amostras de *E. cloacae* produtoras de enterotoxinas (Klipstein & Engert, 1976; Paton & Paton, 1996; Jolivet-Gougeon *et al.*, 1997) sugerem que este microrganismo possa agir como um patógeno entérico.

A enterotoxina termoestável (ST) resiste à temperatura de 100°C e é subdividida em STI e STII, ambas não imunogênicas. A toxina STI está associada com doenças humanas e de outros animais e apresenta massa molecular de 2 kDa (Thompson & Giannella, 1985). STI é solúvel em metanol, além de ser resistente às enzimas proteolíticas (Clements & Finkelstein, 1979), podendo ser identificada pelo teste do camundongo recém-nascido (Dean *et al.*, 1972). A toxina STII, por sua vez, está exclusivamente associada à diarreia em suínos, embora estudos recentes tenham demonstrado a presença de STII em casos de diarreia em humanos (Okamoto *et al.*, 1993). A toxina STII possui massa molecular de aproximadamente 5 kDa, sendo uma proteína insolúvel em metanol e sensível à tripsina, podendo ser identificada biologicamente através do teste em alça ligada de coelho (De, 1959).

A enterotoxina termolábil (LT) é inativada ao ser aquecida a 60°C por 15 min e também é subdividida em LTI e LTII. A LTI está associada a doenças tanto em humanos quanto em outros animais e está correlacionada sorologicamente com a toxina colérica,

produzida por *Vibrio cholerae*, apresentando cerca de 80% de homologia na sequência protéica. A LTI tem massa molecular entre 85 e 90 kDa e é codificada por um plasmídeo de alta massa molecular (Sears & Kaper, 1996). A identificação biológica de LTI pode ser realizada em testes de cultura de células ou em alça ligada de intestino de coelho (De, 1959). A toxina LTII está associada somente aos animais e apresenta massa molecular de aproximadamente 87 kDa. A LTII é ainda subdividida em LTIIa e LTIIb, tendo como base variações de antigenicidade. A LTII pode ser identificada através do aumento da permeabilidade celular em dorso de coelho (Sears & Kaper, 1996), no entanto, esta toxina não causa secreção em alça ligada de coelho (Holmes *et al.*, 1986).

Algumas enterotoxinas bacterianas, como por exemplo a LT de *E. coli*, provocam diarreia sem causar danos ao tecido intestinal, enquanto que outras, como a enterotoxina de *Clostridium perfringens*, induzem secreção de fluidos acompanhada de alterações morfológicas na mucosa intestinal (Ohishi & Odagiri, 1984). Essas diferenças nos efeitos histológicos refletem diferenças no modo de ação de uma toxina.

A produção de enterotoxinas por *Enterobacter cloacae* foi primeiramente descrita por Klipstein & Engert (1976). Os autores isolaram amostras capazes de produzir uma toxina termoestável de baixo peso molecular, que causava acúmulo de fluido no jejuno de ratos. Os autores purificaram parcialmente a toxina, usando técnicas de ultrafiltração e cromatografias em gel filtração, e verificaram que a toxina em estudo se assemelhava à enterotoxina termoestável de *E. coli*. Contudo, as alterações histológicas intestinais não foram determinadas e a relevância dessa enterotoxina de *E. cloacae* em doenças ainda deve ser esclarecida.

Paton & Paton (1996) isolaram amostras de *E. cloacae* de paciente com síndrome urêmica hemolítica que possuíam o gene *stx2* e produziam verotoxina II, no entanto, os autores verificaram que o gene *stx2* se mostrou muito instável em *E. cloacae*. Porém, a instabilidade dos genes *stx* em *E. coli* e outras espécies parece ser um fenômeno muito comum (Karch *et al.*, 1992; Schmidt *et al.*, 1993).

Jolivet-Gougeon *et al.* (1997) isolaram e identificaram uma amostra de *E. cloacae* de água ambiental e por métodos sorológicos e PCR, determinaram que a amostra era produtora de enterotoxina termolábil (LT) de *E. coli*.

Estudos preliminares com *E. cloacae* (Simi *et al.*, 2003) demonstraram que 14% das amostras produziam hemolisina. Como a produção de hemolisina é considerado um importante fator de virulência (Finlay & Falkow, 1989; Popoff, 1998) e considerando que na literatura existem poucos relatos sobre toxinas de *E. cloacae* e que, até o momento, o papel

desenvolvido por elas não está claramente definido, torna-se importante o estudo aprofundado deste possível fator de virulência como possível indicador da patogenicidade de *E. cloacae*.



## **Objetivo geral**

A caracterização física e biológica de uma hemolisina de baixo peso molecular produzida por linhagem de *Enterobacter cloacae* EC118 isolada de humano.

## **Objetivos específicos**

1. Determinar a capacidade hemolítica de linhagens de *E. cloacae*;
2. Caracterizar as melhores condições de cultivo para a expressão de hemolisina da linhagem *E. cloacae* EC118;
3. Purificar a hemolisina de *E. cloacae* EC118;
4. Estudar a influência de tratamentos físico-químicos sobre a hemolisina;
5. Estudar o mecanismo de ação da hemolisina;
6. Analisar a atividade biológica da hemolisina em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.
7. Estudar as alterações histopatológicas induzidas pela hemolisina.

## ***Material e Métodos***

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Linhagens bacterianas**

Neste estudo foram utilizadas 50 linhagens de *Enterobacter cloacae*, isoladas de tratos urinários e feridas cirúrgicas no Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Como controles positivos nos ensaios biológicos foram usadas as linhagens de *E. coli* toxigênicas B41 (STI) (Yano *et al.*, 1995), P46 ( $\alpha$ -hemolisina) (Catani, 1999) e como controle negativo a *E. coli* K-12. As linhagens foram mantidas a -70°C em caldo trípico de soja (TSB, Difco), contendo 15% de glicerol.

### **2.2. Detecção da atividade hemolítica**

#### **2.2.1. Pesquisa de hemolisina em meio sólido**

Para a pesquisa de hemolisina em ágar sangue as linhagens de *E. cloacae* foram cultivadas em TSB a 37°C por 18 h em cultivo estacionário. Após o crescimento bacteriano, as linhagens foram semeadas sobre e em profundidade em ágar trípico de soja (TSA) contendo 3% de hemácias de humano, cavalo, carneiro, cobaio, galinha e boi lavadas e não lavadas com NaCl 0,15 M pH 7,4, segundo a metodologia de Barnes *et al.* (1997). A presença de halos de hemólise ao redor ou sob as colônias foi observada após 4, 24 e 48 h. Como controle positivo foi utilizada a linhagem de *E. coli* P46.

#### **2.2.2. Atividade hemolítica no sobrenadante de cultura (Teste em Microplaca)**

Foi utilizado o método descrito por Bhakdi *et al.* (1986). Alíquotas de 50  $\mu$ L de sobrenadante das culturas de *E. cloacae* em TSB a 37°C em cultivo estacionário, foram diluídas, sucessivamente, na razão 2, em NaCl 0,15 M. Uma alíquota de 50  $\mu$ L de suspensão a 1% de hemácias de humano, cavalo, carneiro, cobaio, galinha e boi, previamente lavadas três vezes em NaCl 0,15 M, foi adicionada a cada orifício contendo os sobrenadantes dos cultivos bacterianos e o título (recíproco da maior diluição capaz de provocar a lise de 50% das hemácias) foi determinado visualmente após 60 min de incubação em banho de água a 37°C.

## **2.3. Influência de diferentes condições de cultivo na expressão de hemolisina da *E. cloacae* EC118**

Para determinar as condições ótimas de produção da hemolisina, a linhagem de *E. cloacae* EC118 (produtora de hemolisina) foi submetida a diferentes testes de cultivo. A não ser quando especificado de modo diferente, a linhagem foi cultivada em 5 ml de TSB suplementado com glicose 0,5%, em tubos de ensaio, e incubada a 37°C por 18 h em cultura estática, sendo em seguida submetida à centrifugação (10.000×g/10min/4°C). O sobrenadante de cultura foi guardado a -20°C até o momento do teste. A atividade hemolítica foi determinada segundo método descrito no item 2.2.2.

### **2.3.1. Cultivo em diferentes meios**

*E. cloacae* EC118 foi cultivada nos seguintes meios de cultura a 37°C: TSB (caldo tríptico de soja, Difco), BHI (infusão de cérebro e coração, Difco), MM (meio mínimo) (Williams, 1979), LB (meio Luria Bertani) (Miller, 1972), CN (caldo nutriente, Difco) e Syncase (Brow *et al.*, 1980).

### **2.3.2. Cultivo em TSB na presença de D-glicose**

*E. cloacae* EC118 foi cultivada em TSB, suplementado com D-Glicose nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5% a 37°C por 18 h.

### **2.3.3. Valores de pH do meio de cultivo**

O meio TSB suplementado com glicose 0,5% (TSB-glicose) foi ajustado em diferentes pH (5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 e 8,5) com HCl ou NaOH antes que a linhagem fosse semeada, como descrito por MacLeod & Gyles (1989).

### **2.3.4. Diferentes condições atmosféricas de cultivo**

O estudo de diferentes condições atmosféricas de cultivo foi realizado com o crescimento da *E. cloacae* EC118 TSB-glicose em cultura estática e sob agitação (150 rpm) e em condição de anaerobiose (sistema de anaerobiose, Oxoid).

### **2.3.5. Cultivo na presença de agentes quelantes e antibiótico**

Para verificar a influência de agentes quelantes a linhagem *E. cloacae* EC118 foi cultivada em TSB contendo separadamente os quelantes EDTA (etilenodiamina-tetra ácido acético, Synth) (1mM) (Bhuiyan *et al.*, 1995),  $\alpha$ ,  $\alpha'$  dipiridil (Sigma) (200  $\mu$ M) (Qadri *et al.*, 1989) e EDDA (etileno-di (o-hidroxifenol) ácido acético, Sigma) (12,5  $\mu$ g/ml) (Chart *et al.*, 1998).

O efeito de antibiótico na produção de hemolisina de *E. cloacae*, foi realizado como descrito por MacLeod & Gyles (1989). Foi adicionado ampicilina nas concentrações de 100, 50 e 10  $\mu$ g/ml ao TSB para o cultivo da linhagem bacteriana em estudo.

Como controle dos testes utilizou-se o TSB acrescido dos agentes químicos em teste.

## **2.4. Purificação da hemolisina**

### **2.4.1. Preparo da hemolisina bruta**

#### **2.4.1.1. Ultrafiltração com membrana PM-10**

Os processos iniciais de purificação da hemolisina de *E. cloacae* EC118 foram realizados segundo Klipstein & Engert (1976), com algumas modificações. O sobrenadante de cultura obtido em TSB + 0,5% D-glicose foi coletado através de centrifugação (12.000xg, 15 min, 4°C) e ultrafiltrado em membrana PM10 (Amicon), sendo a fração filtrada coletada e utilizada nos processos de purificação subseqüentes.

#### **2.4.1.2. Tratamento com Acetona**

A fração ultrafiltrada foi liofilizada (Liofilizador Savant, Savant Instruments Inc.) e hidratada em 5% do volume original em água destilada, sendo, em seguida, tratada com 8 volumes de acetona a 4°C. A fração solúvel em acetona foi seca em evaporador rotatório (Fisatom), sendo o resíduo suspenso em água destilada e estocado a -20°C até os processos seguintes de purificação. A hemolisina obtida neste procedimento foi considerada como “hemolisina bruta”.

### **2.4.2. Processos cromatográficos (hemolisina semi-purificada)**

Os processos de purificação da hemolisina foram realizados segundo Arita *et al.* (1991) com modificações, em cromatografias líquidas de alta performance (HPLC) (Waters)

à temperatura ambiente, com uma coluna preparativa  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> (Waters) de cromatografia de fase reversa. A coluna foi equilibrada com ácido trifluoroacético (TFA) 1,5%. A eluição foi realizada usando o mesmo tampão durante 10 min, seguido por 50 min em gradiente linear (0–100%) de acetonitrila 66% em TFA 1,5%. O fluxo utilizado foi de 2 ml/min e o perfil cromatográfico foi monitorado a 254 nm. As frações coletadas foram concentradas a vácuo (Vacufuge Eppendorf, Brinkmann Instruments Inc) e ressuspensas em 10% do volume original em água destilada. A atividade hemolítica das frações foi testada com hemácias de cavalo como descrito no item 2.2.2.

A fração cromatográfica com atividade hemolítica foi submetida à cromatografia de fase reversa nas mesmas condições descritas anteriormente em coluna C<sub>18</sub> analítica (Sephasil Peptide C<sub>18</sub> 5  $\mu$ m ST 4.6/250, Pharmacia). As alíquotas com atividade hemolítica foram concentradas a vácuo e estocadas a -20°C até ensaios posteriores.

### 2.4.3. Determinação da concentração protéica

A determinação da concentração de proteínas foi realizada por absorbância segundo a fórmula: Proteína (mg/ml) = 1,55 A<sub>280nm</sub> – 0,76 A<sub>260nm</sub> (Baines, 2001) e segundo a metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando-se o kit (Bio-Rad) contendo a solução de Bradford concentrada (coomassie brilliant blue G-250, 25% de metanol e 50% de ácido fosfórico), utilizando soroalbumina bovina (BSA, Calbiochem) como proteína padrão, variando a concentração entre 0,2 e 0,9 mg/ml. Os ensaios foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante.

### 2.4.4. Análise Eletroforética

#### 2.4.4.1. Eletroforese em SDS-PAGE

O SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio) foi realizado usando géis com espessura de 1,5 mm e gel de separação de 20% (Swank & Munkres, 1971). As amostras e os marcadores de baixo peso molecular (Pharmacia) foram misturados (v/v) com solução tamponante de amostra (Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,025%). Para garantir as condições não redutoras foi usado a mesma solução tamponante sem  $\beta$ -mercaptoetanol. Em ambos os casos as amostras foram aquecidas a 100°C por 5 min. A eletroforese foi realizada utilizando-se amperagem constante de 15 mA.

#### 2.4.4.2. Eletroforese em gel de Tricina-SDS-PAGE

A eletroforese em gel de tricina-SDS-PAGE 16,5%T; 6%C, foi realizada na presença ou não de 6M de uréia, segundo a metodologia descrita por Schagger & Jagow (1987). As amostras e os marcadores de peso molecular foram preparados com descrito no item anterior. A eletroforese foi realizada em amperagem entre 15 e 30 mA.

#### 2.4.4.3. Coloração dos géis

Os géis foram fixados e corados pela prata, seguindo-se a metodologia descrita por Blum *et al.* (1987). Primeiramente o gel foi imerso em solução fixadora (etanol 50%, ácido acético glacial 12%) por no mínimo 60 min e, posteriormente, lavado em etanol 50% por três vezes em intervalos de 20 min. A seguir, o gel foi imerso numa solução de pré-tratamento ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,02%) durante 1 min e lavado três vezes com água destilada. A impregnação com prata foi realizada usando uma solução de prata ( $\text{AgNO}_3$  0,2%, formaldeído 0,075%) por 20 min, sendo posteriormente lavado por três vezes com água destilada e revelado com solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  6%,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,4% e de formaldeído 0,05%. A revelação foi interrompida usando uma solução de etanol 50% e ácido acético glacial 12%.

### 2.5. Influência de tratamentos físico-químicos sobre a atividade biológica da hemolisina

A influência físico-química sobre a atividade biológica da hemolisina de *E. cloacae*, foi verificada utilizando a hemolisina semi-purificada com título de 1:128.

#### 2.5.1. Teste de termoestabilidade

A hemolisina semi-purificada foi incubada a 60° e 100°C por 30 min. A atividade hemolítica foi testada em microplaca imediatamente após este tratamento (item 2.2.2).

Para o teste de estabilidade em baixas temperaturas, alíquotas da hemolisina foram mantidas por um período de 1 mês a 4°C e -20°C, sendo que sua atividade hemolítica foi testada periodicamente (item 2.2.2).

### **2.5.2. Estabilidade em diferentes valores de pH**

A estabilidade da hemolisina em valores diferentes de pH foi realizada segundo Takeda *et al.* (1979) com modificações. A hemolisina da cultura da linhagem EC118 em NaCl 0,15 M foi ajustada para pH 2,0, 4,0, 6,0, 7,0 e 8,0 com 0,1 N HCl ou 0,1 N NaOH e incubada a 37°C por 30 min. A atividade hemolítica foi examinada em microplaca (item 2.2.2) imediatamente após o tratamento.

### **2.5.3. Tratamento com solventes orgânicos**

A hemolisina foi tratada com 90% de etanol, metanol e acetona separadamente, por 1 h a 4°C. Em seguida, o material foi centrifugado (12.000xg, 15 min, 4°C). O sobrenadante e o precipitado foram evaporados a vácuo, ressuspensos em água destilada e analisados em microplaca quanto à atividade hemolítica (item 2.2.2).

### **2.5.4. Efeito de enzimas proteolíticas**

Para o teste com enzimas proteolíticas, a hemolisina foi diluída em 100 µg/ml de tripsina, proteinase K ou pepsina e incubada por 1 h a 37°C. A atividade hemolítica foi examinada em microplaca (item 2.2.2) imediatamente após o tratamento.

### **2.5.5. Atividade hemolítica na presença de quelantes e cálcio**

A hemolisina foi incubada a 37°C por 30 min na presença de EDTA e EGTA (etileno glicol-bis β-aminoetil éter) (5, 10, 100 mM) e CaCl<sub>2</sub> (1, 2,5, 5 e 10 mM). A atividade hemolítica foi testada em microplaca (item 2.2.2) imediatamente após o tratamento.

### **2.5.6. Atividade hemolítica na presença de periodato de sódio**

A hemolisina foi tratada com periodato de sódio (2 mM) a 37°C por 30 min, segundo a metodologia de Bhuiyan *et al.* (1995), sendo, em seguida, analisada a atividade hemolítica em microplaca (item 2.2.2).

### **2.5.7. Tratamento com agente redutor 2-mercaptoetanol**

A hemolisina foi tratada com 2-mercaptoetanol (Sigma) (18 mM) por 30 min a 37°C segundo Barnes *et al.* (1997), sendo em seguida examinada a atividade hemolítica.



## **2.6. Mecanismo de ação da hemolisina de *E. cloacae* em eritrócitos**

### **2.6.1. Teste de hemólise com protetores osmóticos**

Este experimento foi realizado segundo a metodologia descrita por Bhakdi *et al.* (1986) com algumas modificações. A atividade da hemolisina semi-purificada de *E. cloacae* foi testada com suspensão de cavalo (2%) em NaCl 0,15 M contendo 30mM dos seguintes carboidratos: adonitol, arabinose, dextran 5, frutose, galactose, glicose, inositol, maltose, manose, sacarose, sorbitol, rafinose.

### **2.6.2. Inibição da atividade hemolítica por soro**

A hemolisina semi-purificada foi incubada a 37°C por 30 min na presença de soro normal de coelho descomplementado e soro fetal bovino diluídos na razão 2 em NaCl 0,15 M. A atividade hemolítica foi testada em microplaca (item 2.2.2) imediatamente após este tratamento.

### **2.6.3. Detecção da atividade hemolítica associada à célula bacteriana**

#### **2.6.3.1. Rompimento das células bacterianas**

*E. cloacae* EC118 foi cultivada em 50 ml de TSB-glicose por 18 h em cultivo estacionário a 37°C sendo, em seguida, centrifugada (10.000xg/10min/4°C) e o precipitado bacteriano ressuspendido em 10 ml de PBS. A suspensão bacteriana foi então submetida a ultrassom (Sonics & Materials Inc., Vibra Cell) usando 10 ciclos de 10 seg, com intervalos de 10 seg entre um ciclo e outro, em amplitude de 50%, em banho de gelo. Em seguida, o restos bacterianos foram removidos através de centrifugação (10.000xg/10 min/4°C), sendo o sobrenadante coletado e testado quanto a atividade hemolítica (item 2.2.2).

#### **2.6.3.2. Atividade hemolítica do sobrenadante de cultura e células bacterianas em diferentes tempos e temperaturas de reação**

Este ensaio foi realizado segundo a metodologia descrita por Lobo & Welch (1994). Para a sua realização a linhagem EC118 foi cultivada em 10 ml meio TSB-glicose por 20 h. O sobrenadante de cultura foi separado do sedimento bacteriano por centrifugação (10.000x g/ 10 min/4°C), sendo o sedimento ressuspendido em 1 ml de NaCl 0,15 M. Separadamente, a suspensão bacteriana e o sobrenadante de cultura foram analisados

quanto à atividade hemolítica com suspensão de hemácias eqüinas a 10% em NaCl 0,15 M, nas temperaturas de 4, 25 e 37°C, com diferentes tempos de reação (30 min, 6 e 24 h). Após o período de incubação, o título (recíproco da maior diluição capaz de provocar a lise de 50% das hemácias) foi determinado visualmente. Como controle positivo de lise dos eritrócitos foi utilizado SDS 10% e como controle negativo NaCl 0,15 M.

#### **2.6.4. Avaliação das alterações ultraestruturais induzidas pela hemolisina de *E. cloacae* em hemácias eqüinas**

Para a realização da microscopia eletrônica de varredura foi utilizada a metodologia descrita por Dewar *et al.* (1976), com algumas modificações. A atividade da hemolisina semi-purificada da linhagem EC118 foi ensaiada em dose sublética com hemácias de cavalo a 2% em NaCl 0,15 M. Após 10 min de incubação a 37°C, as hemácias foram coletadas por centrifugação (3.000xg/5 min/4°C). As hemácias, tratadas com a hemolisina, foram fixadas com uma solução fixadora contendo glutaraldeído 2,5% e ácido tânico 1%, dissolvidos em PBS 100mM pH 7,4, durante 1 h à temperatura ambiente, com leve agitação. As hemácias foram lavadas com PBS, desidratadas gradativamente com álcool etílico e cobertas com uma camada de ouro para facilitar a observação em microscópio de varredura (Jeol 5800 LV).

Como controle do experimento, as hemácias eqüinas foram submetidas aos mesmos tratamentos com omissão da hemolisina semi-purificada de *E. cloacae*.

### **2.7. Caracterização biológica da hemolisina de *E. cloacae***

Os ensaios para a caracterização biológica da hemolisina de *E. cloacae* foram realizados com a hemolisina semi-purificada em NaCl 0,15 M com um título de hemólise de 1:128.

#### **2.7.1. Teste de toxicidade *in vitro* em diferentes culturas de células**

##### **2.7.1.1. Preparo da cultura celular**

As células Vero (rim de macaco verde africano) e NG 97 (glioma 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/Nutricell), suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino, Nutricell) 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 da monocamada celular.

Após este período, o meio foi descartado sendo adicionado à cultura celular uma solução de ATV (associação de Tripsina-Versene/Cultilab) para o descolamento da monocamada. As células foram ressuspensas em 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, em um volume de 100 µL por cavidade. As microplacas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24h.

#### **2.7.1.2. Teste de citotoxicidade**

O meio de cultura das microplacas com as células Vero e NG 97 foi removido e alíquotas de 100 µL do meio MEM com 2% de SFB e gentamicina (50 µg/ml) foram adicionadas às placas. Alíquotas de hemolisina semi-purificada foram adicionadas em duplicata, em diluições seriadas na razão dois. As microplacas foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e a leitura dos resultados foi feita 24, 48 e 72 h após a incubação, com o auxílio de microscópio invertido (Axiovert-Zeiss).

#### **2.7.1.3. Coloração com azul de toluidina**

As células Vero foram crescidas sobre lamínulas, em placas de 24 concavidades, onde em cada concavidade foram adicionadas  $10^4$  células/ml. As placas foram incubadas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após 24 h de incubação, alíquotas de hemolisina semi-purificada foram aplicadas nas células e as placas retornaram à estufa.

Após 24 h de tratamento, as lamínulas foram lavadas com PBS e fixadas em uma solução de formaldeído a 10% em PBS por 1 h. As lamínulas foram então lavadas com água destilada e, em seguida, coradas segundo a metodologia de Mello & Vidal (1980), pelo azul de toluidina a 0,0025% em tampão Mc Ilvane a pH 4,0. Após 15 min de coloração, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com água destilada para a retirada do corante em excesso, secas ao ar e diafanizadas em xilol. As lamínulas foram montadas sobre lâminas, utilizando-se o bálsamo do Canadá.

#### 2.7.1.4. Teste de viabilidade celular

O teste de viabilidade celular foi realizado em células Vero e NG 97 tratadas com a hemolisina semi-purificada, segundo descrito por Borenfreund & Puerner (1984).

Após 24 h de incubação com a hemolisina, o meio foi substituído por 200 µl de solução de vermelho neutro (50 µg/ml) por concavidade e a microplaca foi novamente incubada em estufa a 37°C por mais 3 h para a incorporação do corante pelos lisossomos das células viáveis. Em seguida o corante foi desprezado, as microplacas lavadas com solução de cloreto de cálcio e formol (10% de formaldeído 40% e 10% de cloreto de cálcio anidro 10%) 200 µL da solução de ácido acético-etanol (1% de ácido acético glacial em etanol 50%) foram adicionados sendo a microplaca mantida por 15 min em temperatura ambiente. O controle celular foi tratado somente com o meio MEM. A média das leituras obtidas de 8 orifícios do controle foi considerada como 100% de viabilidade da cultura celular.

O corante foi quantificado em leitor de ELISA (Labsystem Multiskan Bichromatic), utilizando filtro de 540 nm.

#### 2.7.2. Ensaios em animais

O protocolo dos ensaios em animais (No. 542-1) obteve prévia aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa)-IB-UNICAMP.

Os ensaios em animais foram realizados com o sobrenadante de cultura de EC118 e com a hemolisina semi-purificada padronizada com NaCl 0,15 M, de tal forma que se obtivesse um título de hemólise de 1:128 em teste em microplaca (item 2.2.2).

##### 2.7.2.1. Teste de alça ligada em coelhos

Foram utilizados coelhos albinos da raça New Zealand (1,5-2,0 kg), mantidos em jejum por 24 h. Para a cirurgia os animais foram anestesiados com Rompum (5 mg/ml) e Ketolar (40 mg/ml). Foram feitas alças ligadas de aproximadamente 5 cm e cada alça foi inoculada com 1 ml da amostra a ser testada. Os animais foram mantidos por 18 h e posteriormente eutanasiados. O intestino delgado foi retirado, sendo feitas medições do volume de líquido acumulado em cada alça e o comprimento da mesma. O coeficiente RIL (volume do conteúdo da alça/comprimento em cm) foi considerado positivo com valores superiores a 1 ml/cm (Blanco & Blanco, 1993). Para o experimentos foram usados o sobrenadante de cultura e hemolisina semi-purificada de *E. cloacae* EC118 e, como controles negativos, o sobrenadante de cultura da *E. coli* K-12 e o meio TSB+glicose.

#### 2.7.2.2. Teste de alça ligada em ratos

O ensaio de alça ligada do intestino de rato foi realizado segundo Whipp (1990) e Potomski *et al.* (1987), com algumas modificações. Para a realização do teste foram utilizados ratos machos jovens (15 dias), da raça Wistar (com peso entre 25-40 g). Doze horas antes do experimento os ratos foram privados de comida, recebendo apenas água. Os animais foram anestesiados com uma dose de ketamina 80 mg e xilacina 10 mg por peso corporal, aplicada via intraperitoneal, segundo descrito por Zuñiga *et al.* (2001). Após o efeito anestésico, os membros superiores e inferiores dos ratos foram contidos com elástico ao suporte de cirurgia. A anti-sepsia da região abdominal foi realizada com solução de álcool 70° GL. Em seguida, foi feita uma incisão na linha mediana na parede abdominal, tendo como ponto médio a cicatriz umbilical. O intestino delgado foi exposto e mantido úmido com solução NaCl 0,15M. As alças intestinais foram amarradas com linha estéril, partindo do ceco, no sentido disto-proximal em direção ao estômago. Cada alça mediu aproximadamente 2 cm, com inter-alças de 0,5 cm, principalmente no segmento ileal do intestino. Posteriormente as alças foram inoculadas com 150 µl da hemolisina semi-purificada e, como controles do ensaio, foram inoculados o meio de cultura TSB-glicose e o sobrenadante de cultivo da EC118. Após a inoculação, os intestinos foram recolocados na cavidade abdominal, procedendo-se à sutura do peritônio, camada muscular e pele.

Os animais foram mantidos num local arejado e eutanasiados 10 h após o ensaio através de inoculação arterial de CO<sub>2</sub> (Report of the AVMA, Panel of Euthanasia). A cavidade peritoneal foi aberta e o intestino delgado retirado e colocado numa bandeja com NaCl 0,15 M. Os segmentos de intestino foram então processados para a análise histopatológica.

#### 2.7.2.3. Teste em camundongos recém-nascidos

Foi administrado por via intragástrica a camundongos com 4 dias (peso entre 1,9 e 2,3 g) 100 µl de sobrenadante de cultura e hemolisina semi-purificada de *E. cloacae* EC118, contendo Azul de Evans (Sigma). Os camundongos foram mantidos à temperatura ambiente por 3h. Os animais foram sacrificados com éter e o grau de acúmulo de fluido intestinal foi determinado pela taxa de peso do intestino dividido pelo peso da carcaça. Pelos critérios propostos por Dean *et al.* (1972), foram considerados positivos valores superiores a 0,09.

#### **2.7.2.4. Ensaio em pele de coelho**

O ensaio em pele de coelho foi realizado de acordo com Blanco & Blanco (1993). Foram utilizados coelhos da raça New Zealand, pesando entre 1,5 e 2,0 kg, cujos dorsos foram depilados e marcados com auxílio de caneta. Em cada segmento quadriculado foi inoculado 100 µl do sobrenadante de cultura e hemolisina semi-purificada da linhagem EC118. As linhagens foram distribuídas em diferentes pontos do dorso dos animais a fim de evitar-se diferenças de sensibilidade. Os controles negativos consistiram de sobrenadante da cultura de *E. coli* K12 e sobrenadante de cultura da linhagem EC002. Após 24 h da aplicação das linhagens, os animais foram inoculados intravenosamente com solução de azul de Evans a 2,5% em NaCl 0,15 M, na concentração de 1,2 ml/kg de peso do animal. Uma hora depois, os animais foram sacrificados por injeção intracardíaca de ar e tiveram a pele do dorso retirada. A pele foi analisada quanto ao aparecimento de nódulo endurecido e elevado e/ou aumento da permeabilidade vascular, caracterizada pelo tom azulado que se forma ao redor do local de inoculação nos testes positivos.

#### **2.7.2.5. Letalidade em camundongos**

A atividade letal da hemolisina foi testada em camundongos da raça BALB/c (5 animais/grupo) com peso entre 25-30 g, através de injeções intravenosas (500 µl/animal) com seringas de insulina. Como controle animais foram inoculados com sobrenadante de cultura da linhagem *E. coli* K12 e da linhagem EC002. Os camundongos foram mantidos em temperatura ambiente e observados diariamente durante 7 dias.

### **2.7.3. Estudo das alterações morfológicas induzidas pela hemolisina de *E. cloacae* em células epiteliais intestinais de ratos**

#### **2.7.3.1. Microscopia de luz**

Segmentos de 1cm de alça ligada intestinal de rato tratado com hemolisina semi-purificada foram fixados em paraformaldeído 4% (v/v) em PBS 10mM pH 7,2 por 48 h e em seguida lavados com o mesmo tampão por 24 h. O material foi desidratado usando diferentes porcentagens de álcool etílico em escala crescente (70-100%). O material foi colocado em xilol por 1h e embebido em resina sintética (Historesina BJ<sub>4</sub>, Polysciences). Os cortes de 5 µm foram corados com hematoxilina-eosina. Para a observação ao microscópio de luz as lâminas foram montadas usando Entelan e analisadas em microscópio (Axioskop, Zeiss), Laboratório de Microscopia Eletrônica, IB, Unicamp.

### **2.7.3.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

Fragmentos intestinais de 1 mm<sup>3</sup> de alça ligada de ratos foram fixados numa mistura de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 2% (v/v), adicionando ácido tânico 0,25% (p/v) e sacarose 5,4% em tampão Millonig (Souza *et al.*, 1998). Em seguida o material foi lavado com o mesmo tampão e pós fixado com tetróxido de ósmio 1% (v/v). Após uma nova lavagem, o material foi desidratado usando diferentes porcentagens de acetona (50-100%) e embebido em Epon. Seções ultrafinas foram cortadas usando ultramicrotomo LKB e contrastadas com acetato de uranila. Os cortes foram examinados em microscópio eletrônico de transmissão (Leo 906), Laboratório de Microscopia Eletrônica, IB, Unicamp.

### **2.7.3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Fragmentos de tecido intestinal foram fixados usando a mistura de glutaraldeído 2% (v/v) e paraformaldeído 2% (Kitajima *et al.*, 1999), durante 4 h à temperatura ambiente. Em seguida os tecidos foram lavados com PBS e pós-fixados durante 2 h com tetróxido de ósmio 1% (v/v) e ácido tânico 2% (v/v). Posteriormente foram desidratados gradativamente com álcool etílico, levados ao ponto crítico com CO<sub>2</sub> e cobertos com uma camada de ouro em evaporador Balzers (200 seg, 40 mA), para facilitar a observação em microscópio de varredura (Jeol 5800 LV), Laboratório de Microscopia Eletrônica, IB, Unicamp.

## ***Resultados***



### 3. Resultados

#### 3.1. *Detecção da atividade hemolítica*

##### 3.1.1. Pesquisa de hemolisina em meio sólido

Das 50 linhagens de *E. cloacae* examinadas, 7 (14%) apresentaram halo de hemólise parcial ao redor das colônias, sendo a hemólise mais evidente com o cultivo bacteriano em profundidade. A presença de halo começou a evidenciar-se nas linhagens de *E. cloacae* após 24 h de incubação.

Os halos de hemólise das linhagens de *E. cloacae* foram parciais e menores quando comparados à  $\alpha$ -hemolisina produzida pela linhagem padrão *E. coli* P46 e só foram visualizados nos meios contendo eritrócitos de cavalo ou carneiro. O meio preparado com hemácias lavadas não alterou o padrão de hemólise em nenhuma das culturas utilizadas.

**TABELA 1.** Expressão de hemolisina de *E. cloacae* em placas de TSA-sangue com diferentes hemácias, observada em diferentes tempos de cultivo.

Linhagens	TSA + hemácias																	
	Cavalo			Carneiro			Humano			Cobaio			Galinha			Boi		
	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h
<b>EC004</b>	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>EC020</b>	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>EC031</b>	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>ECJ01</b>	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>ECJ12</b>	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>EC249</b>	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>EC118</b>	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><i>E. coli</i> P46</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

### 3.1.2. Atividade hemolítica no sobrenadante de cultura

Os eritrócitos de carneiro e cavalo foram os mais susceptíveis ao sobrenadante das culturas de *E. cloacae* em teste em microplaca para a atividade hemolítica, enquanto que os eritrócitos de cobaio e humano apresentaram menor susceptibilidade (Tabela 2). Os eritrócitos bovinos e de galinha não sofreram hemólise pelo sobrenadante de cultura de *E. cloacae*.

**TABELA 2.** Títulos de atividade hemolítica do sobrenadante de cultura de linhagens de *E. cloacae* em eritrócitos de diferentes origens animais.

Linhagens	Eritrócitos					
	Cavalo	Carneiro	Cobaio	Galinha	Bovino	Humano
<b>EC004</b>	1:8	1:8	1:4	-	-	1:4
<b>EC020</b>	1:8	1:8	1:4	-	-	1:4
<b>EC031</b>	1:8	1:8	1:4	-	-	1:4
<b>ECJ01</b>	1:8	1:8	1:4	-	-	1:4
<b>ECJ12</b>	1:8	1:8	1:4	-	-	1:4
<b>EC249</b>	1:8	1:8	1:4	-	-	1:4
<b>EC118</b>	1:32	1:32	1:4	-	-	1:4

O título expresso é a recíproca da maior diluição que causou atividade hemolítica.

A linhagem *E. cloacae* (EC118) foi a que apresentou maior título de hemólise (1:32) com hemácias de cavalo. Assim sendo, os experimentos posteriores foram realizados apenas com esta linhagem.

### 3.2. Influência de diferentes condições de cultivo na expressão da hemolisina de *E. cloacae*

Dos diferentes meios de cultura analisados, verificou-se que os meios TSB e BHI foram os que proporcionaram a produção de um maior título de hemólise (1:32) (Tabela 3).

Com as concentrações de 0,5 e 1,0% de D-glicose foram obtidos os melhores títulos de atividade hemolítica (1:128) (Tabela 3). Por esta razão, o meio TSB suplementado com 0,5% de D-glicose (TSB-glicose) foi o escolhido para a produção da hemolisina nos testes

posteriores e para os processos de purificação.

O cultivo em pH neutro (7,0 a 7,5) apresentou atividade hemolítica (1:128), seno que o cultivo em faixa de pH ácido ou alcalino diminuiu a atividade hemolítica do sobrenadante de cultura.

A Tabela 3 mostra que a condição atmosférica de cultivo influenciou a expressão da hemolisina de *E. cloacae* EC118. Foi observado que a linhagem expressou um maior título de hemólise quando cultivada em TSB-glicose em aerobiose em cultura estática (1:128). Em condição de anaerobiose a expressão de hemolisina foi menor (1:8). Com o cultivo sob agitação (120 rpm) não foi observada atividade hemolítica no sobrenadante de cultura.

### **3.2.1. Influência de agentes quelantes e antibiótico**

Agentes quelantes de ferro (Dipiridil e EDDA) ou de íons bivalentes (EDTA) no meio de cultivo nas concentrações utilizadas não alteraram a expressão da hemolisina testada.

Da mesma forma, em diferentes concentrações (100, 50 e 10 µg/ml) a ampicilina não causou variações significativas na produção da hemolisina por *E. cloacae*.

**TABELA 3.** Títulos de atividade hemolítica obtidos no cultivo da linhagem de *E. cloacae* EC118 em diferentes condições de cultivo.

Meios de Cultura	Título de hemólise <sup>1</sup>
TSB	1:32
BHI	1:32
MM	1:8
LB	-
CN	1:16
Syncase	-
<b>TSB + D-glicose (%)</b>	
TSB+0,5	1:128
TSB+1,0	1:128
TSB+1,5	1:32
<b>Efeito do pH<sup>2</sup></b>	
5,5	1:8
6,0	1:8
6,5	1:8
7,0	1:128
7,5	1:128
8,0	1:8
8,5	1:4
<b>Condições físicas de cultivo<sup>2</sup></b>	
Estático	1:128
Agitação	-
Anaerobiose-Estático	1:8

<sup>1</sup>O título expresso é a recíproca da maior diluição que causou atividade hemolítica.

<sup>2</sup>Linhagem EC118 cultivada em TSB.

### **3.3. Purificação da hemolisina de *E. cloacae***

#### **3.3.1. Produção da hemolisina bruta**

##### **3.3.1.1. Ultrafiltração do sobrenadante de cultura**

Através da ultrafiltração do sobrenadante de cultura da *E. cloacae* EC118 em membrana PM10, verificou-se que a atividade hemolítica estava na fração filtrada (<10 kDa), já que na fração concentrada (>10 kDa) não detectou-se atividade hemolítica.

##### **3.3.1.2. Precipitação com acetona**

O sobrenadante de cultura ultrafiltrado foi liofilizado e rehidratado, sendo em seguida precipitado com 8 volumes de acetona (item 4.5). Após a evaporação completa da acetona, verificou-se que a atividade hemolítica estava presente na fração solúvel à acetona, enquanto que a fração precipitada não apresentou título de atividade hemolítica. A Tabela 4 mostra as etapas para a produção da hemolisina bruta da linhagem EC118.

A metodologia descrita por Klipstein & Engert (1976b), utilizando a ultrafiltração e tratamento com acetona, foi empregada nos experimentos subseqüentes de purificação da hemolisina de *E. cloacae* EC118.

#### **3.3.2. Processos cromatográficos (hemolisina semi-purificada)**

Uma alíquota de 250 µL de hemolisina bruta em 250 µL de Ácido Trifluoroacético (TFA) 1,5%, foi aplicada em coluna C<sub>18</sub> preparativa, utilizando gradiente linear de Acetonitrila 66% em TFA 1,5% e fluxo de 1 ml/min. Os picos cromatográficos coletadas foram concentrados por vácuo (Vacufug, Eppendorf), ressuspensos em água destilada e examinados quanto a atividade hemolítica em microplaca (item 2.2.2). A hemolisina foi eluída aos 8 min, antes do início do gradiente com Acetonitrila (Figura 1) e apresentou um título de hemólise de 1:32 (Tabela 4).

A hemolisina obtida na coluna C<sub>18</sub> preparativa (Figura 1) foi concentrada por vácuo e submetida à cromatografia em coluna C<sub>18</sub> analítica, nas mesmas condições que na coluna preparativa. Aos 8 min, antes do início do gradiente com Acetonitrila (Figura 2), o pico coletado apresentou a atividade hemolítica (1:32) (Tabela 4).

**TABELA 4.** Etapas de purificação da hemolisina de *E. cloacae* EC118 e atividade hemolítica dos produtos obtidos.

<b>Etapas de purificação</b>	<b>Atividade hemolítica<sup>a, b</sup></b>
Sobrenadante de cultura	1:128
Ultrafiltração	1:128
Sobrenadante-Acetona (hemolisina bruta)	1:1024
Fração C <sub>18</sub> preparativa	1:32
Fração C <sub>18</sub> analítica (hemolisina semi-purificada)	1:32

<sup>a</sup> O título expresso é a recíproca da maior diluição que causou atividade hemolítica.

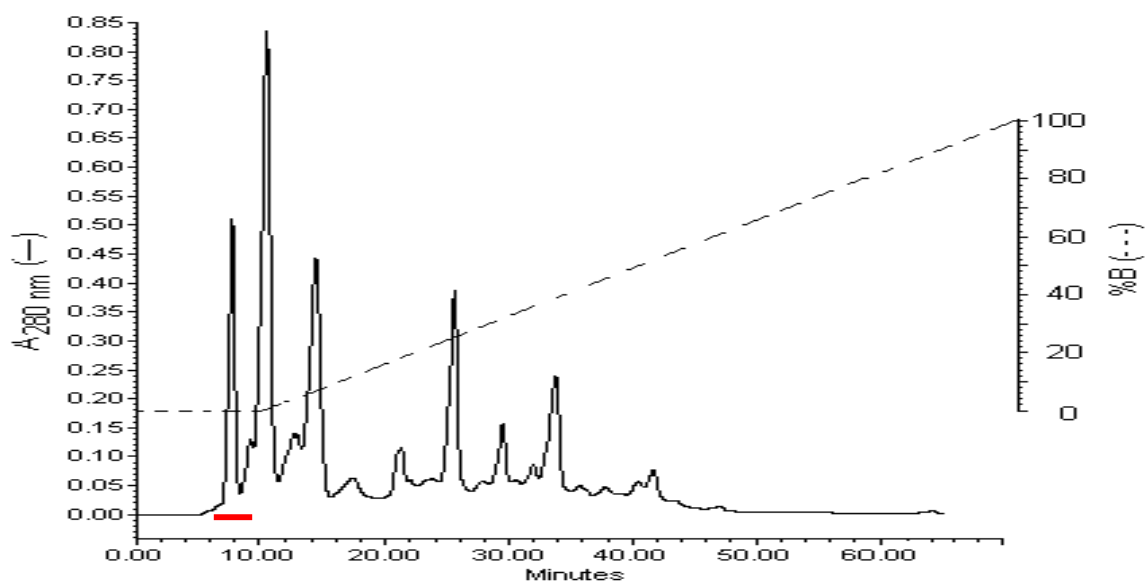
<sup>b</sup> Teste de hemólise em microplaca com hemácias eqüinas (item 2.2.2).

### 3.3.3. Determinação da concentração protéica

Não foi possível a determinação de proteínas da hemolisina de *E. cloacae* pela metodologia descrita por Bradford (1976), tampouco pela metodologia baseada na absorbância da hemolisina.

### 3.3.4. Análise eletroforética

Em cada etapa da purificação, realizou-se a análise eletroforética por duas metodologias, SDS-PAGE 20% e Tricina-SDS-PAGE 16,5%T; 6%C (item 2.4.4.), na presença ou não de 6 M de Uréia. Entretanto, após o uso dessas duas técnicas com coloração por prata, não foi possível visualizar a presença de bandas protéicas na fração hemolítica eluída das colunas C<sub>18</sub>.



**FIGURA 1.** Perfil de eluição obtido em cromatografia de fase reversa em HPLC em resina hidrofóbica C<sub>18</sub> preparativa, usando um gradiente linear (0–100%) de acetonitrila 66% em TFA 1,5%. O traço vermelho indica o pico com atividade hemolítica.



**FIGURA 2.** Perfil de eluição obtido em cromatografia de fase reversa em HPLC em resina hidrofóbica C<sub>18</sub> analítica, usando um gradiente linear (0–100%) de acetonitrila 66% em TFA 1,5%. O traço vermelho indica o pico com atividade hemolítica.

### **3.4. Influência de tratamentos físico-químicos na atividade biológica da hemolisina**

A Tabela 5 mostra o efeito de tratamentos físico-químicos sobre a atividade biológica da hemolisina semi-purificada da linhagem de *E. cloacae* EC118, padronizada com NaCl 0,15 M para um título hemolítico de 1:128.

A atividade hemolítica não sofreu alterações quando aquecida a 60°C ou 100°C por 30 min. Após um mês de armazenamento nas temperaturas de 4°C e -20°C. Em valores de pH 2.0–6.0, a hemolisina não alterou sua atividade hemolítica, mas valores de pH igual ou maior do que 7,0 inibiram a atividade biológica. Etanol, metanol e acetona não afetaram a atividade biológica da hemolisina que permaneceu solúvel nesses solventes orgânicos. A atividade hemolítica não foi inibida pelo tratamento com 100 µg/ml das enzimas tripsina, proteinase K e pepsina. O tratamento com EGTA (100mM) inibiu a atividade hemolítica. Entretanto, não foi possível determinar o efeito do EDTA, pois somente presença deste agente lisou os eritrócitos. Diferentes concentrações de cálcio não alteraram a atividade hemolítica. O tratamento com 2 mM de periodato de sódio não alterou o título da hemolisina semi-purificada. A adição do agente redutor 2-mercaptoetanol 0,18 M à hemolisina não alterou sua atividade biológica.



**TABELA 5.** Títulos de atividade hemolítica em hemácias eqüinas da hemolisina de *E. cloacae* sob diferentes tratamentos físico-químicos.

Tratamento	Atividade Hemolítica <sup>a</sup>
Controle <sup>b</sup>	1:128
<b>Aquecimento (°C)</b>	
60	1:128
100	1:128
<b>pH</b>	
2.0	1:128
4.0	1:128
6.0	1:128
7.0	-
8.0	-
<b>Enzimas proteolíticas (100µg/ml)</b>	
Tripsina	1:128
Proteinase K	1:128
Pepsina	1:128
<b>Solventes orgânicos</b>	
Etanol	1:128
Metanol	1:128
Acetona	1:128
<b>EGTA (mM)</b>	
5	1:128
10	1:16
100	-
<b>EDTA (mM)</b>	
5	ND
10	ND
100	ND
<b>CaCl<sub>2</sub> (mM)</b>	
1,0	1:128
2,5	1:128
5,0	1:128
10	1:128
<b>Periodato de sódio (2 mM)</b>	1:128
<b>2-Mercaptoetanol</b>	1:128

<sup>a</sup> O título expresso é a recíproca da maior diluição que causou atividade hemolítica.

<sup>b</sup> Hemolisina semi-purificada diluída em NaCl 0,15M sem nenhum tratamento.

ND. Não determinado.

### 3.5. Caracterização do mecanismo de ação da hemolisina de *E. cloacae* em eritrócitos

#### 3.5.1. Proteção osmótica da hemólise por diferentes carboidratos

A Tabela 6 mostra os resultados obtidos da atividade hemolítica de *E. cloacae* em hemácias eqüinas na presença de diferentes protetores osmóticos. Dos carboidratos examinados (adonitol, arabinose, frutose, galactose, glicose, inositol, maltose, manose, sacarose, sorbitol, rafinose), o dextran 4 (diâmetro ~ 3,5 nm) efetivamente protegeu as hemácias da hemólise.

**TABELA 6.** Títulos de atividade hemolítica de *E. cloacae* na presença de diferentes carboidratos.

Carboidrato (30 mM)	Diâmetro molecular (nm)	Atividade Hemolítica <sup>a,c</sup>
<b>Controle<sup>b</sup></b>	-	1:128
Adonitol	0,63	1:128
Arabinose	0,62	1:128
Dextran 4	3,5	0
Frutose	0,72	1:128
Galactose	0,72	1:128
Glicose	0,72	1:128
Inositol	0,72	1:128
Maltose	0,96	1:128
Manose	0,72	1:128
Sacarose	0,9	1:128
Sorbitol	0,8	1:128
Rafinose	1,2-1,4	1:128

<sup>a</sup> O título expresso é a recíproca da maior diluição que causou atividade hemolítica.

<sup>b</sup> Hemolisina semi-purificada de *E. cloacae* EC118 diluída em NaCl 0,15 M sem nenhum tratamento.

<sup>c</sup> Teste de hemólise em microplaca com hemácias eqüinas (item 2.2.2).

### **3.5.2. Inibição da atividade hemolítica por soro**

Tanto o soro de coelho descomplementado como o soro fetal bovino nas diluições examinadas não foram capazes de inibir a atividade hemolítica da hemolisina de *E. cloacae*.

### **3.5.3. Detecção da atividade hemolítica ligada à célula bacteriana**

#### **3.5.3.1. Rompimento das células bacterianas por ultrassom**

O crescimento bacteriano de *E. cloacae* EC118, após a lavagem com PBS, foi submetido à ultrassonicação, sendo o sobrenadante obtido testado quanto a atividade hemolítica. Não foi detectado atividade hemolítica no sobrenadante das células rompidas por sonicação.

#### **3.5.3.2. Ensaio líquido de hemólise e influência da temperatura de reação**

Não foi observada associação da hemolisina com a célula bacteriana de *E. cloacae* EC118 quando incubada em diferentes temperaturas (4, 25, 37°C) e períodos (30 min, 6 e 24 h). Entretanto, foi observada atividade hemolítica do sobrenadante de cultura da linhagem de EC118 após 1 min de incubação, independente da temperatura, sendo observado o maior título de hemólise após 2 h de incubação a 37°C (Tabela 7).

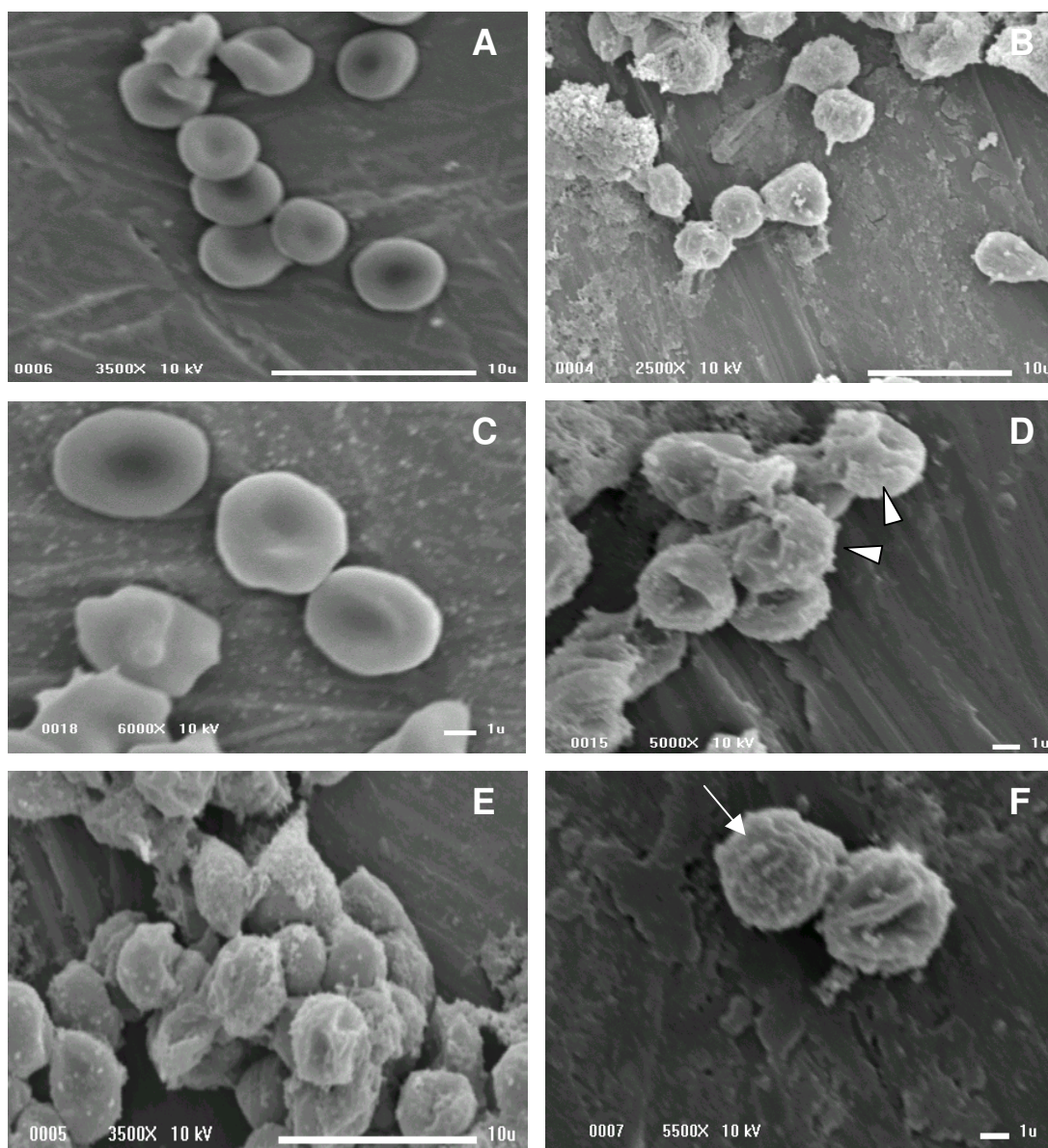
**TABELA 7.** Detecção da atividade hemolítica ligada à célula bacteriana de *E. cloacae*, em diferentes temperaturas e períodos de incubação.

<b>Atividade hemolítica em diferentes tempos<sup>a, b</sup></b>									
<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Célula Bacteriana</b>			<b>Sobrenadante de Cultura</b>			<b>hemolisina semi- purificada</b>		
	30 min	6h	24h	30 min	6h	24h	30 min	6h	24h
4	-	-	-	16	16	16	64	64	64
25	-	-	-	16	16	16	64	64	64
37	-	-	-	32	32	32	128	128	128

<sup>a</sup> O título expresso é a recíproca da maior diluição que causou atividade hemolítica.  
 Teste de hemólise em microplaca com hemácias eqüinas (item 2.2.2).

#### **3.5.4. Estudo das alterações ultraestruturais induzidas pela hemolisina de *E. cloacae* em hemácias eqüinas**

A microscopia eletrônica de varredura evidenciou alterações estruturais nos eritrócitos após 10 min de incubação com dose sublética da hemolisina de *E. cloacae*. As micrografias estão ilustradas na Figura 3. Em comparação com os eritrócitos controle, o volume celular diminuiu e observou-se alterações na membrana como rugosidade e presença de estruturas globulares, após os eritrócitos terem sido tratados com a hemolisina.



**FIGURA 3.** Aspectos ultraestruturais de eritrócitos eqüinos tratados com dose sublética de hemolisina semi-purificada de *E. cloacae* EC118 por 10 min, utilizando MEV. (A, C) Controle de eritrócitos eqüinos. (B) Vista geral dos eritrócitos e alterações provocadas pela ação da hemolisina. (D) Perda de volume e alterações na membrana celular dos eritrócitos, caracterizadas por rugosidade na superfície da membrana (▷). (E, F) Presença de estruturas globulares na superfície membrana celular (→).

### **3.6. Caracterização biológica da hemolisina de *E. cloacae***

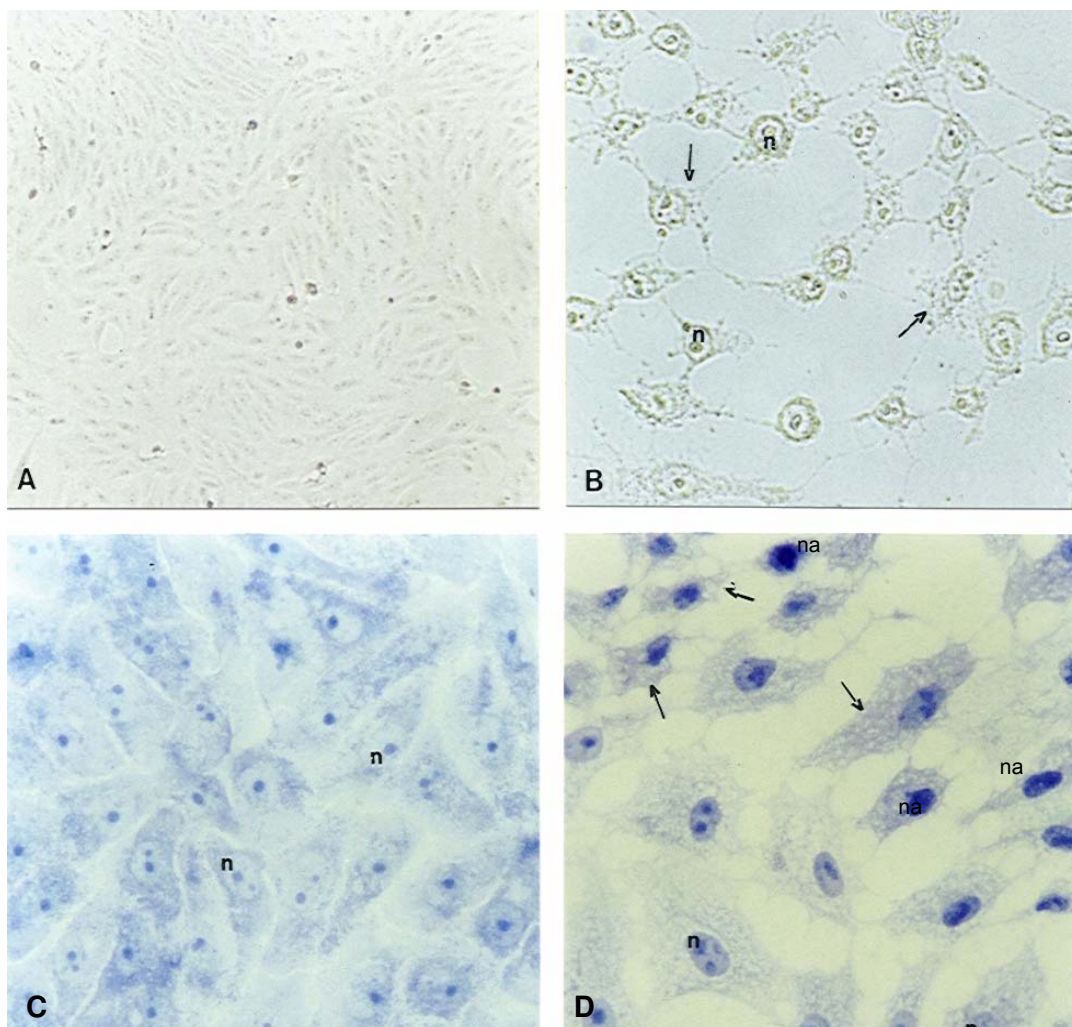
#### **3.6.1. Teste de toxicidade *in vitro***

##### **3.6.1.1. Efeito citopático da hemolisina de *E. cloacae* em células Vero**

As análises microscópicas sugerem que as principais alterações morfológicas em células Vero tratadas com hemolisina de *E. cloacae* ocorrem no citoplasma, onde observa-se enrugamento citoplasmático que, aparentemente, leva à perda da junção entre as células (individualização das mesmas) e descolamento da monocamada celular. Em geral, não foram observadas alterações no núcleo das células Vero. Entretanto, algumas células remanescentes apresentaram aspectos que assemelham-se a condensação nuclear (Figura 4).

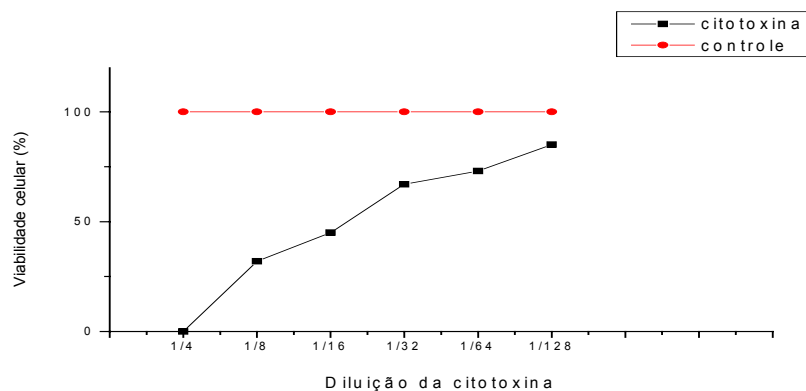
##### **3.6.1.2. Ensaio de viabilidade celular em células Vero e NG 97**

As figuras 5 e 6 mostram os resultados obtidos no teste de viabilidade celular, expressos como a porcentagem de células Vero e NG 97 viáveis em função da diluição da hemolisina semi-purificada, após 24 h de incubação. Ambas linhagens celulares apresentaram similar comportamento frente à ação da hemolisina semi-purificada. Concentrações maiores provocaram um efeito severo na viabilidade celular. A linhagem mais sensível ao efeito tóxico foi a NG 97, apresentando uma taxa de morte de mais 50% das células na diluição 1:32. Entretanto, na linhagem Vero, a mesma porcentagem só foi atingida quando usadas concentrações maiores da hemolisina (diluição 1:16).

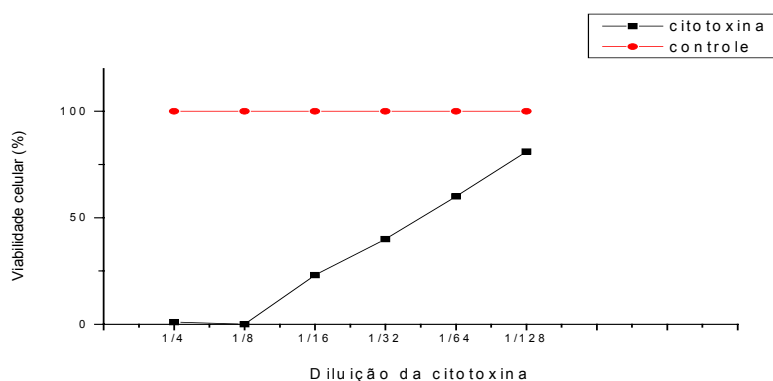


**FIGURA 4.** Fotomicrografia do efeito biológico da hemolisina de *E. cloacae* EC118 em células Vero. Em (A) e (B) microscopia de contraste de fase, (C) e (D) células coradas com azul de toluidina. Observa-se alterações no núcleo e no citoplasma (B) e (D). Controle de células Vero (A) e (C). Aumentos: (A) 100x, (B, C, D) 400x.

(→) Seta simples indica as alterações no citoplasma, (n) indica núcleo normal, (na) núcleo alterado.



**FIGURA 5.** Cinética de morte celular provocada pela hemolisina produzida por *E. cloacae* em cultura de células Vero. Após 48 h de tratamento com a hemolisina nas diferentes diluições indicadas, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico com o vermelho neutro.



**FIGURA 6.** Cinética de morte celular provocada pela hemolisina semi-purificada de *E. cloacae* em cultura de células NG 97. Após 48 h de tratamento com a hemolisina nas diferentes diluições indicadas, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico com o vermelho neutro.



### 3.6.2. Atividade biológica *in vivo*

#### 3.6.2.1. Teste de alça ligada em intestino de coelhos e de ratos

A hemolisina semi-purificada e o sobrenadante de cultura de *E. cloacae* foram examinados quanto à atividade enterotóxica em alça ligada intestinal de coelho. Os coeficientes RIL (volume do conteúdo da alça/ comprimento da alça em cm) obtidos para cada amostra em teste são mostrados na Tabela 8, assim como a descrição da aparência macroscópica observada no experimento.

Os resultados obtidos em alça ligada de intestino de rato (Tabela 8) mostram que tanto o sobrenadante de cultura quanto a hemolisina semi-purificada causaram acúmulo de fluído com intensa hemorragia. Entretanto, não foi possível medir o volume de líquido da alça intestinal de rato, devido a sua elevada viscosidade.

**TABELA 8.** Resultados obtidos no teste de alça ligada de coelho e rato e coeficientes RIL obtidos no teste de alça ligada de coelho.

Amostras	RIL <sup>a</sup>	Aspecto macroscópico	
		coelho	rato
Sobrenadante de cultivo EC118	0,98	Acúmulo de fluído <sup>b</sup>	Hemorrágico <sup>d</sup>
Hemolisina semi-purificada	1,0	Acúmulo intenso de fluído	Hemorrágico intenso
Meio de cultura TSB+glicose	-	Normal <sup>c</sup>	Normal <sup>c</sup>
Sobrenadante de cultivo <i>E. coli</i> K12	-	Normal <sup>c</sup>	Normal <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Coeficiente RIL (volume do conteúdo da alça/ comprimento da alça em cm) da alça ligada intestinal de coelho.

<sup>b</sup> Acúmulo de fluído: fluído viscoso.

<sup>c</sup> Normal: sem acúmulo de fluído.

<sup>d</sup> Hemorrágica: acúmulo de fluído viscoso e sanguinolento.

### 3.6.2.2. Ensaio em camundongos recém-nascidos, dorso de coelho e letalidade em camundongos

O sobrenadante de cultura ou hemolisina semi-purificada de *E. cloacae* não causaram acúmulo de líquido durante o período de incubação (3 h) nos camundongos recém-nascidos (Tabela 9).

Após 24 h após da inoculação da hemolisina, seguido pela retirada da pele do dorso do coelho, não foi observada necrose e nem o aparecimento de azulamento no local de aplicação da hemolisina semi-purificada ou sobrenadante de cultura da *E. cloacae* EC118 (Tabela 9).

Quando inoculados por via intravenosa em camundongos da raça BALB/c (Tabela 9), a hemolisina semi-purificada e/ou sobrenadante de cultura, não causaram nenhuma sintomatologia durante 7 dias de observação,.

**TABELA 9.** Resultados da caracterização biológica *in vivo* da hemolisina de *E. cloacae* em diferentes sistemas.

Ensaio em animais	Atividade biológica
Alça ligada de coelho	*Positivo
Alça ligada de rato	**Positivo
Teste em camundongo recém-nascido	Negativo
Ensaio em pele de coelho	Negativo
Patogenicidade em camundongo	Negativo

Testes realizados com a hemolisina semi-purificada em NaCl 0,15M de tal modo a proporcionar um título de hemólise 1:128 como descrito em Material e Métodos.

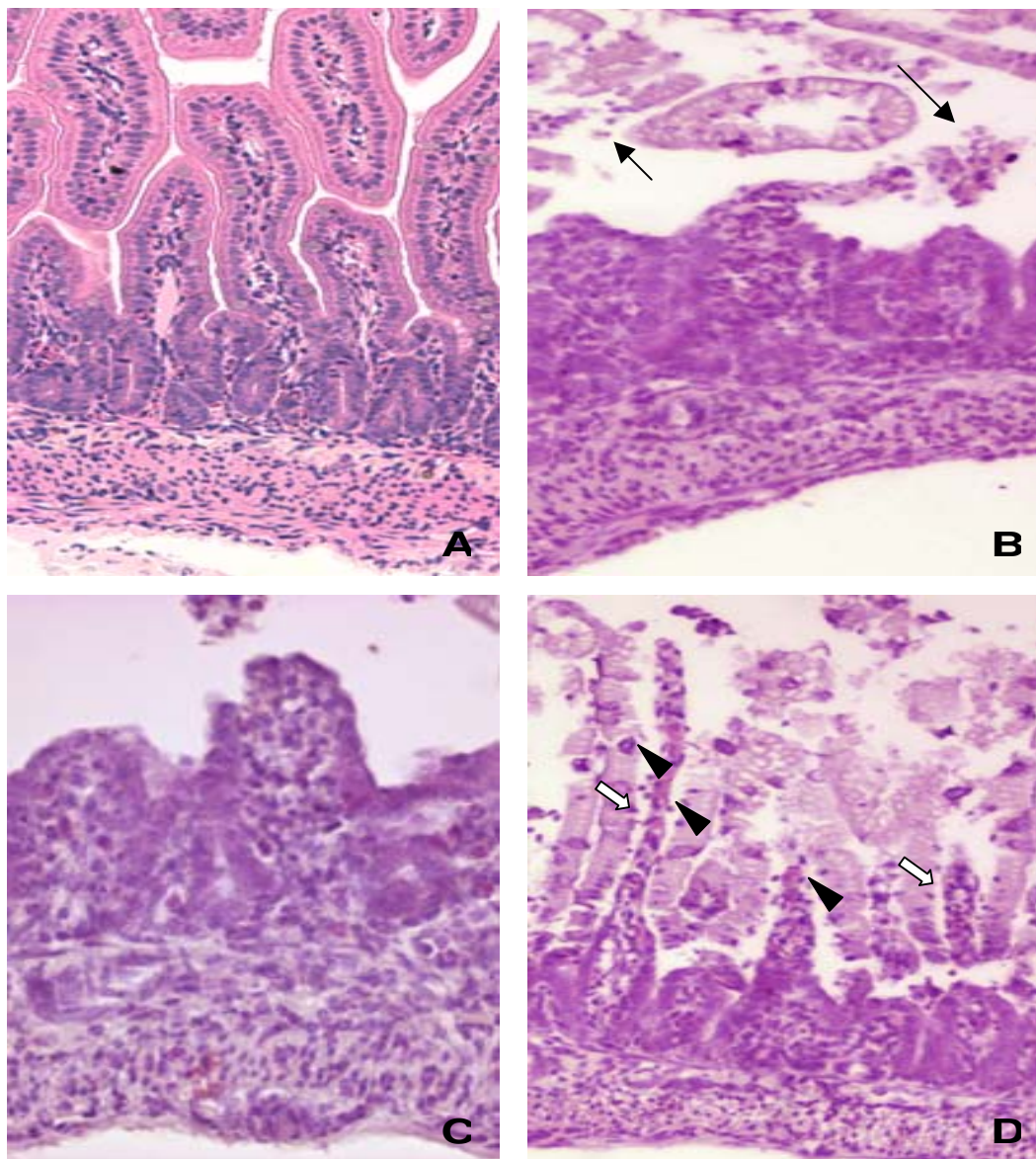
\* Aspecto macroscópico do intestino: acúmulo de secreção.

\*\*Aspecto macroscópico do intestino: acúmulo de secreção turbida e sanguinolenta.

### **3.6.3. Alterações morfológicas induzidas pela hemolisina de *E. cloacae* em células epiteliais intestinais de ratos**

#### **3.6.3.1. Microscopia de luz**

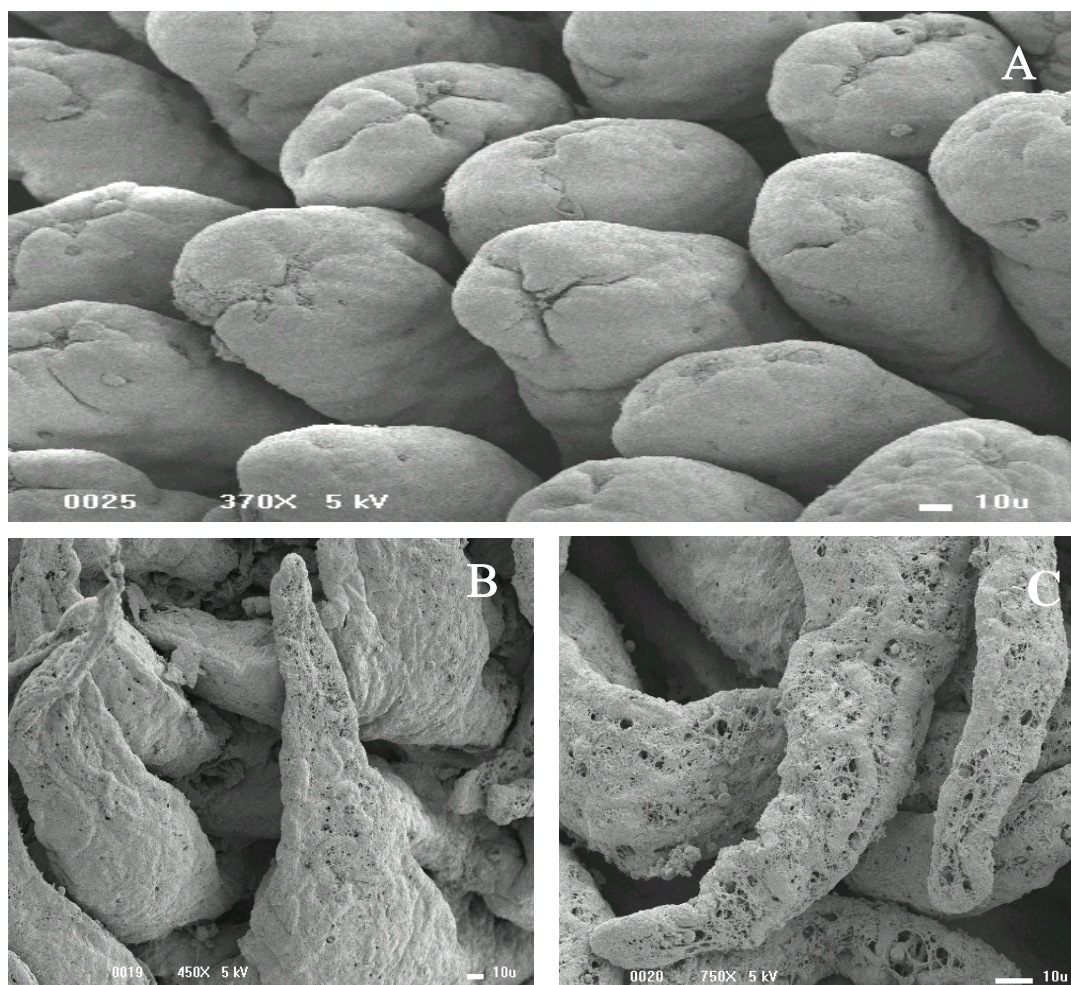
Os resultados obtidos após o ensaio de enterotoxicidade mostraram acúmulo de fluído com áreas hemorrágicas nas alças tratadas com a hemolisina semi-purificada. As principais alterações observadas nos cortes histológicos após o contato da mucosa intestinal com a hemolisina, quando comparadas com as células controles de aparência normal (Figura 7), foram atrofia, fusão e necrose das vilosidades. Em algumas áreas foi observado alteração da arquitetura da mucosa intestinal, com exposição da lâmina própria desde a cripta até a região apical dos vilos. Observou-se também alteração na arquitetura do tecido conjuntivo e descamação das células epiteliais. Infiltração de eosinófilos na lâmina própria foi visualizada. Na mucosa também observou-se fragmentos de células epiteliais e vasos congestionados.



**FIGURA 7.** Fotomicrografia dos cortes histológicos das alças de ratos após tratamento com hemolisina semi-purificada de *E. cloacae* (Simi *et al.*, 2003). (A)- Controle de células epiteliais. Comparado com controle, a hemolisina causou atrofia, fusão e necrose das vilosidades -(B), desorganização do tecido conectivo (■) , células epiteliais destacadas (● ) -(B,C) e exposição da lâmina própria (● ) -(D), 430x. Nota-se a infiltração de granulócitos (◄) na lâmina própria -(D).

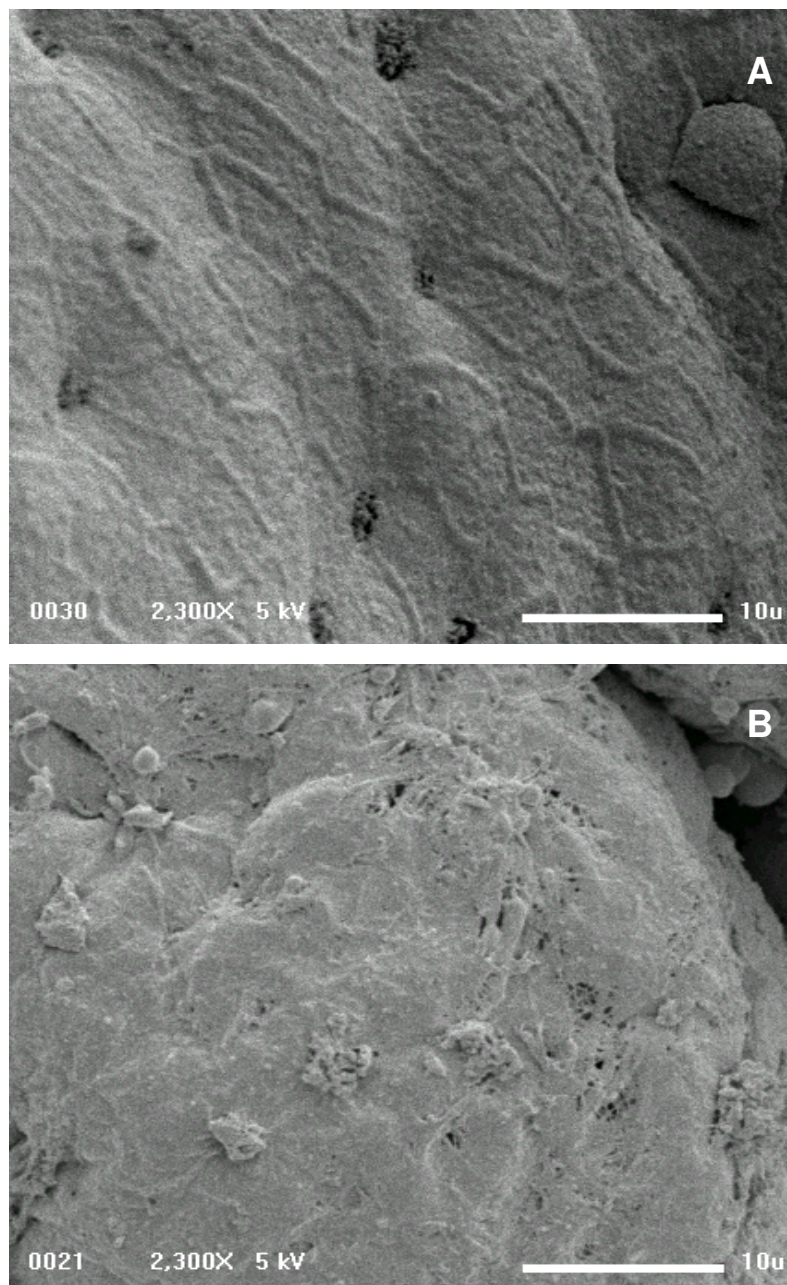
### 3.6.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A hemolisina semi-purificada de *E. cloacae* foi capaz de induzir uma severa desorganização estrutural, provocando alteração e redução no volume das vilosidades (Figura 8B). Foram observados inúmeros poros nas vilosidades, provavelmente formados como resultado do desarranjo da arquitetura e descamação das mesmas (Figura 8C). As análises ultraestruturais revelaram ainda que as células superficiais, ao contrário do controle (Figura 8A), mostraram desarranjo celular (Figura 9).



**FIGURA 8.** Análise ultraestrutural das alças intestinais de ratos tratadas com hemolisina semi-purificada através de MEV. (A)- Controle das vilosidades intestinais, 370x. (B-C)- Vilosidades intestinais tratadas com a hemolisina de *E. cloacae*. Observa-se desorganização e redução do tamanho e presença de inúmeros poros nas vilosidades quando comparadas ao controle. Aumento 450x (B) e 750x (C).

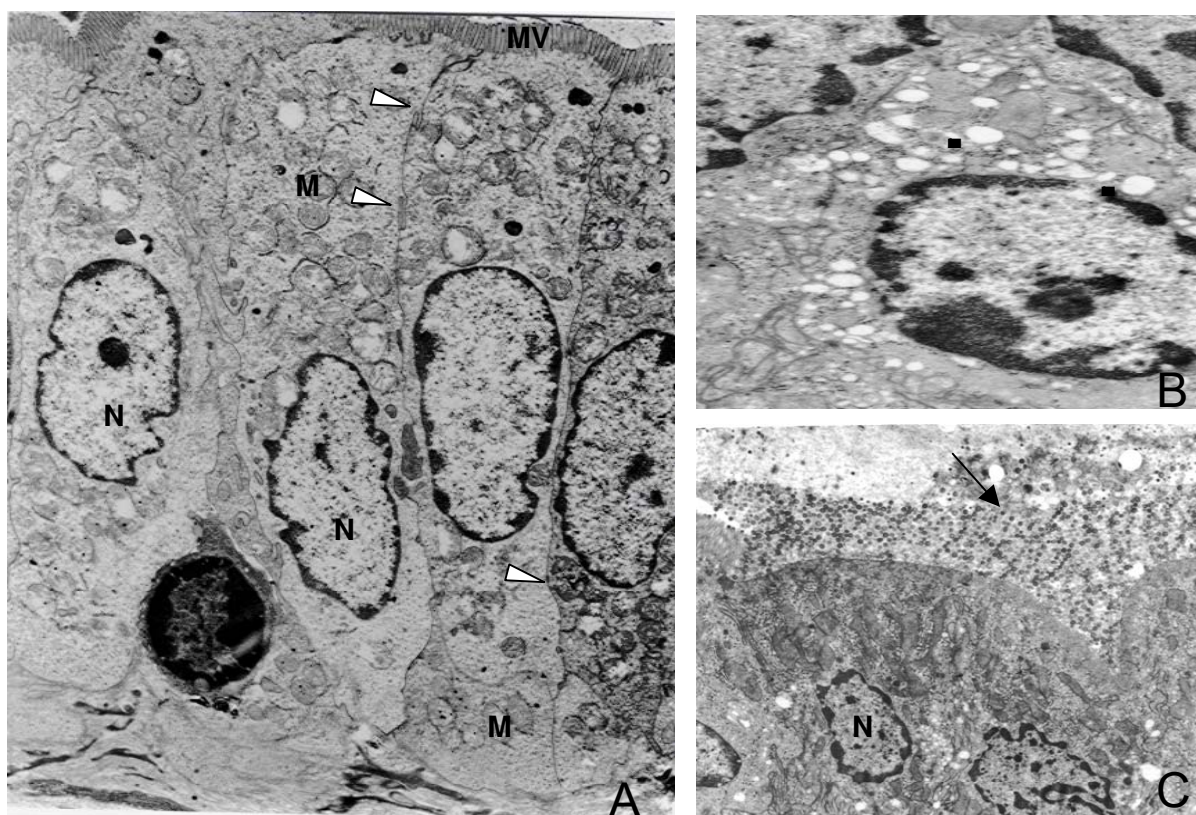




**FIGURA 9.** Microscopia eletrônica de varredura de células epiteliais intestinais de rato tratadas com hemolisina semi-purificada de *E. cloacae*. (A)- Organização das células epiteliais superficiais, 2.300x. (B)- Quando comparado ao controle, observa-se desarranjo da arquitetura as células superficiais das vilosidades tratadas com a hemolisina.

### 3.6.3.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As análises microscópicas revelaram severos danos ultraestruturais quando as vilosidades intestinais de rato foram tratadas com a hemolisina de *E. cloacae*. Observou-se uma destruição geral das microvilosidades, alteração do tecido conectivo e membrana basal (Figura 10). Aspectos como descamação celular, base celular repleta de vesículas e a presença de eosinófilos foram constatados. O controle celular não mostrou alterações na orientação das microvilosidades e nenhuma modificação na estrutura das organelas celulares.



**FIGURA 10.** Aspectos ultraestruturais da mucosa intestinal de ratos após o tratamento com a hemolisina semi-purificada de *E. cloacae*, visualizados por MET. (A)- Controle da célula epitelial de rato, núcleo (N), microvilosidades (MV), junção intercelular (seta branca), mitocôndrias (M), 3000x. (B) Estágio primário da ação da hemolisina sendo observado a vacuolização do citoplasma das células epiteliais (■), 7750x. (C)- Vista geral das células epiteliais intestinais e as alterações provocadas pela ação da hemolisina em um estágio superior da ação da hemolisina. Quando comparado com o controle mostrou alteração geral da arquitetura das microvilosidades (→) e condensação nuclear (N), 3600x.

## ***Discussão***



#### **4. Discussão**

*Enterobacter cloacae* tem se destacado como um importante agente de infecção hospitalar, causando infecções do trato respiratório e urinário, sepses e infecções em feridas cirúrgicas (Sanders & Sanders, 1997).

Embora várias características de virulência tenham sido descritas em *E. cloacae* (Prada & Beutin, 1991, Barnes *et al.*, 1997, Keller *et al.* 1998), os fatores envolvidos na patogenicidade da espécie ainda não estão bem elucidados. Dados recentes relataram que linhagens clínicas de *E. cloacae* expressam uma hemolisina de baixa massa molecular com atividade enterotóxica em intestino de ratos (Simi *et al.*, 2003). A produção de hemolisinas pelas bactérias pode ser um importante fator de virulência, causando danos em tecidos e permitindo a penetração bacteriana em camadas de tecidos e subsequente invasão do hospedeiro (Finlay & Falkow, 1989).

O primeiro relato da produção de hemolisina em amostras de *E. cloacae* foi feito por Prada & Beutin (1991), que detectaram as seqüências genéticas e expressão da  $\alpha$ -hemolisina de *E. coli* em *E. cloacae*. Barnes *et al.* (1997, 2001) e Albesa *et al.* (2000) reportaram uma toxina extracelular tiol-ativada com atividade leucotóxica e hemolítica em *E. cloacae*.

Em nosso estudo (Simi *et al.*, 2003), verificou-se que 14% das linhagens de *E. cloacae* examinadas produziram um discreto halo de hemólise parcial ao redor do crescimento bacteriano em ágar-sangue com hemácias de cavalo e de carneiro, diferente do halo de hemólise característico da  $\alpha$ -hemolisina. Observou-se ainda que o halo de hemólise foi mais evidente quando a bactéria foi semeada em profundidade no ágar-sangue.

As hemolisinas podem variar grandemente quanto a sua ação em eritrócitos (Rowe & Welch, 1994). Os testes de hemólise em microplaca com diferentes eritrócitos, mostraram que as hemácias mais sensíveis à hemolisina de *E. cloacae* foram as de cavalo e carneiro (Tabela 2), enquanto que as hemácias de coelho, galinha e boi não foram sensíveis. Rennie & Arbuthnott (1974) relataram que eritrócitos de carneiro e coelho foram os mais suscetíveis para  $\alpha$ -hemolisina de *E. coli*, enquanto hemácias de humanos e de camundongos seriam menos suscetíveis. Assim, a hemolisina de *E. cloacae* parece ser diferente da  $\alpha$ -hemolisina de *E. coli* quanto à atividade hemolítica.

A expressão da atividade hemolítica pode ser influenciada pela composição do meio utilizado para o cultivo da amostra (Rowe & Welch, 1994). Por exemplo, os meios de cultura

enriquecidos com açúcares têm sido amplamente utilizados para a produção de toxinas (Alderete & Robertson, 1978; Dubreuil *et al.*, 1991; Booth *et al.*, 1996). Honda & Finkenstein (1979) relataram que o cultivo da amostra padrão produtora de hemolisina de *Vibrio cholerae* El Tor é intensificado quando esta amostra é cultivada em meio de 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 era o meio Syncase, em cultura estacionária a 30°C, também acrescido de 3% de glicerol.

Foram encontradas variações na produção de hemolisina com o cultivo da linhagem EC118 nos diferentes meios examinados (Tabela 3). Os meios de cultura TSB e BHI foram os que proporcionaram maior título de atividade hemolítica. Verificou-se ainda que, quando acrescido de D-glicose, a atividade hemolítica aumentava (Tabela 3). Quando este meio foi preparado em diferentes valores de pH, observou-se que em pH ácido (5,5 a 6,5) e alcalino (8,0 e 8,5) a expressão da atividade hemolítica foi menor que em pH (7,4). Portanto, nos ensaios realizados nesse estudo a linhagem de *E. cloacae* EC118 foi sempre cultivada em TSB suplementado com 0,5% de D-glicose em pH 7,4.

Variações nas condições atmosféricas de cultivo (cultivo estático, agitação ou anaerobiose) foram ensaiadas com o intuito de aumentar a produção da hemolisina de *E. cloacae*. Apesar de muitas toxinas bacterianas já caracterizadas como as verotoxinas (MacLeod & Gyles, 1989) e CNF (Della Colleta, 1997), expressarem um maior título de toxina com o cultivo em agitação, em nossos estudos esta condição suprimiu a produção da hemolisina de *E. cloacae* (Tabela 3). O cultivo estacionário foi o que proporcionou melhor título de citotoxina de *E. cloacae* (Tabela 3), estando de acordo com Barnes *et al.* (1997), que utilizaram o cultivo estacionário para a produção de uma citotoxina de *E. cloacae*.

A utilização de quelantes de ferro no meio de cultura para aumentar a produção de toxinas bacterianas têm sido relatado (Carbonell & Vidotto, 1992; Chart *et al.*, 1998). O cultivo de *E. cloacae* em meio com quelantes de ferro (dipiridil e EDDA) reduziram o crescimento bacteriano, porém, não houve alteração no título de hemólise quando comparado com o controle sem quelante. Resultado similar foi observado com a presença de EDTA no meio de cultura. Esses dados nos levam a acreditar que o crescimento bacteriano em estresse de ferro não altera a expressão da hemolisina estudada.

Relatos de que a presença de antimicrobianos no meio de cultivo podem aumentar a síntese de toxinas bacterianas, incluindo as verotoxinas, já foram descritos por alguns autores (MacLeod & Gyles, 1990). Porém, neste estudo, não observou-se alteração na

produção da hemolisina de *E. cloacae* com a adição de ampicilina ao meio de cultivo.

Toxinas intracelulares podem necessitar de um rompimento mecânico das células para libera-lás do espaço periplasmático (Rowe & Welch, 1994). O Fator Necrosante Citotóxico (CNF) por exemplo, é liberado em baixa quantidade no meio de cultura, necessitando de uma forma de rompimento celular para a sua solubilização (Blanco & Blanco, 1993). Deste modo, o rompimento da bactéria por ultrassonicação, mostrou que a hemolisina de *E. cloacae* não é intracelular, sendo secretada espontaneamente no sobrenadante de cultura. No ensaio líquido de hemólise, onde o sobrenadante de cultura e sedimento bacteriano foram analisados separadamente quanto à atividade hemolítica confirmaram este dado.

A ultrafiltração é um método amplamente utilizado nos processos de purificação de inúmeras toxinas (Klipstein & Engert, 1976; Alderete & Robertson, 1978; Guarino *et al.*, 1989). Neste estudo, quando foi realizada a ultrafiltração do sobrenadante de cultura em membrana PM10 (Amicon), que retém proteínas maiores que 10.000 Da, verificou-se que a atividade hemolítica se encontrava na fração filtrada. Na fração retida na membrana não detectou-se atividade hemolítica, indicando que a hemolisina estudada tem massa molecular menor que 10 kDa. Com base nestes resultados a ultrafiltração passou a ser utilizada como primeiro passo da purificação.

Enterotoxinas termoestáveis como a de *E. cloacae* (Klipstein & Engert, 1976), *K. pneumoniae* (Klipstein & Engert, 1976b) e *E. coli* (Alderete & Robertson, 1978; Takeda *et al.*, 1979), possuem massa molecular menor do que 10 kDa, enquanto que a citotoxina de *E. cloacae* descrita por Barnes *et al.* (1997) possui uma massa molecular estimada de 13 kDa.

O fracionamento por sulfato de amônio tem sido amplamente usado em processos de purificação de várias proteínas, enzimas e hemolisinas de diferentes espécies bacterianas (Ding & Lämmler, 1996; Barnes *et al.*, 1997). Todas essas 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 hemolisina aqui estudada, a precipitação fracionada do sobrenadante de cultura com sulfato de amônio não foi eficiente em nenhuma das frações examinadas (dados não apresentados). Fato como este já foi observado com a toxina citoletal distensora (CDT) de *E. coli* que perde sua atividade biológica com este tratamento (Pancetti, 1997).

Seguido à ultrafiltração do sobrenadante de cultura de *E. cloacae*, utilizou-se a precipitação com acetona. Nos trabalhos de Klipstein & Engert (1976), Alderete &

Robertson (1978) e Guarino *et al.* (1989), esta metodologia foi empregada como passo inicial na purificação de enterotoxinas. Neste trabalho, seguido a ultrafiltração do sobrenadante de cultura de *E. cloacae* utilizou-se esta metodologia, verificando-se que a hemolisina foi solúvel, pois se encontrava no sobrenadante e não na fração precipitada. Por ser uma técnica simples, e que concentrou a hemolisina em aproximadamente 8 vezes (Tabela 4), adotamos essa metodologia para a produção da hemolisina.

Arita *et al.* (1991) utilizaram cromatografia de fase reversa em HPLC em resina de hidrofobicidade para purificação de uma enterotoxina termoestável de *Vibrio mimicus*. Com base neste dado, os processos cromatográficos foram iniciados com colunas de hidrofobicidade de fase reversa. Na Figura 1, observa-se o pico com atividade hemolítica, obtido em cromatografia em fase reversa em coluna C<sub>18</sub> preparativa. O perfil cromatográfico obtido sugere que a hemolisina seja hidrofílica, pois foi eluída antes do início do gradiente com Acetonitrila. Na cromatografia em resina analítica, encontrou-se perfis cromatográficos parecidos (Figuras 1 e 2). Porém, ao testar a atividade biológica do pico coletado, verificou-se uma queda significativa no título de atividade hemolítica (Tabela 4).

Outras cromatografias, empregando resinas de gel filtração ou troca iônica foram realizadas (dados não apresentados). Porém não foram obtido resultados satisfatórios, com perda da atividade hemolítica nas cromatografias realizadas com estas resinas. Cromatografias convencionais de troca aniônica (MonoQ) e troca catiônica (MonoS) não apresentaram resultados satisfatórios em termos de purificação da hemolisina (dados não apresentados). Em ambas as resinas obteve-se cromatograma semelhante, com o pico de atividade hemolítica sendo eluído antes do início do gradiente com NaCl, o que sugere que a molécula em questão não interagiu com as resinas testadas. Uma possível explicação para este fato seria que o suposto peptídeo possua massa molecular pequena com cargas iônicas insuficientes para se ligar às resinas ensaiadas.

Com o objetivo de verificar o grau de pureza da hemolisina de *E. cloacae* em cada etapa da purificação, foram usadas eletroforeses descritas para separação de proteínas de baixo peso molecular: eletroforese em gel de SDS-PAGE (Swank & Munkres, 1971) e Tricina-SDS-PAGE (Schägger & Jagow, 1987), ambos com alta concentração de acrilamida, na presença ou não de uréia, sendo usadas metodologias convencionais para a coloração. Contudo, mesmo em condições redutoras, não se conseguiu visualizar bandas protéicas. Para a coloração dos géis, usou-se as metodologias de coloração por Prata e Coomassie Blue. Uma possível explicação para este fato, é que a molécula em questão possua massa molecular insuficiente para detectar-se no gel, ou que esta molécula seja

resistente aos corantes convencionais. Dreyfus *et al.* (1983) e Alderete & Robertson (1978) observaram que a enterotoxina termoestável (STI) de *E. coli* mostravam resistência à coloração usando métodos convencionais.

Com base nestes dados, outras metodologias para determinar o grau de pureza e a massa molecular da hemolisina de *E. cloacae* foram pesquisadas. O pico cromatográfico obtido na coluna C<sub>18</sub> analítica (Figura 2), foi submetido à análise de massas por espectrometria em massa de alta resolução em MALDI-TOF (Ionização a Laser com MS com TOF de Alta Resolução) no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas, no Instituto de Química, Unicamp. Entretanto, mesmo com o uso de diferentes matrizes (Shields & Oyeyemi, 2003; Laval *et al.*, 2001), a toxina de *E. cloacae* não se mostrou ionizável, o que impossibilitou a determinação de sua massa por essa metodologia.

A hemolisina semi-purificada de *E. cloacae* apresentou um espectro ultravioleta característico, exibindo uma absorção máxima a 260 nm. Foi observada baixa absorção a 280 nm, sugere que esta hemolisina apresente poucos ou nenhum aminoácidos aromáticos na sua composição. Por esta razão, não foi possível determinar a concentração protéica da hemolisina semi-purificada de *E. cloacae* pela metodologia proposta no item 2.4.3. Esta alta absorbância da hemolisina a 260 nm, a princípio, nos levou a procurar a presença de contaminação por ácido nucléico. Porém, através de eletroforese em gel de agarose e coloração com Brometo de Etídeo (dados não mostrados) não foi encontrado nenhum rastro de ácido nucléico na hemolisina semi-purificada, sugerindo que a absorção a 260 nm seja uma característica desta toxina. Fenômeno semelhante também foi observado por Alderete & Robertson (1978) com enterotoxina termoestável produzida por amostras de *E. coli* enterotoxigênica isoladas de suínos.

A metodologia descrita por Bradford (1976) também foi utilizada na tentativa de quantificar a hemolisina de *E. cloacae*. Entretanto, essa metodologia também se mostrou ineficaz para quantificar a hemolisina, o que indica que a hemolisina em questão seja um peptídeo de baixa massa molecular. Portanto, para realização dos ensaios físico-químicos e biológicos a hemolisina semi-purificada foi padronizada com base na sua atividade hemolítica (título 1:128).

A exposição das enterotoxinas de *E. coli* (Dubreuil *et al.*, 1991), *K. pneumoniae* (Klipstein & Engert, 1976b), e *E. cloacae* (Klipstein & Engert, 1976) a temperaturas de 100°C por 30 min não inibe sua atividade biológica. Quando a hemolisina de *E. cloacae* EC118 foi aquecida a 60 ou 100°C por 30 min, também foi observada termoestabilidade similar (Tabela 5). As toxinas termolábeis (LT) de *E. coli* são sensíveis ao tratamento com

ácidos (Mitchell *et al.*, 1974), porém a STII de *E. coli* é resistente a pH ácidos, e não a pH alcalinos (Dubreuil, 1999). Nossos resultados mostraram que a hemolisina da *E. cloacae* EC118 é estável em pH ácido, e perde sua atividade hemolítica em pH neutro-alcalino, possivelmente por alteração em sua estrutura (Tabela 5).

A atividade biológica da STII de ETEC é sensível ao tratamento com tripsina (Fujii *et al.*, 1991), assim como a citotoxina de *E. cloacae* descrita por Barnes *et al.* (1997). Entretanto, nenhuma das enzimas proteolíticas testadas (Tripsina, Proteinase K e Pepsina) inibiu a hemolisina de *E. cloacae* EC118 (Tabela 5), sugerindo que o peptídeo não possua os sítios de clivagem para as enzimas testadas.

Estudos desenvolvidos por Barnes *et al.* (2001) com uma citotoxina de *E. cloacae* ativa em leucócitos e eritrócitos, mostraram que o efeito hemolítico era dependente da presença de cálcio (5-10 mM). Quando analisou-se a influência de diferentes concentrações de cálcio (1-10 mM) sobre a hemolisina de *E. cloacae*, verificou-se que a presença deste íon não alterou os títulos de hemólise (Tabela 5), sugerindo que o modo de ação da hemolisina estudada seja diferente da descrita por Barnes *et al.* (2001). No entanto, verificou-se que a presença do quelante EGTA inibiu a atividade biológica da hemolisina, sugerindo uma concentração mínima de íons bivalentes para a atividade hemolítica de *E. cloacae*.

A oxidação por periodato de sódio é amplamente utilizada para a determinação de carboidratos (Alderete & Robertson, 1978; Bhuiyan *et al.*, 1995). Quando a hemolisina semi-purificada foi submetida ao tratamento com esse agente, verificou-se que não houve alteração na atividade hemolítica, sugerindo que a molécula não seja composta por açúcares.

Barnes *et al.* (1997) relataram que *E. cloacae* produz uma toxina com massa molecular estimada entre 13 kDa, com capacidade de lisar eritrócitos somente após redução com 2-mercaptoetanol (2-ME). *Klebsiella pneumoniae*, uma espécie relacionada com *E. cloacae*, também produz hemolisinas dependentes do tratamento com 2-ME (Albesa *et al.* 1985). Entretanto, observou-se que a atividade hemolítica de *E. cloacae* EC118 não foi sensível ao oxigênio, uma vez que a redução com 0,18 M de 2-ME não alterou o título de atividade hemolítica (Tabela 5). Este resultado indica que a hemolisina estudada não está associada com as lisinas tiol-ativadas de outras bactérias.

As enterotoxinas termoestáveis de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) têm sido diferenciadas em dois grupos com base na solubilidade em solventes orgânicos. STI é solúvel em metanol enquanto que a enterotoxina STII é metanol insolúvel (Fujii *et al.*, 1991).

A hemolisina semi-purificada de *E. cloacae* permaneceu solúvel quando tratada com acetona, metanol ou etanol (Tabela 5).

Foi demonstrado com o ensaio de proteção osmótica usando diferentes carboidratos, que o dextran 4 (diâmetro molecular ~ 4 nm) pode bloquear a lise das hemácias induzida pela hemolisina de *E. cloacae* (Tabela 6). Uma vez que carboidratos como sacarose (diâmetro 0,9 nm) ou rafinose (diâmetro 1,2 a 1,4 nm) não inibiram a lise, sugerindo que a hemolisina pode ser capaz de formar poros na membrana dos eritrócitos cujo diâmetro oscile entre 3,5 a 4,3 nm. Estes diâmetros de poro podem ser comparados com os diâmetros estimados formados em eritrócitos pela  $\alpha$ -hemolisina de *E. coli* (2 a 3 nm) ou pela  $\alpha$ -toxina de *Staphylococcus aureus* (2 a 3 nm) (Bhakdi & Tranum-Jensen, 1986).

O mecanismo de ação das hemolisinas pode ser classificado em três categorias: formador de poros, enzimático ou surfactantes (propriedades detergentes) (Rowe & Welch, 1994). Não encontrou-se evidências de que o mecanismo de ação desta hemolisina seja enzimático, desde que enzimas proteolíticas testadas (Tabela 5) não inibiram a atividade hemolítica. A toxina delta de *Staphylococcus aureus* (Wiseman, 1970) e a hemolisina termoestável de *Pseudomonas aeruginosa* (Liu, 1974) são surfactantes. Estas toxinas são altamente hidrofóbicas e sua ação detergente causa lise pela solubilização da membrana celular (Rowe & Welch, 1994). Estas informações nos levam a acreditar que a hemolisina de *E. cloacae* não seja um surfactante, pois, ao contrário destas toxinas, a hemolisina por nós estudada é hidrofílica e sua hemólise foi bloqueada por dextran 4.

A  $\alpha$ -hemolisina de *E. coli* e outras hemolisinas de bactérias Gram-negativas têm a propriedade de formação de poros pela inserção de uma cadeia polipeptídica na membrana alvo (Welch, 1991). A hemólise induzida pelas hemolisinas formadoras de poros é dependente da temperatura de incubação (Rowe & Welch, 1994) e pode ser totalmente inibida pela adição de 30 mM de dextran 4 ao meio extracelular (Bhakdi *et al.*, 1986). No entanto, verificou-se que a atividade citolítica da hemolisina estudada não é temperatura dependente, podendo ocorrer a 4, 25 e 37°C, sendo que seu mecanismo de ação tem início após 1 min e alcança 100% de lise em 30 min após o tratamento (Tabela 7). Porém, o fato do dextran 4 inibir a atividade hemolítica sugere que, possivelmente, a propriedade de formação de poros esteja associado com o mecanismo de ação da hemólise induzida pela toxina de *E. cloacae*.

Eritrócitos tratados com dose sublética de hemolisina de *E. cloacae* visualizados por microscopia eletrônica de varredura revelaram perda de volume celular e desorganização na membrana celular, como rugosidade e presença de estruturas globulares na superfície,

quando comparado ao controle (Figura 3). Não foi observada a presença de estruturas que lembrassem poros na superfície da membrana dos eritrócitos. Porém, o metal que recobre as amostras para a microscopia de varredura pode mascarar estruturas menores do que 20 nm, o que reforça a idéia de que o poro formado pela hemolisina estudada seja menor do que 20 nm.

Quando analisou-se a atividade biológica da hemolisina de *E. cloacae* em células Vero, observou-se que esta causou citotoxicidade após 30 min da sua aplicação. O efeito citopático se dá principalmente no citoplasma celular, onde predomina o enrugamento citoplasmático e perda de junção intercelular. Aspectos como condensamento do núcleo celular foram observados, no entanto, experimentos mais sensíveis e específicos são necessários para confirmar uma possível alteração nuclear. Não obstante, estes efeitos são aparentemente diferentes daqueles causados por verotoxinas, capazes de provocar arredondamento celular, condensação do núcleo e descolamento da monocamada de células Vero. O efeito citopático de *E. cloacae* também difere dos observados em células Vero tratadas com CNF, cuja característica principal é a multinucleação (Della Colleta, 1997).

Ensaio de citotoxicidade em células Vero e NG 97, demonstraram que a hemolisina semi-purificada de *E. cloacae* interagiu com ambas linhagens. Estes resultados foram confirmados no teste de viabilidade celular através do ensaio de vermelho neutro, onde as duas linhagens celulares reproduzem uma cinética similar quanto ao percentual de células viáveis. Porém a linhagem de células NG 97 se mostrou mais sensível, apresentando uma taxa de morte de mais de 50% das células na diluição 1:32, enquanto que as células Vero precisam de concentrações maiores da hemolisina para atingir a mesma porcentagem de sobrevivência celular.

Nos testes realizados *in vivo*, verificou-se que a hemolisina semi-purificada causou o acúmulo de secreção em alça ligada intestinal de ratos e coelhos. A análise macroscópica da toxicidade da hemolisina em alça ligada do intestino de rato (Tabela 8) revelou um acúmulo de fluído viscoso com intensa hemorragia, que foi menos intensa com o sobrenadante de cultura EC118. No intestino de coelho observou-se que a hemolisina induziu um intenso acúmulo de fluído viscoso, porém sem a presença de hemorragia, como observado nas alças ligadas de intestino de rato, demonstrando que os danos celulares neste modelo animal são severos. Estes resultados indicam que a hemolisina de *E. cloacae* é enterotóxica e que células epiteliais de intestino de rato mostram-se mais sensíveis ao efeito citotóxico, sugerindo a possível presença de receptores específicos nesta espécie. A



atividade hemolítica e enterotóxica já foi observada em outras bactérias patogênicas (Ljung *et al.* 1981; Barret & Blake 1981; Takeda 1988; Falcón, 2003). Klipstein & Engert (1976) demonstraram que os sobrenadantes de cultura de amostras de *E. cloacae* causavam secreção de fluido no jejuno de rato. Entretanto, os autores não citam a presença de hemorragia assim como o observado com *E. cloacae* EC118 em alça ligada de rato.

Nos testes em camundongos recém-nascidos a hemolisina semi-purificada não causou acúmulo de fluido em seus intestinos. A enterotoxina STII de ETEC não mostra atividade enterotóxica em camundongo recém-nascido, a menos que um inibidor de protease esteja presente no ensaio (Fujii *et al.*, 1991). Porém, mesmo na presença de aprotinina (inibidor de proteases), não observou-se acúmulo de fluido no intestino dos camundongos (dados não apresentados). Uma possível explicação para a atividade enterotóxica em alça intestinal e sua ausência no teste em camundongos recém-nascidos, seria o tempo de incubação que no ensaio de alça intestinal de rato foi de 8 h, enquanto que nos camundongos recém-nascidos foi de 3 h.

Takeda *et al.* (1979) demonstraram que a enterotoxina termoestável de ETEC provocava aumento da permeabilidade celular quando injetadas em pele de suínos. Entretanto, a hemolisina de *E. cloacae* EC118 não apresentou uma reação positiva no teste em pele de coelho.

Em testes utilizando a hemolisina termoestável de *Vibrio parahaemolyticus*, Takeda (1988) detectou atividade letal através de injeções intravenosas em camundongos, ratos e cobaias. Porém, a hemolisina semi-purificada de *E. cloacae* não foi letal em camundongos. Resultados semelhantes foram observados com as enterotoxinas termoestáveis de ETEC (Takeda *et al.*, 1979).

Estudos sobre a patogenicidade de bactérias causadoras de diarreia revelaram que existem duas respostas morfológicamente distintas da mucosa intestinal para toxinas diarreicas. Pesquisadores têm demonstrado que enterotoxinas de *Vibrio cholera* e *Escherichia coli* induzem severa produção de fluido sem causar alterações no epitélio e na lamina própria do íleo (Leitch *et al.*, 1966; Norris & Majino, 1968; Elliot *et al.*, 1970; Moon *et al.*, 1971). Fenômeno semelhante também foi visto em intestino de camundongos tratados com enterotoxina de *Clostridium perfringens* (Ohishi & Odagiri, 1984). Em contraste, a injeção de toxina produzida por *C. difficile* em alças ligadas de intestino de hamsters causa acúmulo de fluido e destruição do tecido da mucosa (Taylor *et al.*, 1981). A toxina C2 botulínica também causa mudanças degenerativas e necrose em alça intestinal de camundongo (Ohishi, 1983; Ohishi & Odagiri, 1984), enquanto que a hemolisina

termoestável de *Vibrio parahaemolyticus* (TDH) leva a lesões erosivas, descamação da mucosa necrótica e infiltração de neutrófilos na parede intestinal de coelhos (Takeda, 1988). Estudo recente demonstrou que a enterotoxina citotóxica de *Aeromonas hydrophila* causa severos danos histológicos em alça intestinal de ratos, caracterizados pela destruição das vilosidades intestinais, além da destruição dos enterócitos, alterações nas organelas intracelulares e perda do arranjo celular do tecido conectivo (Falcón, 2003).

Os resultados do nosso estudo mostraram que a hemolisina semi-purificada de *E. cloacae* foi capaz de causar acúmulo de líquido com sangue em ensaio de alça de intestino de ratos, 10 h após a inoculação. As análises histológicas do tecido intestinal revelaram que a hemolisina induziu alterações severas na mucosa intestinal, como atrofia, fusão e necrose das vilosidades, fragmentação de células epiteliais e exposição da lâmina própria, desde a cripta até a região apical dos vilos. A infiltração de eosinófilos foi observada na lâmina própria, sugerindo que a quimiotaxia destas células é provavelmente determinada pela ação da hemolisina de *E. cloacae* (Figura 7).

As lesões observadas nos tecidos tratados com a hemolisina semi-purificada em comparação às células controles observadas nas análises microscópicas, foram confirmadas nos estudos usando MEV e MET. As análises ultraestruturais demonstraram que a hemolisina semi-purificada induziu severos danos na arquitetura das microvilosidades, levando a alterações no tecido conectivo, descamação celular, ribossomos destacados das membranas e base celular vacuolizada, indicando a morte celular (Figura 10). A presença de granulócitos foi verificada, confirmando a ativação do sistema imune intestinal devido à ação toxigênica da hemolisina de *E. cloacae* nos enterócitos.

Apesar da hemolisina de *E. cloacae* apresentar características físico-químicas semelhantes à enterotoxina ST de *E. coli*, seu mecanismo de ação no intestino parece ser diferente. A enterotoxina ST de *E. coli* induz severo acúmulo de fluido em alças ligadas de intestino sem causar danos histológicos no mesmo (Moon *et al.*, 1971). Entretanto, observou-se que a hemolisina de *E. cloacae* induziu acúmulo de fluido nas alças de rato com severas alterações histológicas, semelhantes àsquelas induzidas pelo *C. difficile*, TDH do *V. parahaemolyticus* e enterotoxina citotóxica de *A. hydrophila* (Taylor *et al.*, 1981; Takeda, 1988; Falcón, 2003).

No intuito de avaliar a possível associação entre as atividades biológicas desenvolvidas pela hemolisina de *E. cloacae* e a presença de genes já descritos como responsáveis pela enteropatogenicidade de *E. coli* (LT 1, ST 1e ST 2, EAST1, stx 1e stx 2,

CNF1e CNF 2), foi realizado reações de PCR (dados não mostrados). Os resultados, embora negativos, porque não foi detectada a presença destes genes no genoma da linhagem de *E. cloacae* EC118, serviram de base para futuros estudos moleculares que permitiram esclarecer o papel desta hemolisina na patogenicidade de *E. cloacae*.

Neste estudo demonstramos que a *E. cloacae* produz uma hemolisina extracelular de baixa massa molecular, diferente das relatadas até o momento em *Enterobacter*. A hemolisina se mostrou ativa em diferentes eritrócitos, células Vero e NG 97, sendo a propriedade de formação de poros possivelmente associada ao seu mecanismo de ação. Em alça intestinal de coelho a hemolisina induziu secreção de fluído, e acúmulo de fluído sanguinolento em alça ligada intestinal de rato, com severas alterações histológicas. As características físico-químicas desta hemolisina se assemelham parcialmente com as enterotoxinas de *E. coli* (Dreyfus *et al.*, 1983; Arita *et al.*, 1991) e *E. cloacae* (Klipstein & Engert, 1976). Entretanto, os ensaios de PCR não detectaram os genes associados com as enterotoxinas termoestáveis de *E. coli* (STI, STII e EAST1).

Como a produção de hemolisina e enterotoxinas são considerados importantes fatores de virulência (Finlay & Falkow, 1989; Popoff, 1998), a hemolisina-enterotóxica estudada pode ser um possível fator de virulência entre as amostras de *E. cloacae*. Estudos sobre o mecanismo de ação da hemolisina no intestino e estudos epidemiológicos são necessários, visando esclarecer a sua importância como fator de virulência, além da sua possível relação com outros fatores já conhecidos produzidos por enterobactérias causadoras de diarreia em homens e animais.

## ***Conclusões***

## **5. Conclusões**

1. Das 50 linhagens clínicas de *E. cloacae* testadas, 14% apresentaram atividade hemolítica.
2. A melhor condição de cultivo encontrada para a produção da hemolisina pela linhagem EC118 de *E. cloacae* foi o meio TSB acrescido de glicose (0,5%) a 37°C, em cultivo estacionário.
3. A hemolisina é extracelular, com peso molecular menor do que 10 kDa.
4. A hemolisina foi semipurificada através de ultrafiltração, tratamento com acetona e cromatografia de hidrofobicidade em resina C<sub>18</sub>.
5. A caracterização físico-química mostrou que a hemolisina é termoestável, resistente ao tratamento com enzimas proteolíticas e periodato de sódio, e solúvel em solventes orgânicos, características semelhantes à enterotoxina STI de *E. coli*.
6. A hemolisina é possivelmente formadora de poros na membrana do eritrócito, pois a atividade hemolítica foi completamente inibida pelo dextran 4.
7. A hemolisina induz alterações morfológicas e intracelulares em diferentes espécies de eritrócitos e linhagens celulares.
8. Nos testes realizados *in vivo*, a hemolisina semi-purificada foi enterotóxica em alça ligada intestinal de coelho e rato.
9. A análise histológica revelou severas alterações na arquitetura do tecido intestinal de rato tratado com a hemolisina.
10. A hemolisina-enterotóxica estudada difere das hemolisinas descritas para *E. cloacae* até o presente momento, sendo um possível fator de virulência entre as linhagens de *E. cloacae*.

## ***Referências bibliográficas***

## **6. Referência bibliográfica**

- ALBESA, I. *et al.* A thiol-activated hemolysin in Gram-negative bacteria. Can J Microbiol, v.31, p. 297-300, 1985.
- ALBESA, I.; BARNES, A.I.; PARAJE, M.G. Induction of oxidative stress in leukocytes by an *Enterobacter cloacae* toxin able to form oligomers and binding to proteins. Bioch Bioph Res Commun, v.274, p.649-654, 2000.
- ALDERETE, J.F.; ROBERTSON, D.C. Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun, v.19, p.1021-1030, 1978.
- ANDERSEN, B.M.; SORLIE, D.; HOTVEDT, R. Multiply beta-lactam resistant *Enterobacter cloacae* infections linked to the environmental flora in a unit of cardiothoracic and vascular surgery. Scand J Infect Dis, v.21, p.181-189, 1989.
- ANDRESEN, J.; ASMAR, B.I.; DAJANI, A.S. Increasing *Enterobacter* bacteremia in pediatric patients. Pediatr Infect Dis, v.3, p.787-792, 1994.
- ARCHIBALD, L.K. *et al.* *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa* polymicrobial bloodstream infections traced to extrinsic contamination of a dextrose multidose vial. J Pediatr, v.133, p.640-644, 1998.
- ARITA, M. *et al.* Purification and characterization of a heat-stable enterotoxin of *Vibrio mimicus*. FEMS Microbiol Lett, v.79, p.105-110, 1991.
- BACK, E. *et al.* Enterotoxigenic *E.coli* and other Gram-negative bacteria of infantile diarrhea: surface antigens, hemagglutinins, colonization factor antigen and loss of enterotoxigenicity. J Infect Dis, v.142, p.318-327, 1980.
- BAINES, D. Analysis of purity. In: Roe, S. Protein purification techniques: a practical approach. Ohio: Oxford, 2001, Oxford University Press.
- BARNES, A.I. *et al.* Purification and characterization of a cytotoxin from *Enterobacter cloacae*. Can J Microbiol, v.43, p.729-733, 1997.
- BARNES, A.I.; PARAJE, M.G.; BATTÁN, P.C.; ALBESA, I. Molecular properties and metabolic effect on blood cells produced by a new toxin of *Enterobacter cloacae*. Cell Biol Toxicol, v.17, p.409-418, 2001.

---

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Referências Bibliográficas: NBR 6023. Rio de Janeiro: ABNT, agosto de 2000.

- BARRETT, T.J.; BLAKE, P.A. Epidemiological usefulness of changes in hemolytic activity of *Vibrio cholerae* biotype El Tor during the seventh pandemic. J Clin Microbiol, v.13, p.126-9. 1981.
- BHADKI S. *et al.* *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. Infect Immun, v.52, p.63-69. 1986.
- BHADKI, S.; TRANSOM-JENSEN, J. Damage to cell membranes by pore-forming bacterial cytolysins. Prog Allergy, v.40, p.1-43, 1988.
- BHUIYAN, S.H.; RAHMAN, H.; HAIDER, K. Study of hemagglutinating property of enteroinvasive *Escherichia coli* from various geographical locations. JPN J Med Sci Biol, v.48, p. 193-8, 1995.
- BILLINGTON, S.J.; JOST, B.H.; SONGER, J.G. Thiol-activated cytolysins: structure, function and role in pathogenesis. FEMS Microbiol Lett, v.182, p.197-205, 2000.
- BLANCO, J.; BLANCO, M. (Ed.) *Escherichia coli* enterotoxigênicos y verotoxigênicos de origen humano y bovino. In Patogêneses, epidemiología y diagnóstico microbiológico. Ed. Servicio de Publicaciones Diputación Provincial, Lugo, Espanha, 1993. p.117.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. Electrophoresis, v.8, p.93-99, 1987.
- BONE, R.C. Gram negative sepsis: a dilemma of modern medicine. Clin Microbiol Rev, v.6, p.57-68, 1993.
- BOEHM, D.F.; WELCH, R.; SNYDER, I. Calcium is required for the binding of *Escherichia coli* hemolysin to erythrocyte membranes. Infect Immun, v.58, p.1951-1958, 1990.
- BOOTH, M.C. *et al.* Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. Mol Microbiol, v.21, p.1175-1184, 1996.
- BORENFREUND, E.; PUERNER, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). J Tissue Cult Meth, v.9, p. 7-9, 1984.
- BRADFORD, M.M. A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, p. 248-254, 1976.
- BRAUN, V.; FOCARETA, T. Pore-forming bacterial protein hemolysins. Critical Rev Microbiol, v.18, p.115-58, 1991.
- BROW, J.E.; ROTHMAN, S.W.; DOCTOR, B.P. Inhibition of protein synthesis in intact HeLa cells by *Shigella dysenteriae* 1 toxin. Infect Immun, v.29, p. 98-107, 1980.
- BUCHARD, K.W. *et al.* *Enterobacter* bacteremia in surgical patients. Surgery, v.100, p.857-861, 1986.
- CALIL, R. *et al.* Recuention in colonization and nosocomial infection by multiresistant bacteria



- in a neonatal unit after institution of educational measures and restriction the use of cephalosporins. Am J Infect Control, v.29, p.133-138, 2001.
- CARBONELL, G.V.; VIDOTTO, M.C. Virulence factors in *Serratia marcescens*: cell bound hemolysin and aerobactin. Braz J Med Biol Res, v.25, p.1-8, 1992.
- CATANI, C.F. Purificação e caracterização de enterohemolisina produzida por *Escherichia coli* enteropatogênicas. Campinas, 1999. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- CHAKRABORTY, T. *et al.* Molecular analysis of bacterial cytolysins. Rev Infect Dis, v.9, p. S456-S466, 1987.
- CHART H. *et al.* Haemolysin production by strains of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Microbiology, v.144, p.103-107, 1998.
- CHOW, J.W.; YU, V.L.; SHLAES, D.M. Epidemiologic perspectives on *Enterobacter* for the infection control professional. Am J Infect Control, v.22, p.195-201, 1994.
- CLEMENTS, J.D.; FINKELSTEIN, R.A. Isolation and characterization of homogeneous heat-labile enterotoxin with high specific activity from *Escherichia coli* cultures. Infect Immun, v.24, p.760-769, 1979.
- DE, S.N. Enterotoxicity of bacteria-free culture filtrate of *Vibrio cholerae*. Nature (London), v.183, p.1533-1534, 1959.
- DEAN, A.G. *et al.* Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in the study of diarrhea in children in Honolulu. J Infect Dis, v.125, p.407-411, 1972.
- DELLA COLLETA, H.H.M. Purificação e caracterização do fator necrosante citotóxico do tipo 2 (CNF2) produzido por *Escherichia coli*. Campinas, 1997. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- DEWAR, C.L.; WOLOWYK, M.W.; HILL, J.R. A simple method for processing erythrocytes for scanning electron microscopy. Am J Clin Pathol, v.66, p.760-765, 1976.
- DING, H.; LÄMMLER, C. Purification and characterization of a hemolysin of *Actinomyces pyogenes*. J Vet Med, v.43, p.179-188, 1996.
- DREYFUS, L.A.; FRANTZ, J.C.; ROBERTSON, D.C. Chemical properties of heat-stable enterotoxins produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of different host origins. Infect Immun, v.42, p.539-548, 1983.
- DUBREUIL, J.D. *et al.* Production and purification of heat-stable enterotoxin b from a porcine *Escherichia coli* strain. Infect Immun, v.59, p.198-203, 1991.
- DUBREUIL, J.D. *Escherichia coli* STb toxin and prostaglandin production. Microbiology, v.145, p.1507-1508, 1999.

- ELLIOT, H.L. *et al.* Small bowel morphology in experimental canine cholera. Lab Invest, v.22, p.112-20, 1970.
- FALCÓN, R.M. Mecanismo molecular de patogenicidade da enterotoxina citotóxica de *Aeromonas hydrophila*. Campinas. Campinas, 2003. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- FALKNER, F.R. *Enterobacter* in hospital. J Hosp Infect, v.20, p.137-140, 1992.
- FINLAY, B.B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity. Microbiol Rev, v.53, p.210-230, 1989.
- FLYNN, D.M. *et al.* Patients' endogenous flora as the source of "nosocomial" *Enterobacter* in cardiac surgery. J Infect Dis, v.156, p.363-368, 1987.
- FUJII, Y. *et al.* Purification and characterization of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. J Bacteriol, v.173, p.5516-5522, 1991.
- GALLAGHER, P.G. *Enterobacter* bacteremia in pediatric patients. Rev Infect Dis, v.12, p.808-812, 1990.
- GARAIZAR, J.; KAUFMANN, M.E., PITT T.L. Comparison of ribotyping with conventional methods for the type identification of *Enterobacter cloacae*. J Clin Microbiol, v.29, p. 1303-1307, 1991.
- GONÇALVES, C.R. *et al.* Molecular epidemiology of a nosocomial outbreak due to *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter agglomerans* in Campinas, São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo, v.42, p.1-7, 2000.
- GORDON, V.M. *et al.* Adenylate cyclase toxins from *Bacillus anthracis* and *Bordetella pertussis*. Different processes for interaction with and entry into target cells. J Biol Chem, v.264, p.14792-14796, 1989.
- GRATTARD, F. *et al.* Arbitrarily primed PCR, ribotyping, and plasmid pattern analysis applied to investigation of a nosocomial outbreak due to *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol, v.32, p.596-602, 1994.
- GUARINO, A. *et al.* Characteristics and mechanism of action of a heat-stable enterotoxin produced by *Klebsiella pneumoniae* from infants with secretory diarrhea. Pediatr Res, v.25, p.514-518, 1989.
- HAERTL, R.; BANDLOW, G. Epidemiological fingerprinting of *Enterobacter cloacae* by small-fragment restriction endonuclease analysis and pulsed-field gel electrophoresis of genomic restriction fragments. J Clin Microbiol, v.31, p.128-133, 1993.
- HERDY, G.V.H. *et al.* Septicemia e gastroenterite em crianças internadas. Estudo clônico e anatomopatológico. J Pediatr (Rio J), v.59, p.268-274, 1985.

- HOLMES, R.K.; TWIDDY, E.M.; PICKETT, C.L. Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun, v.53, p.464-473, 1986.
- HONDA, T.; 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, v.26, p.1020-1027, 1979.
- HORMAECHE, E.; EDWARDS, P.R. A proposed genus *Enterobacter*. International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy, v.10, p.1-74, 1960.
- JARVIS, W.R.; MARTONE, W.J. Predominant pathogens in hospital infections. J Antimicrob Chemother, v.29, p.19-24, 1992.
- JARVIS, W.R. *et al.* Nosocomial infection surveillance. *In: CDC Surveillance Summaries*. Centers for Disease Control, Atlanta: Ga, 1984. vol. 33, p. 9SS-21SS.
- JOHNSON, M.P.; RAMPHAL, R.  $\beta$ -Lactam resistant *Enterobacter* bacteremia in febrile neutropenic patients receiving monotherapy. J Infect Dis, v.162, p.981-983, 1990.
- JOLIVET-GOUGEON, A. *et al.* Production of *Escherichia coli* group I-like heat labile enterotoxin by *Enterobacteriaceae* isolated from environmental water. Microbios, v.90, p.209-218, 1997.
- JÜRGENS, D.; ÖZEL, M.; TAKAISI-KIKUNI, N.B. Production and characterization of *Escherichia coli* enterohemolysin and its effects on the structure of erythrocyte membranes. Cell Biol Int, v.26, p.175-186, 2002.
- KARCH, H. *et al.* Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. Infect Immun, v.60, p.3464-3467, 1992.
- KARNAD, A.; ALVAREZ, S.; BERK, S.L. *Enterobacter pneumonia*. South Med J, v.80, p.601-604, 1987.
- KELLER, R. *et al.* Occurrence of virulence-associated properties in *Enterobacter cloacae*. Infect Immun, v.66, p.645-649, 1998.
- KITAJIMA, E.W.; DOLDER, M.A.H.; JOAZEIRO, P.P. Apostila de microscopia eletrônica de varredura. Campinas, 1999. Apostila (Laboratório de Microscopia Eletrônica), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- KLIPSTEIN, F.A.; ENGERT, R.F. Partial purification and properties of *Enterobacter cloacae* heat-stable enterotoxin. Infect Immun, v.13, p.1307-1314, 1976a.
- KLIPSTEIN, F.A.; ENGERT, R.F. Purification and properties of *Klebsiella pneumoniae* heat-stable enterotoxin. Infect Immun, v.13, p.373-381, 1976b.

- KUBOYAMA, R.H.; DE OLIVEIRA, H.B.; MORETTI-BRANCHINI, M.L. Molecular epidemiology of systemic infection caused by *Enterobacter cloacae* in a high-risk neonatal intensive care unit. Infect Control Hosp Epidemiol, v.24, p.490-494, 2003.
- LAVAL, F. *et al.* Accurate molecular mass determination of mycolic acids by maldi-tof mass spectrometry. Anal Chem, v.73, p.4537-4544, 2001.
- LEITCH, G.J.; IWERT, M.E.; BURROWS, W. Experimental cholera in the rabbit ligated ileal loop: toxin-induced water and iron movement. J Infect Dis, v.116, p.303-313, 1966.
- LIU, P.V. Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Dis, v.130, p. S94-S99, 1974.
- LJUNG, A.; WRETTLING, B.; MOLLKY, R. Separation and characterization of enterotoxin and two haemolysins from *Aeromonas hydrophila*. Acta Pathol Microbiol Scand, v.89, p.387-397, 1981.
- LOBO, A.L.; WELCH, R.A. Identification and assay of RTX family of cytolysins. Meth Enzymol, v.235, p.667-679, 1994.
- MACKMAN, N. *et al.* Secretion of haemolysin of *Escherichia coli*. Curr Top Microbiol Immunol, v. 125, p. 159-181, 1986.
- MACLEOD, D.L.; GYLES, C.L. Effects of culture conditions on yield of Shiga-like toxin from *Escherichia coli*. Can J Microbiol, v.35, p.623-629, 1989.
- MACLEOD, D.L.; GYLES, C.L. Purification and characterization of an *Escherichia coli* Shiga-like toxin II variant. Infect Immun, v.58, p.1232-1239, 1990.
- MAYHALL, C.G. *et al.* *Enterobacter cloacae* septicemia in a burn center: epidemiology and control of an outbreak. J Infect Dis, v.139, p.166-171, 1979.
- MELLO, M.L.; VIDAL, B. Práticas em biologia celular. Edgard Bluncher. Rio de Janeiro, 1980. p.71.
- MILLER, J.H. (Ed.) Experiments in molecular biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, NY, 1972.
- MITCHELL, I.D.; TAME, M.J.; KENWORTHY, R. Separation and purification of enterotoxins from a strain of *Escherichia coli* pathogenic for pigs. J Med Microbiol, v.7, p.439-450, 1974.
- MOON, H.W.; WHIPP, S.C.; BAETZ, A.L. Comparative effects of enterotoxins from *Escherichia coli* and *Vibrio cholera* on rabbit and swine small intestine. Lab Invest, v.25, p.133-140, 1971.
- NAMASU *et al.* Evidence for a novel non-fimbrial aggregative adhesive factor in clinical *Enterobacter cloacae*. Artigo submetido à publicação, 2004.

- NATIONAL SURVEY OF INFECTIONS IN HOSPITALS. The general distribution of infection. J Hosp Infect v.2, p.13-17, 1981.
- NORRIS, H.T.; MAJINO, G. On the role of the ileal epithelium in the pathogenesis of experimental cholera. Am J Path, v.53, p.263-279. 1968.
- OHISHI, I. Response of mouse intestinal loop to Botulinum C<sub>2</sub> toxin: enterotoxic activity induced by cooperation of nonlinked protein components. Infect Immun, v.40, p.691-695, 1983.
- OHISHI, I.; ODAGIRI, Y. Histopathological effect of Botulinum C<sub>2</sub> toxin on mouse intestines. Infect Immun, v.43, p.54-58, 1984.
- OKAMOTO, K.Y. *et al.* Identification and characterization of heat-stable enterotoxin II-producing *Escherichia coli* from patients with diarrhea. Microbiol Immunol, v.37, p.411-414, 1993.
- PANCETTI, A.R. Caracterização parcial da toxina citolateral distensora (CLDT) de *Escherichia coli*. Campinas. Dissertação de Mestrado - IB – UNICAMP, 1997.
- PANTON, A.W.; PANTON, J.C. *Enterobacter cloacae* producing a Shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with a case of hemolytic-uremic syndrome. J Clin Microbiol, v.34, p.463-465, 1996.
- PISANI, B. *et al.* Surto de bacteremia pelo *Enterobacter cloacae* relacionado à administração de nutrição parenteral (NP), ocorrido na região de Campinas, São Paulo. In: Congr Brasil Microbiol. Rio de Janeiro: RJ, 1997. p.81.
- POPOFF, M.R. Interactions between bacterial toxins and intestinal cells. Toxicon, v.36, p.665-685, 1998.
- POTOMSKI, J. *et al.* Purification of a cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas sobria* by use of monoclonal antibodies. J Med Microbiol, v.23, p.171-177, 1987.
- PRADA, J.; BEUTIN, L. Detection of *Escherichia coli*  $\alpha$ -haemolysin genes and their expression in a human faecal strain of *Enterobacter cloacae*. FEMS Microbiol Lett, v.79, p.111-114, 1991.
- QADRI, F.; HAQ, S.; CIZNÁR, I. Hemagglutinating properties of *Shigella dysenteriae* type 1 and other *Shigella* species. Infect Immun, v.57, p.2909-2911, 1989.
- RENNIE, R.P.; ARBUTHNOTT, J.P. Partial characterization of *Escherichia coli* haemolysin. J Med Microbiol, v.7, p.179-188, 1974.
- REPORT OF THE AVMA, PANEL OF EUTHANASIA. Javma, v.218, p.669-696, 2001.
- ROWE, G.E.; WELCH, R.A. Assays of hemolytic toxins. Meth Enzymol, v.235, p.657-667, 1994.

- RIBEIRO, A.M.; MOREIRA, J.L.B. Epidemiologia e etiologia da sepse na infância. J Pediatr (Rio J), v.75, p.39-44, 1999.
- RUDNICK, J.R. *et al.* Gram-negative bacteremia in open-heart-surgery patients traced to probable tap-water contamination of pressure-monitoring equipment. Infect Control Hosp Epidemiol, v.17, p. 281-285, 1996.
- SANDERS JR, W.E.; SANDERS, C.C. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. Clin Microbiol Rev v.10, p.220-241, 1997.
- SCHÄGGER, H.; JAGOW, G. Tricine sodium dodecil sulfate polyacrylamide gel eletrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Bioch, v.166, p.368-379,1987.
- SEARS, C.L.; KAPER, J.B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. Microbiol Rev, v.60, p.167-215, 1996.
- SHIELDS, S.J.; OYEYEMI, O. Mass Spectrometry and non-covalent protein ligand complexes: confirmation of binding sites and changes in tertiary structure. J Am Soc Mass Spectrom, v.14, p.460-470, 2003.
- SCHMIDT, H. *et al.* Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. Infect Immun, v.61, p.534-543. 1993.
- SIMI, S. *et al.* A low molecular weight enterotoxic hemolysin from clinical *Enterobacter cloacae*. Can J Microbiol, v.49, p.479-482, 2003.
- SMITH, H.W. The haemolysins of *Escherichia coli*. J Path Bacteriol, v.85, p.197-211, 1963.
- SOUZA, W. *et al.* Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas. Sociedade Brasileira de Microscopia. Rio de Janeiro, p.1-179, 1998.
- SWANK, R.T.; MUNKRES, K.D. Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. Anal Biochem, v.39, p.462-477, 1971.
- TAKEDA T. Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. Meth Enzymol, v.165, p. 189-193, 1988.
- TAKEDA, Y. *et al.* Purification and characterization of heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun, v.23, p.978-985, 1979.
- TAYLOR, N.S.; THORNE, G.M.; BARTLETT, J.G. Comparison of two toxins produced by *Clostridium difficile*. Infect Immun, v.34, p.1036-1043, 1981.
- THOMPSON, M.R.; GIANNELLA, R.A. Revised amino acid sequence for a heat-stable enterotoxin produced by an *Escherichia coli* strain (18D) that is pathogenic for humans. Infect Immun, v.47, p.834-836, 1985.

- TRESOLDI, A.T. *et al.* Risk factors associated with the acquisition of multiresistant bacteria in a pediatric nursery. J Pediatr, v.76, p.275-280, 2000.
- VAN NIEROP, W.H. *et al.* Molecular epidemiology of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in the neonatal intensive care unit of a provincial hospital in Gauteng, South Africa. J Clin Microbiol, v.36, p.3085-3087, 1998.
- WELCH, R.A. Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. Mol Microbiol, v.5, p.521-529. 1991.
- WHIPP, S.C. Assay of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin b in rats and mice. Infect Immun, v.58, p.930-934, 1990.
- 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, v.26, p.925-932, 1979.
- WISEMAN, G.M. (Ed.) Microbial toxins. ed. Academic Press, New York and London: Montie, T.; Kadis, S.; Ajl, S.J., 1970, p.237.
- YAMAMOTO, K. *et al.* Non-01 *Vibrio cholerae* hemolysin: purification, partial characterization, and immunological relatedness to El Tor hemolysin. Infect Immun, v.45, p.192-196, 1984.
- YANO *et al.* Determination of the efficiency of K99-F41 fimbrial antigen vaccine in newborn calves. Braz J Med Biol Res, v.28, p.651-654, 1995.
- ZUÑIGA, J. *et al.* (Ed.) Ciencia y tecnología em protección y experimentación. Ed. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España, 2001. p.385-419.