

BC/28354

IB/80628



UNICAMP

**ESTUDO DA PATOGENICIDADE EM
UMA AMOSTRA DE *Escherichia coli*
SEPTICEMICA PARA AVES**

EDMYR ROSA DOS REIS

T/UNICAMP

R277_e

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

80322

**ESTUDO DA PATOGENICIDADE EM UMA AMOSTRA DE
Escherichia coli SEPTICEMICA PARA AVES.**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese de Mestrado em Genética do candidato a)
Edmyr Rosa dos Reis
e aprovada pela Comissão Julgadora.
30/7/96 *[Assinatura]*

EDMYR ROSA DOS REIS

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências, na
área de Genética

[Faint stamp]

UNIDADE	IB
N.º CHEQUE:	T/UNICAMP
V.	R 277e
TÍTULO	28354
PROG.	667/96
C	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	29/08/96
N.º CPD	

CM-00091577-5

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

R277e Reis, Edmyr Rosa
Estudo da patogenicidade em uma amostra de
Escherichia coli septicêmica para aves. / Edmyr Rosa
dos Reis. -- Campinas, SP : [s.n], 1996.

Orientador: Wanderley Dias da Silveira.
Tese (mestrado) - Univerdidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia.

1. *Escherichia coli*. 2. Patogenicidade. 3. Septicemia.
4. Ave doméstica. I. Silveira, Wanderley Dias da.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Campinas, 30 de julho de 1996.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira (Orientador)



Handwritten signature of Wanderley Dias da Silveira in cursive script, written over a horizontal line.

Assinatura

Prof. Dr. Benedito de Oliveira Filho



Handwritten signature of Benedito de Oliveira Filho in cursive script, written over a horizontal line.

Assinatura

Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo



Handwritten signature of Carmen Silvia Bertuzzo in cursive script, written over a horizontal line.

Assinatura

SUPLENTE:

Prof. Dr. Tomomasa Yano



A horizontal line intended for the signature of Prof. Dr. Tomomasa Yano.

Assinatura

*Ao Gabriel e Nathália por simplesmente serem
tudo em todos os momentos.*

*À Soely, sempre presente nos bons e maus momentos,
pelo carinho, incentivo para que nossa caminhada
até aqui se tomasse realidade.*

*Aos meus pais, por acreditarem em mim
e pelo apoio fundamental
na minha vida .*

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira, por sua orientação dedicada e precisa, e ainda pela grande amizade.

Aos Profs. Dr. Benedito de Oliveira Filho, Dr. Tomomasa Yano e Dra. Carmem Silvia Bertuzzo pela contribuição como membros da pré-banca examinadora, pelas sugestões e pela amizade.

A Profa. Dra. Clarice Arns, pela valiosa colaboração técnica na retirada das tráqueias das aves.

A Profa. Dra. Shirley Maria Recco Pimentel por permitir a utilização de seu laboratório e a técnica Klélia do Depto de Biologia Celular na confecção dos cortes histológicos.

A Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder pela contribuição valiosa na tradução do texto.

Às bibliotecarias Norma e Zilda, pela eficiência, disposição e simpatia.

A Fabiana Fantinatti pela amizade, colaboração e assistência na execução em diversas técnicas realizadas no trabalho.

Ao Sérgio de Mendonça pela amizade, atenção e pacientes explicações de informática.

Ao Marcelo Broochi, pelo apoio e valiosas sugestões ao trabalho.

Aos amigos do Nucleo de Medicina e Cirurgia Experimental Profa. Dra. Ester Nicola e o secretário Erasmo Carrasco que muito me incentivaram para o término deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

Lista de quadros	i
Lista de tabelas	ii
Lista de figuras	iii
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 MATERIAIS	34
4.1.1 Meios de Cultura	34
4.1.2 Soluções e Reagentes de uso geral	39
4.2 MÉTODOS	50
4.2.1 Amostras e plasmídios	50
4.2.2 Determinação do padrão de hemaglutinação	52
4.2.3 Avaliação de resistência a drogas anti-microbianas	54
4.2.4 Teste de produção de colicina	54
4.2.5 Transfêrencia de DNA plasmidial por conjugação	55
4.2.6 Extração de DNA plasmidial	58
4.2.7 Eletroforese de DNA plasmidial em gel de agarose	59
4.2.8 Extração de proteína de membrana	60
4.2.9 Adesão bacteriana no epitélio da traqueia de aves	64
4.2.10 Avaliação da patogenicidade	66
4.2.11 Avaliação da resistencia sérica	67

4.2.12 Determinação da DL ₅₀	68
4.2.13 Determinação da curva de crescimento	68
4.2.14 Método para lisar células bacterianas para extração de LPS	69
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÕES	97
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

LISTA DE QUADROS

Quadro I	9
Tipos de infecções causadas por <i>E. coli</i> de origem aviária.	
Quadro II	25
Características de fímbrias de <i>E. coli</i> enterotoxigênicas isoladas de animais, quanto ao sorogrupo, toxinas relacionadas e hemaglutinação.	
Quadro III	26
Características de fímbrias de <i>E. coli</i> enterotoxigênicas isoladas de animais, quanto a morfologia, peso molecular, localização genética e hospedeiro.	
Quadro IV	51
Linhagem bacteriana selvagem <i>E. coli</i> F3 com seus transconjugantes e padrões de plasmídios.	
Quadro V	52
Padrões utilizados no teste de hemaglutinação.	
Quadro VI	63
Passos da coloração de prata em gel SDS-PAGE.	
Quadro VII	70
Passos da coloração de prata em gel SDS-PAGE para proteínas lipopolissacarídes.	

LISTA DE TABELAS

Tabela I	80
Resistência a anti-microbianos das amostras F3, MS101 e seus respectivos transconjugantes.	
Tabela II	81
Teste de hemaglutinação das amostras F3 e MS101 frente a diferentes eritrócitos.	
Tabela III	82
Teste de produção de bacteriocina nos transconjugantes provenientes de F3 x MS101 e pRT773 x F3.	
Tabela IV	83
Teste de hemaglutinação dos transconjugantes.	
Tabela V	84
Determinação da DL_{50} das amostras de <i>E. coli</i> .	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	85
Perfil plasmídial em gel de agarose 0,7% da amostra F3 e amostras controles.	
Figura 2	86
Perfil plasmídial em gel de agarose 0,7% da linhagem F3, MS101 e seus transconjugantes.	
Figura 3	87
Aderência de <i>E. coli</i> F3, MS101 e os transconjugantes Col2, Col8, Col14, XP2 e XP4.	
Figura 4	89
Aderência de <i>E. coli</i> F3, Ms101 e os transconjugantes Col2, Col8, Col14, XP2 e XP4 em meio de cultura Eagle suplementado com D-manose.	
Figura 5	91
Curva de resistência sérica das linhagens F3, XP2 e XP4.	
Figura 6	92
Curva de resistência sérica das linhagens bacterianas MS101, Col2, Col6 e Col14.	
Figura 7	93
Perfil eletroforetico de proteínas de membrana em gel SDS-PAGE 12,5% das linhagens F3, XP2 e XP4.	
Figura 8	94
Curva de crescimento das linhagens F3, XP2 e XP4.	
Figura 9	95
Perfil eletroforetico de plasmídios em gel de agarose 0,7% das amostras F3, XP2, XP3 e XP4.	
Figura 10	96
Perfil eletroforetico de proteínas lipopolissacarides em gel SDS-PAGE 12,5% das amostras F3, XP2 e XP4.	

RESUMO

A linhagem F3 de *Escherichia coli*, causadora de septicemia em aves, foi estudada com relação à presença de diferentes fatores de patogenicidade. Esta linhagem demonstrou a presença de plasmídios com 95, 69, 62, 52, 42, 6 e 5MD, produz fímbrias do tipo-1 e colicinas E1 e E3. A conjugação da linhagem F3 com uma linhagem receptora (MS101) originou transconjugantes que não tiveram sua patogenicidade aumentada quando comparadas com a linhagem parental apesar de ter ocorrido transferência de plasmídios com alto e baixo pesos moleculares. A mutagênese da linhagem F3, com transposon TnphoA, permitiu o isolamento de 7 colônias mutantes, das quais três (XP2, XP3 e XP4) apresentaram patogenicidade diminuída. Esses mutantes continuaram expressando fímbrias do tipo-1, colicinas e não tiveram nenhuma alteração no seu perfil plasmidial. Eletroforese de proteínas de membrana em SDS-PAGE mostrou que os mutantes XP2 e XP3 eram idênticos, e diferentes do XP4. Os mutantes XP2 e XP4 crescidos em presença de ferro não apresentaram subunidades protéicas de: 127,72; 76; 59; 41, 38,52; 35,72; 35,2; 27,27 e 14,69kDa. O mutante XP4, por sua vez, nas mesmas condições não apresentou uma banda protéica de 47,82kDa. O crescimento destas amostras em ausência de ferro demonstrou que as mesmas estavam expressando as subunidades protéicas relacionadas ao sistema de captação deste íon. Acreditamos que as linhagens XP2 e XP3 sofreram uma mutação no gene (es) responsável (eis) pela expressão de uma proteína reguladora não associada à patogenicidade porém importante para a síntese de várias proteínas essenciais ao seu crescimento rápido. O mutante XP4 sofreu mutação em uma proteína, provavelmente, associada à patogenicidade.

Abstract

A septicaemic avian *Escherichia coli* strain was studied in regard to the different pathogenicity traits. This strain harbours at least seven plasmidial ADN bands of 95, 69, 62, 52, 42, 6 and 5MD, also produces type-1 (F1) fimbriae and colicin E1 and E3. The conjugation of strains F3 with receiver MS101 strains produced transconjugant strains which did not increase pathogenicity when compared with the parental strains although plasmids of high and lower molecular weight were transferred. The mutagenesis with transposon TnphoA with F3 strains, allowed the isolation of seven resistant colonies and verification that three of them XP2, XP3 and XP4 were less pathogenic. These mutants continued to express type-1 fimbriae, colicin and did not modify their plasmidial profile. The SDS-PAGE membrane protein electrophoresis showed that XP2 and XP3 mutants had an identical profile while XP4 strains were different. The XP2 and XP4 mutants grown in a medium with iron, did not present protein subunits of 127,72; 76; 59; 41; 38,52; 35,72; 35,2; 27,27 and 14,69kDa. In the XP4 mutant only one band 47,82kDa protein subunit is absent. The membrane proteins of these strains grown in the absence of iron when compared with the same strains demonstrate that all expressed protein subunits relate with the iron system. We believe that XP2 and XP3 strains had a one mutation in the gene responsible for the expression of a regulating protein that is not associated with pathogenicity but is important for the synthesis of proteins essential for their growth. The mutation of the XP4 mutant probably occurred in a protein associated with pathogenicity.

1 - INTRODUÇÃO

Segundo Drasar e Hill (1974), *Escherichia coli* é o mais comum microorganismo anaeróbio facultativo que habita o intestino dos mamíferos e aves desempenhando importante papel na manutenção das funções fisiológicas normais de seus hospedeiros, como também é o patógeno Gram-negativo mais comum (Levine, 1985), pois desenvolvem características patogênicas para o hospedeiro, devido à capacidade de colonizar, invadir e ou destruir tecidos, produzir toxinas ou ser capaz de aproveitar certos produtos essenciais do hospedeiro para a sua sobrevivência (Curtiss et al., 1988).

A diversidade de doenças infecciosas descritas na literatura médica e veterinária, relacionando *Escherichia coli* como o agente causal, vem sofrendo atualizações cada vês mais frequentes com a descoberta de novos mecanismos de patogenicidade e também com a elucidação de processos infeccioso de doenças que já foram descritas (Levine, 1987). Estas doenças compreendem diarréia aquosa e desinteria em néonatos e adultos como também infecções urinárias, meningites e septicemias (Hinson & Willians, 1989; Levine, 1987).

Na avicultura, as infecções causadas por *Escherichia coli*, acarretam grandes prejuízos econômicos para os produtores em todo o mundo (Gross, 1972). Tais infecções, geralmente estão associadas com onfalite que ocorre em pintos de um dia de idade, colicepticemia, peritonite em aves jovens; aérosaculite e salpingites em aves adultas (Srinivasan et al., 1979). O principal caminho de entrada para tais infecções é o trato respiratório das aves que também são consideradas

secundárias, isto é. ocorrem principalmente após infecções virais ou por micoplasmas, que danificam o tecido traqueal (Harry & Henley, 1965).

Estudos epidemiológicos de *Escherichia coli* aviária indicam que 60% das amostras analisadas pertencem aos sorotipos 01, 02 e 078 (Sojka & Carnaghan, 1961; Glantz et al., 1962). Esses sorotipos possuem fímbrias que possibilitam a adesão e colonização das bactérias nos cílios da traquéia, constituindo assim, importantes fatores de patogenicidade (Naveh et al., 1984; Dho & Lafont, 1984).

Suwanichkul & Panigraph (1986), demonstraram que havia diferenças entre os tipos de fímbrias produzidas pelos sorotipos 01, 02, 078 de *Escherichia coli* aviária, através da análise do perfil eletroforetico, desses sorotipos, observaram que o sorotipo 078 apresenta fímbrias do tipo-1, enquanto que os sorotipos 01 e 02, apresentam fímbrias com pesos moleculares diferentes desta.

Outro mecanismo usado como fator de patogenicidade pelas bactérias é a síntese de toxinas, que vem sendo exaustivamente estudada em suínos, bovinos e humanos. Segundo Truscott (1973) a presença de toxinas de amostras colhidas de aves, parece não estar relacionadas às mortes por infecções sistêmicas de *Escherichia coli*. Entretanto, amostras bacterianas isoladas de galinhas com diarreias mostraram a presença de uma enterotoxina termo-lábil (LT), apresentando um alto grau de homologia com a toxina Lt_n, produzidas por amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC) de origem humana.

Smith (1974), estudando fatores de virulência associados a DNA plasmidial em uma amostra isolada de frangos, observou que quando este era transferido por conjugação, tornava a amostra receptora não patogênica em patogênica, quando testada em frangos e camundongos. Essa característica foi associada à grande habilidade da amostra

receptora em sobreviver no sangue do hospedeiro, podendo assim estar associada a presença desse plasmídio.

A capacidade de multiplicação das bactérias nos fluidos orgânicos está relacionada com a captação do ion ferro (Bullen et al., 1978; Bullen, 1981). Dentre as defesas do organismo a essas infecções, está a baixa quantidade de ion ferro disponível no plasma sanguíneo, que não pode ser utilizada nos processos metabólicos bacterianos. Desta maneira, o ferro está fortemente associado com proteínas transportadoras de ion ferro; as transferrinas no soro e as lactoferrinas nas secreções corpóreas, e, para utilizar esse ion, as bactérias desenvolveram um sistema para sequestrá-lo do hospedeiro a partir dessa proteínas (Bullen et al., 1978; Weinberg, 1984). O mecanismo utilizado pela bactéria para capturar o ferro dos organismos deficientes deste íon, é a produção de hemolisina e siderófaros (Willians & Roberts, 1989). Estas proteínas solubilizam o ferro livre ou captam de complexos transferrinas ou lactoferrinas, promovendo a internalização do ion através da interação com receptores específicos do complexo sideróforo ferro na superfície da célula bacteriana (Willians & Roberts, 1989).

A capacidade de sintetizar hemolisina é observada em *Escherichia coli* de várias origens como infecções urinárias em humanos e animais (Gyles, 1986; Hughes et al., 1983).

Os siderófaros são classificados quimicamente em duas classes: os fenolatos (enteroquelina ou enterobactina), que estão presentes em quase todas as entorobactérias sendo um sistema comum de captação do ferro; a outra classe de sideróforo é o hidroxamato conhecido como aerobactina, encontrado em bactérias com capacidade invasora e causadora de diversas infecções sistêmicas como meningites, infecções renais e septicemias (Neilands, 1981).

Willians (1979), descreveu a produção de um sistema biológico de captação de ferro por *Escherichia coli* invasora, que era dependente da presença do plasmídio Col-V. Este sistema foi encontrado por Stuart et al (1980), em *Escherichia coli* de origem aviária. Mais tarde Willians & Warnes (1980), descreveram que este sistema poderia funcionar independentemente da expressão do plasmídio Col-V, podendo ser codificado pelo cromossomo bacteriano (Fantinatti et al., 1994).

2 - OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é estudar os fatores de patogenicidade de *Escherichia coli* de origem aviária, realizando um estudo comparativo entre amostras patogênicas e não patogênicas, correlacionando a capacidade de aderência em traquéias “in vitro”, com o alto grau de patogenicidade.

Mutação da amostra selvagem com uma receptora não patogênica MS101 e mutagenise com transposon Tnpho-A, usando plasmídeo pRT733 com a amostra selvagem, para o estudo comparativo do crescimento das amostras mutagênicas em meio de cultura com soro de galinha.

Análise comparativa da curva de crescimento dos tipos parentais e os transconjugantes crescidos em meio de cultura completo e em meio de cultura limitado de ferro, e, estudo do perfil eletroforetico das proteínas de membrana dessas amostras bacterianas.

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Escherichia coli são bacilos Gram-negativos (Escherich, T.,1985), pertencentes à família ***Enterobacteriaceae*** (Edwards & Ewing,1972), sendo o anaeróbio facultativo predominante na flora bacteriana normal de mamíferos e aves, desempenhando importante papel na manutenção da fisiologia intestinal (Drasar & Hill, 1974 ; Levine, 1985).

A diversidade de doenças infecciosas descritas na literatura médica e veterinária envolvendo a espécie *Escherichia coli*, como agente causal destas doenças, vem sofrendo constantes atualizações com a descoberta de novos mecanismos de patogenicidade, e também devido à elucidação de processos infecciosos de doenças já descritas (Levine,1987). As doenças causadas por *Escherichia coli* podem ser infecções intestinais, causando doenças entéricas agudas em animais; infecções extraintestinais, como meningites, cistites e piélonefrites no homem, septicemia e aerosaculites onfalite, doença respiratória crônica, síndrome de cabeça inchada em aves (Levine, 1984).

***Escherichia coli* patogênicas em aves**

Infecções causadas por *Escherichia coli*, em aves, constituem um sério problema, pois causam a rejeição das carcaças nos abatedouros. As aves infectadas, apresentam menor desenvolvimento, menor ganho de peso, menor conversão

alimentar, aumento de mortalidade e aumento no uso de remédios (Gross, 1984). As infecções de maior incidência são: colibacilose causada por amostras enteropatogênicas, doença respiratória crônica (DCR) ou doença do saco aéreo (Calnek et al., 1991), e, a onfalite que ocorre em pintos de um dia de idade.

A onfalite é uma doença que se caracteriza pela necrose do tecido do cordão umbilical das aves, os tecidos tornam-se descoloridos e edematosos. O abdômem fica tumefeito e à leve pressão, pode estourar. Nos tecidos a infecção pode estender-se ao saco da gema tornando-a distendida e hemorrágica, apesar do seu material interno apresentar-se aquoso, semi-sólido e granular (fibrina). A infecção pode estender-se à cavidade abdominal, acarretando em grave peritonite e pericardite. A onfalite pode ocorrer também no embrião, ainda dentro do ovo, mais precisamente no ônfalo; região localizada no saco vitelínico, na região abdominal dos pintinhos embrionários. Pode causar um grande número de perdas, pois essa região está diretamente relacionada ao desenvolvimento das aves (Burke, 1988; Hoffman-Volker, 1968; Metacalf et al., 1986).

Nos embriões o saco da gema é absorvido dentro de 5 a 6 dias de incubação, porém, em algumas condições patológicas como a onfalite e a septicemia, podem interferir nesta absorção, levando à infecção generalizada e a alta mortalidade embrionária (Patten, 1957; Pathak et al., 1960).

A contaminação por *Escherichia coli* no ovo, ocorre pela presença de fezes contaminadas nos ninhos. A penetração dos microorganismos ocorre através dos poros da casca do ovo,

com posterior contaminação do albúmem e infecção do embrião através do saco da gema (Board, 1985).

As infecções causada por *Escherichia coli* nas aves jovens doença, a colibacilose é muito comum, causada pelo tipo bacteriano enteropatogênico e a doença respiratória crônica (DCR) ou doença do saco aéreo, apresenta como agente primário da infecção mycoplasmas e vírus (Calnek et al., 1991).

Em frangos de corte observa-se uma dermatite cutânea localizada na região da cloaca, causando assim uma rejeição muito grande de carcaças (Glunder, 1990)

Nas aves adultas as infecções causadas por *Escherichia coli* podem determinar uma forma granulomatosa no fígado, ceco, duodeno e mesentério denominado doença de Hjarre's determinando grandes prejuízos na indústria avícola, (Hofstad et al., 1978; Savov, 1963).

Testes serológicos, em amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves infectadas, permitiram a identificação de alguns serogrupos, sendo que os predominantes estão relacionados com o local da infecção, o estágio de desenvolvimento das aves e quem os estudou, estão relacionados no Quadro I.

Quadro I Tipos de infecções causadas por *Escherichia coli* de origem aviária com seus respectivos serogrupos encontrados com maior frequência e quem os estudou.

Doença	Serogrupo	Autores
Onfalite	078:k80	Zahadeh (1987)
Saco da Gema	01, 02, 017, 025 e 029	Gupta & Singy (1969)
Colisepticemia e Coligranulomatose	01, 02, 011, 073 e 078	Harry & Chubb (1964)
Embriões mortos na casca do ovo	01, 02, 08, 055, 086, 0111, 0139 e 0141	Orajara & Mohan (1986) Falade (1977)
Colibacilose	02, 033 e 078	Rosemberg et al.,(1985)
Colisepticemia	01, 02 e 078	Watanabe et al.,(1983)
Pericardite e Aerosaculite	02, 08, 071, 073, 078 e 088	Orskov & Orskov(1977)
Pintos proveniente de aves com colicepticemia	061, 091, 0119, 0143 e 0147	Ghosh (1987)
Granulomatose	08, 09 e 016	Orskov & Orskov(1977)
Septicemia	08, 09, 011, 018, 022, 025 e 075	Orskov & Orskov(1977)
Salpingites	01, 02, 05, 045, 053 e 078	Glantz et al., (1962)
Embriões do saco da gema com onfalite	01, 02, 04, 013, 017, 022, 025, 029 e 060	Verma (1983)

A atividade bactericida do soro de humanos, e de animais de sangue quente, (resistência sérica) contra bactérias vem sendo estudada a mais de 100 anos (Moll et al., 1979). Contudo, os mecanismos da atividade do soro contra esses tipos bacterianos ainda não foram totalmente esclarecidos (Taylor & Kroll, 1985). Sabe-se que o hospedeiro apresenta defesa contra o ataque desses microorganismos, como: ativação do complemento por via clássica ou alternativa, esta última devido a presença de compostos lipoprotéicos localizados na membrana da bactéria (LPS) (Rice & Kasper, 1977; Taylor, 1983; Joyner, 1984).

Estudos realizados com modelos animais, revelaram que a resistência sérica das bactérias é fundamental para que ela seja patogênica. O melhor método para se determinar os níveis de resistência sérica é colocando o cultivo bacteriano em contato com o soro do animal (Inoue et al., 1986; Frank et al., 1983; Olling, 1977).

Estudos realizados em perús infectados com *Escherichia coli* virulentas mostraram que algumas cepas que atingiram a corrente sanguínea podem causar pequenas lesões nos diferentes órgãos. Estas amostras apresentam um mecanismo próprio de resistência à ação bactericida do soro sendo a adesão das mesmas no trato respiratório das aves um fator muito importante para a sua patogenicidade (Arp & Jansen, 1980; Naveh et al., 1984; Ellis et al., 1988).

Em algumas espécies de aves domésticas a colibacilose bem como a doença crônica respiratória, inicia-se pela adesão à mucosa da traquéia, e invasão desta. Uma vez na corrente sanguínea, estas bactérias podem atingir diferentes órgãos

internos, causando diferentes lesões tais como: pericardite, perihepatite (Gross et al., 1978).

Como mencionado anteriormente, a capacidade de aderir e colonizar a mucosa traqueal é um importante fator de virulência de *Escherichia coli* patogênicas para aves. Esta capacidade é mediada por estruturas fibrilares (chamadas fímbrias) presentes na superfície bacteriana (Dho & Lafont, 1982).

A capacidade de crescimento e multiplicação das *Escherichia coli* nos tecidos do hospedeiro está diretamente relacionado à síntese de hemolisinas e sideróforo (Cavalieri et al., 1984; Rogers, 1983).

Os mecanismos pelo qual os microorganismos obtêm o ferro do hospedeiro ocorre devido a síntese de sideróforos, os quais são compostos de baixo peso molecular secretadas pelas bactérias em resposta à baixa concentração deste íon no hospedeiro (Williams & Roberts, 1989). Estas proteínas solubilizam o ferro livre ou captam-no dos componentes transferrinas e lactoferrinas do hospedeiro, promovendo a internalização deste íon através da interação com os receptores específicos do complexo sideróforo-ferro na superfície da célula bacteriana (Crosa, 1984; Brown, 1985; Neilands, 1981).

Existem dois tipos de sideróforos, caracterizados pela sua composição química: ácido hidroxâmico que também é denominado de aerobactina, comuns em fungos e em algumas linhagens de *Escherichia coli* enteroinvasivas; e o fenolato ou catecol, também chamado chamado enterobactina ou enteroquelina, que é um quelante do ferro que após ser secretado sequestra o ferro do meio e o transporta através de seus componentes

específicos para os receptores da membrana externa da bactéria. A seguir, este é transportado para o interior da bactéria, sofrendo uma degradação através de enzimas específicas (Linggod et al., 1987; Griffiths et al., 1985; Langman et al., 1972; Rosenberg et al., 1985; Young et al., 1986). Sob a condição de falta do ferro as amostras de *Escherichia coli*, patogênicas ou não, secretam o sideróforo enteroquelina e sintetizam uma proteína de membrana receptora para enteroquelina-ferro resultante da expressão do gene *fepA* (Williams & Roberts, 1989).

Mutantes deficientes na síntese de enteroquelina e que carregam o plasmídeo *Col-V* suprimem o mecanismo de captação do ferro com o sideróforo aerobactina (Frost & Rosemberg, 1973). Este sideróforo hidroxamato foi descrito pela primeira vez em *Aerobacter aerógenes* (Gibson & Magrath 1969) e posteriormente foi encontrado em *Shigella spp* (Payne, 1980) e *Salmonella spp* (Bindereif et al., 1981). Este sideróforo é codificado pelo plasmídeo *Col-V* e está relacionado à patogenicidade nas infecções por *Escherichia coli* em humanos e animais (Williams, 1979; Braun, 1981; Stuart et al., 1980).

Milch et al, (1984), verificaram que a produção de colicina não é essencial para o aumento da virulência, no entanto, demonstraram que a perda do plasmídeo *Col-V* resulta na diminuição da mesma.

Williams & Warner (1980) confirmaram o fato de que a captação de ferro mediada pelo sideróforo aerobactina é independente da síntese e atividade da colicina-V e permaneceram com o sistema de captação do ferro é mediado pelo plasmídeo *Col-V*. Isto foi verificado através de mutantes que não perderam a

patogenicidade em infecções experimentais em camundongos. Por outro lado, mutantes defectivos no sequestro de ferro, devido a mutações ocorridas no plasmídeo *Col-V* não deixaram de produzir a colicina e tornaram-se menos virulentos do que a amostra parental. Destes mutantes, foram identificados dois componentes mediados por plasmídios: o sideróforo aerobactina, pelo gene *iuc*, é um composto difusível transportado através da membrana nas amostras portadoras do plasmídeo *Col-V* (Stuart et al, 1980); o outro componente não difusível, é um receptor de membrana para o complexo aerobactina-ferro e para a bacteriocina identificada como cloacina DF13 sintetizada pelas amostras *Enterobacter cloacae* (Grewal et al 1982). Este receptor é uma proteína de membrana externa cujo peso molecular é de 74 KDa, codificada pelo gen *iut* no plasmídeo *Col-V* sendo sua síntese regulada pela disponibilidade de ferro (Bindereif et al., 1982; Grewal et al., 1982).

Associada à capacidade do hospedeiro em limitar a quantidade de ferro disponível no plasma sanguíneo, está a atividade bactericida do soro, que contém agentes inespecíficos, tais como, complemento e fagócitos; e agentes específicos, como anticorpos, que sózinhos ou em conjunto, lisam ou impêdem o crescimento da maioria das bactérias que chegam à circulação sanguínea (Bitter- Suerman et al., 1984). Linhagens de *Escherichia. coli* invasivas são altamente resistentes à atividade bactericida do soro devido à presença de componentes em sua superfície tais como: proteínas de membrana externa e antígeno capsular, que parecem inibir a ativação ou a função do complemento (Taylor, 1976). Alterações que ocorrem na superfície bacteriana pode resultar na síntese de novos componentes

estruturais da membrana celular e que podem proteger antígenos de superfície e previnem a sua interação com anticorpos específicos impedindo a ativação do complemento via clássica; protegem os lipopolissacarídeos e os previnem da ativação direta do complemento via alternativa ou interfere com um ou mais passos da ação do complemento na superfície da bactéria. A resistência sérica pode resultar também na síntese de produtos que diretamente inativam os componentes do complemento (Moll et al., 1980).

Pela técnica de clonagem molecular em *Escherichia coli* obtiveram-se fragmentos que codificam a resistência sérica e a utilização do transposon Tn3, permitiu a obtenção de plasmídios derivativos sensíveis ao soro. Análise realizada das proteínas de membrana destes mutantes, mostrou que o produto do gene *Tra-T* é o responsável pela resistência sérica. A proteína TraT codificada pelo gene *Tra-T* do plasmídio R6-5 apresenta um peso molecular próximo a 25Kda e localiza-se na superfície da membrana externa, de maneira semelhante às proteínas de membranas dos plasmídios *FeR100* (Manning et al., 1980; Ferraza & Levy, 1980).

Bins et al., (1982), verificaram que a resistência sérica em *Escherichia coli* conferida pelos genes *Tra-T* do plasmídio *R100* e *iss* do plasmídio *Col-V, I-K94*; são semelhantes e bloqueiam a ação do complexo terminal do complemento e não a formação deste. Por outro lado, estes genes são distintos uma vez que a sonda molecular do gene de resistência sérica do plasmídio *R100* não hibridiza com o gene *iss* dos plasmídios *Col-V, I-K94* (Ogata et al., 1982).

Escherichia coli pode produzir diferentes tipos de colicina. As amostras que produzem um determinado tipo de colicina apresentam resistência específica a esta mas podem ser sensíveis a outros tipos de colicina (Jakes et al., 1974; Schlter & Nomura, 1976)..

Escherichia coli uropatogênica (UPEC).

Escherichia coli uropatogênica é a responsável pela ocorrência de infecções urinárias como cistites ou pielonefrites (Levine, 1984). Um importante fator de virulência é a capacidade de adesão de *Escherichia coli* às células uroepiteliais, adesão esta que é mediada por fímbrias (Svanborg - Eden et al., 1983; Van den Bosch et al., 1993).

Este grupo de *Escherichia coli* apresenta, normalmente, fímbrias do tipo-1 como também podem apresentar fímbrias do tipo-P (Aronson et al., 1979, Christensen et al, 1985; Van Die et al, 1985) e fímbrias do tipo-X (Parkkiten et al., 1983)..

As fímbrias do tipo-1, reconhecem resíduos de D-manose, na superfície celular do hospedeiro como receptores específicos e podem aderir em todos os tecidos humanos, como também em células sanguíneas (eritrócitos), células do epitélio bucal, enterócitos, células uroepiteliais e uromucóides, (Davis et al., 1981; Duguid & Old, 1980; Firon et al., 1982). As fímbrias do tipo-P apresentam capacidade de adesão em células uroepiteliais, e são classificadas em dois tipos: **pap** ("pyelonephritis associated pili"),

que reconhece a molécula alfa D-galactose.(1-4)-beta-D-galactose como receptor específico e que está associada ao tipo sanguíneo P (Van-Die et al., 1988), **prs** ("pap related sequence") reconhecem antígenos de Forssman, presente nos enterócitos de carneiro e no epitélio da pelve renal humana, ligando-se ao resíduo de galactose-N-acetil-alfa (1-3) galactose-N-acetil (Arthur et al., 1989).

Fímbrias do tipo-X apresentam hemaglutinação manose resistente e também reconhecem receptores diferentes do antígeno-P. Este tipo de fimbria tem a propriedade de interagir com glicoforina-A e demonstra especificidade pelo grupo sanguíneo-M. Esse tipo de fimbria reconhece o receptor ácido neuroamínico que, em várias linhagens investigadas é o neuroaminil- α - (2-3) galactosídeo (Parkkiten et al., 1983).

***Escherichia coli* meningíticas**

Este tipo bacteriano é a responsável pela meningite que geralmente atinge crianças recém-nascidas. Esses microrganismos, que invadem a circulação sanguínea e atingem as meninges, podendo levar a criança à morte, geralmente pertencem aos sorotipos: 01, 07, 018, 075 (Levine, 1984).

Em sua grande maioria, as amostras bacterianas deste tipo apresentam o antígeno capsular K1, denominado de ácido colomínico, que é um polissacarídeo-ácido formado por um homopolímero 2-8-alfa do ácido N-acetilneuroamínico (ácido siálico).

O antígeno K apresenta estrutura química idêntica ao polissacarídeo ácido do grupo B de *Neisseria meningitidis*, o qual apresenta identidade imunológica completa (Levine, 1984).

***Escherichia coli* ligadas a infecções intestinais**

Escherichia coli enteropatogênica é constituída por um grupo heterogêneo que causa infecções intestinais e diarréias utilizando diferentes mecanismos de patogenicidade. Muitos autores concentram esforços no sentido de classificar as diferentes classes de *Escherichia coli* enteropatogênicas. Segundo Levine, (1987), o sistema de classificação está baseado nas diferentes propriedades de virulência, diferentes interações com a mucosa intestinal, diferentes síndromes clínicas, diferenças epidemiológicas e distintos sorotipos (O):H apresentado por este grupo.

Pelas características clínicas e sintomatológicas causadas pelo microorganismo no homem, as *Escherichia coli* são classificadas em cinco grupos: *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) e *Escherichia coli* enteroagregativa (EAaggEC) (Mathewson, et al.,1985; 1986; Levine, 1987; Cravioto et al.,1991 e Faruque et al.,1992).

Escherichia coli Enterotoxigênicas

Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC) é a maior causadora de diarreia em crianças com idade de até cinco anos. A contaminação causada por este grupo bacteriano ocorre através da ingestão de alimentos ou água contaminados. A principal característica da infecção causada pelo grupo ETEC é a diarreia aquosa, que é comumente acompanhada de febre, cólicas abdominais, moleza e vômitos (Bettley et al., 1986).. As ETEC produzem enterotoxinas características e possuem fímbrias como também adesinas não fimbriais (fatores de colonização) (Orskov & Orskov, 1977; Orskov et al., 1976; Merson et al., 1979) as quais permitem que as mesmas colonizem o trato intestinal e, evitem, também, desta maneira, a ação de limpeza do movimento peristáltico intestinal (Christensen et al., 1985).

A principal característica da *Escherichia coli* enterotoxigênica é a capacidade de sintetizar dois tipos de toxinas: toxina - termo-lábil (LT), que é inativada à temperatura de 60°C por 30 minutos e toxinas termo-estável (ST), que são ativas mesmo após o aquecimento a 100°C por 15 minutos (Smith & Gyles, 1970; Black et al., 1982; Scotland, 1988).

Enterotoxina Termoestável (ST)

A toxina termo-estável de *Escherichia coli* apresenta-se como um grupo heterogêneo sendo classificada em duas classes: **ST-I (STa)** e **ST-II (STb)** (Whipp et al., 1981). A toxina ST-I é um polipeptídeo pequeno, que apresenta seis resíduos do aminoácido cisteína os quais formam três pontes de dissulfeto intra-cadeias e são muito importantes na estrutura conformacional da toxina ativa (Garipey et al., 1987), sendo imunogênica somente quando acoplada a uma proteína carreadora (Klipstein et al., 1982). Esta toxina é solúvel em metanol; ativa em camundongos recém-nascidos (Dean et al, 1973) e sua atividade biológica baseia-se no estímulo à enzima guanilato-ciclase, que eleva os níveis intracelulares de GMP-cíclico (Hughes et al.,1978; Greenberg & Guerrant, 1980; Pickett et al., 1986). O mecanismo pelo qual esta toxina reconhece e penetra nos enterócitos ativando o GMPc não está bem elucidado, no entanto sabe-se que esta ativação acarreta uma alteração na membrana dos enterócitos, resultando em uma secreção elevada de fluídos para a luz do tubo intestinal, o que caracteriza a diarreia (Field et al., 1978). Posteriormente, verificou-se que a enterotoxina ST-I apresenta duas variantes encontradas em amostras bacterianas isoladas de suínos que receberam os nomes de STp ou ST-Ia, isoladas de amostras de humana, e de STh ou ST-Ib (Gyles, 1979; Moseley et al., 1983), uma terceira foi descrita e designada ST-Ic (Meas et al., 1985)..

As porções ativas das toxinas Sth e Stp são constituídas por 18 e 19 resíduos de aminoácidos respectivamente. O grau de homologia que esses dois polipeptídeos exibem entre si e as sequências de aminoácidos de ambos podem ser sobrepostas a partir da região carboxi-terminal, revelando assim, que além da presença de um resíduo de aminoácidos a mais na toxina Sth, há uma diferença em três outros resíduos de aminoácidos da região amino-terminal, (Field et al, 1978; Frantz et al 1984; Garipey & Shoolnik, 1986). A extremidade carboxi-terminal além de apresentar-se mais conservada está envolvida com a atividade biológica dessas proteínas. A capacidade de reconhecimento a receptores e toxigenicidade parece estar relacionada aos resíduos de aminoácidos da região carboxi-terminal, (Garipey et al.,1986; Schimonish et al 1987; Thompson & Gianella, 1985)

Após o sequenciamento e a capacitação das sequências dos genes que codificam as toxinas Sth (*esth*) e Stp (*stp*) detectou-se divergência em 67 nucleotídeos que a nível de aminoácidos, representa uma divergência de 31% (Moseley et al., 1983; So & Mc Carty, 1980). Ambos os genes codificam polipeptídeos constituídos por 72 resíduos de aminoácidos que apresentam em sua sequência sinais hidrofóbicos. Uma vez no espaço periplasmático estes polipeptídeos sofrem processamento e originam a forma ativa da toxina ST-I. Esta toxina é uma proteína extracelular, sendo que seu mecanismo de secreção através da membrana externa ainda não está bem elucidado, (Betley et al., 1986).

Outro tipo de toxina termoestável, encontrado em *Escherichia coli*, foi designada de toxina StII. Esta toxina é insolúvel

em metanol e detectável através do teste de alça intestinal em suínos (Gyles, 1969). Esta estimula a secreção intestinal por um mecanismo ainda desconhecido que não envolve alterações das concentrações de nucleotídeos cíclicos (Kennedy et al., 1984; Weikel et al., 1986).

A toxina STII é codificada por genes plasmidiais que sintetizam uma cadeia polipeptídica com 71 resíduos de aminoácidos. Os 23 primeiros resíduos correspondem ao peptídeo sinal da toxina. A proteína atingindo o seu estado conformacional passa a ser constituída por 48 resíduos de aminoácidos com peso molecular de aproximadamente 5 KDa (Lee et al., 1983).

Enterotoxina Termolábil (LT)

A toxina termolábil (LT), assim como as toxinas termoestáveis (ST), são codificadas por genes localizados em plasmídios conjugativos ou não relacionados entre si e com o plasmídio F (Betley et al., 1986).

Por apresentarem heterogeneidade, foram classificadas em duas classes: a classe LT-I que envolve toxinas semelhante à toxina colérica (CT), apresentando identidade imunológica e sendo neutralizada pelo anti-soro anti CT. Nesta classe encontram-se as toxinas (LTh) e (LTp), produzidas por amostras de *Escherichia coli* de origem humana e suínos, respectivamente. A diferença entre as duas toxinas está em apenas um resíduo de aminoácido (Dykes et

al., 1985; Yamamoto et al., 1987). O modo de ação **LTh** e **LTP** é semelhante e se dá através da ativação da enzima adenilato ciclase e do aumento do nível de AMPc, o qual resulta na secreção de líquido para a luz intestinal, promovendo assim, diarreia aquosa (Chang et al., 1987). A toxina **LTP** é imunologicamente distinta da toxina **LTh** não sendo neutralizada pelo anti-soro anti-LTh ou pelo anti soro anti-CT (Green et al., 1983).

A enterotoxina **LTh** é uma proteína de alto peso molecular (75 - 90 KDa), composta por dois tipos de subunidades. Uma sub-unidade A (**LT_A**), que está associada a cinco sub-unidades B (**LT_B**), formando a holotoxina (Levine, 1984).

A subunidade A tem a função de estimular a adenil-ciclase através de sua atividade enzimática ADP-ribosilante (Gill & Richardson, 1980). A subunidade B é responsável pela ligação da holoenzima à membrana dos enterócitos intestinais, interagindo com o gangliosídeo GM1, glicoproteínas localizadas na superfície celular (Holmgren, 1973; Holmgren et al., 1982).

Após esta ligação, a subunidade A é interiorizada e sofre uma quebra enzimática em dois peptídeos A₁ e A₂, sendo que a atividade enzimática é conferida pelo peptídeo A₁, (Spicer & Noble, 1982).

A enterotoxina **LTh** é similar à toxina colérica (CT) em estrutura, mecanismos de ação, a atividade, determinantes antigênicos, e sequência de aminoácidos (Dallas & Falkow, 1980; Clements et al., 1980, Smith & Sach, 1973; Bettley et al., 1986; Yamamoto et al., 1987).

Uma segunda toxina enterotoxina **LTII**, foi isolada de fezes diarréicas de búfalo na Tailândia é imunologicamente distinta da **LTI**, não sendo neutralizada pelo anti-soro **LTh** ou anti **CT** (Green et al., 1983). A enterotoxina **LTII** é muito similar à toxina colérica (**CT**) em estrutura, atividade e determinantes antigênicos e os genes codificantes das duas toxinas mostram um alto grau de homologia (Dallas & Falcow, 1980; Clements et al., 1980).

Recentemente, foram isolados de aves amostras de *Escherichia coli* que produziam toxinas do tipo termolábeis **LT** e que receberam o nome de **LTc**. Esta toxina de *Escherichia coli* aviária é constituída também por duas subunidades **A** e **B**. A subunidade **A** da **LTc** é idêntica à subunidade **A** de **LTP** e a subunidade **B** da **LTc** é idêntica à subunidade **B** de **Lth**, mas não é idêntica à subunidade **B** da **LTP**. Este tipo de comparação foi observado através de diferenças de migrações em géis de eletroforese **SDS-PAGE**, e reação com anti-soro monoclonais específicos. Os resultados obtidos do estudo do ponto isoelétrico e a composição de aminoácidos da **LTc** sugere que estas amostras de *E. coli* de aves produzem uma **LT** semelhante à **LTh** (Tsuji et al., 1988).

Fatores de colonização das *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC)

As linhagens de *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC) caracterizam-se por produzirem adesinas ou fatores de colonização que permitem a adesão na mucosa intestinal do hospedeiro, resistindo ao movimento peristáltico de limpeza (Gaastra & de Graaf, 1982; Levine, 1984).

O principal tipo de adesina existente nesse tipo bacteriano são as fímbrias. Estas são compostas por estruturas protéicas do tipo filamentosas ou fibrilares, localizadas na superfície bacteriana (Mooi & de-Graaf, 1985). Algumas fímbrias reconhecem receptores específicos de diversas células, como enterócitos e geralmente eritrócitos. A capacidade de aderir ou não a eritrócitos (hemaglutinação) de diferentes animais incluindo o homem, pode ser utilizada para a identificação e classificação das diferentes fímbrias (Gaastra & de-Graaf, 1982). Atualmente são conhecidas vários tipos de fímbrias com antigenicidade, peso molecular e especificidade a receptores característicos como mostram os Quadros II e III.

Quadro II. Características de fímbrias de *Escherichia coli* enterotoxigênica isoladas de animais, quanto ao sorogrupo, toxinas relacionadas e hemaglutinação

FÍMBRIA	SOROGRUPO	TOXINAS	HEMAGLUTINAÇÃO
K88 (F4)	08, 09, 020, 045, 0138, 0149, 0157	ST, LT, ST+LT	cobaia, galinha
K99 (F5)	08, 09, 020, 064, 0101, 0149	ST	cavalo, carneiro
987P (F6)	08, 09, 020, 064, 0141, 0149	ST	não determinada
F41	09, 020, 064, 0101	ST	humano, cavalo, cobaia, carneiro
F42		ST _A	carneiro, cobaia, galinha, cavalo e humanos

Fonte Gaastra & de-Graaf, 1982

Quadro III. Características de fimbrias de *Escherichia coli* enterotoxigênicas isoladas de animais, quanto a morfologia, peso molecular, localização genética e hospedeiro.

FÍMBRIA	MORFOLOGIA	PM	LOCALIZAÇÃO	ORIGEM
Tipo 1 (F1)	rígida	15700	cromossomo	animais, homem
K88	flexível	27540	plasmídio	suínos
K99	flexível	18200	plasmídio	suínos, bovinos
987P (F5)	rígida	20000	cromossomo	suínos
F41	flexível	29500	cromossomo	suínos, bovinos
F42	rígida	31000	plasmídios	suínos
FY	flexível	20000	ND	bovinos

PM, peso molecular em daltons

ND, não determinado

Fonte - Gaastra & de-Graaf, 1990.

As fimbrias associadas à ETEC de origem humana são CFAI, CFAll, CFAlll e CFAIV. As fimbrias CFAI e CFAlll apresentam-se como estruturas únicas e rígidas, apresenta hemaglutinação manose resistente com eritrócitos humanos, bovinos e de galinha (Gaastra & de-Graaf, 1982). A fimbria CFAll por apresentar um grupo heterogêneo foi classificada em três tipos de fimbrias antigênicas distintas CS1 e CS2 com estruturas rígidas e CS3 apresenta-se mais fina e flexível. Entre as ETECs que produzem fimbrias CFAll, apresentam sempre o antígeno CS3, sendo, a expressão de CS1 e CS2 dependente do biotipo da amostra; CFAIV apresenta hemaglutinação com eritrocitos humanos e bovinos (Thomas et al., 1981; Mc Connel et al., 1981).

Posteriormente um novo fator de colonização foi descrito e denominado PCF 0159, não apresentando capacidade hemaglutinante (Tacket et al., 1987).

As fimbrias da linhagem de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) formam um grupo funcional estrutural que poderiam ter evoluído a partir de genes ancestrais comuns (Mooi & de Graaf, 1985).

A estrutura primária das subunidades estruturais de algumas fimbrias foram parcialmente ou totalmente sequenciadas permitindo, assim, uma comparação entre as regiões carboxi-terminal, amino-terminal e central. Observou-se que a região carboxi-terminal apresenta um grau elevado de homologia na sequência de amino ácidos e em menor extensão na região amino terminal. Estas regiões estão provavelmente envolvidas com funções comuns a este grupo de proteínas tais como: transporte através da membrana externa, ancoragem, ligação entre as subunidades e manutenção da estrutura. A região central é mais variável e provavelmente estão associadas ao reconhecimento de diferentes receptores ou podem ter sofrido uma divergência em resposta a pressões imunológicas devido a sua estrutura e atividade funcional, (Schwiring, 1982).

Escherichia coli enteropatogênicas (EPEC)

A bactéria *Escherichia coli* do grupo EPEC quando coloniza o intestino do hospedeiro causa a diarreia aquosa, acompanhada de vômitos e febre em neonatos e crianças, é altamente patogênica, causam lesões histopatológicas, em modelos animais (Polotsky et al., 1977; Moon et al., 1983), bem como no intestino humano (Ulshen & Rollo 1980; Rothbaum et al., 1982).

A principal característica do grupo bacteriano das EPECs é o de não sintetizar toxina termolábil (LT) e termoestável (ST), e não apresentar a capacidade de invasão em tecidos (Moon et al., 1983).

Através da microscopia eletrônica Moon e colaboradores (1983), observaram que as bactérias *Escherichia coli* enteropatogênicas, aderem fortemente às células epiteliais, destruindo a bordadura em escova mas sem invasão celular.

Com a destruição das microvilosidades intestinais, não ocorre a reabsorção normal dos fluidos da luz intestinal acarretando assim, diarreia absorvativa (Levine & Edelman, 1984; Ulshen & Rollo, 1980; Rothbaum et al., 1982).

As linhagens *Escherichia coli* EPECs apresentam adesão em células Hep2, uma característica não exibida por outras linhagens de *Escherichia coli* como ETEC, EHEC, EIEC ou outras linhagens da flora normal (Cravioto et al., 1979).

A capacidade de adesão desse grupo bacteriano, em células Hep2, foi associada à presença de um plasmídeo de 60 MDa denominado de EAF (EPEC adherence factor) (Baldini et al. 1983). Levine (1985), correlacionou a presença deste plasmídeo com a

codificação de uma proteína de 94 Kda e que estaria associada à patogenicidade de EPEC e conseqüentemente com a adesão em células HeP2.

Estudos realizados com sorotipos bacterianos causadores deste tipo de diarreia, permitiu a distinção do grupo das EPECs em duas classes: Classe I, compreende as EPECs que são portadoras do plasmídeo *EAF* e exibem sorotipos de aderência localizada em células Hep2; Classe II, grupos de EPECs que não apresentam plasmídeo *EAF*, não apresentam aderência localizada em células Hep2, mas são causadoras de diarreia (Nataro et al., 1985).

***Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)**

Este grupo bacteriano apresenta um quadro clínico de colite hemorrágica severa (Riley et al., 1982), caracterizado pela ocorrência de uma intensa diarreia febril sanguinolenta, mas sem leucócitos (Levine, 1987). Outro quadro clínico causado por EHEC é a síndrome urêmica hemolítica (HUS) (Karmali et al., 1983; Grandsen et al., 1986; Remis et al., 1984).

Inicialmente, identificou-se o sorogrupo 0157:H7, como agente causador desta infecção mas, hoje são conhecidos outros sorogrupos patogênicos (Levine et al., 1985; Smith et al., 1987).

As linhagens de *Escherichia coli* (EHEC) são portadoras de um plasmídeo de 60 MDa que é responsável pela síntese de citotoxinas, específicas para dois tipos celulares "Hela" e "Vero" (O'Brien et al., 1983; Johnson et al., 1983), e que parece estar

associado à síntese de uma fimbria não hemaglutinante que permite a adesão das cepas bacterianas em células intestinais "Henle 407" e que podem estar associada à patogenicidade (Karch et al., 1987). A construção de uma sondas a partir deste plasmídeo, demonstrou que este é altamente específico para o grupo de EHEC (Levine, 1987).

Através de estudos imunológicos verificou-se que o soro anti-toxina produzido por *Shigella dysenteriae* I, neutralizava a atividade citotóxica das cepas bacterianas do grupo *Escherichia coli* EHEC (O'Brien et al., 1983). A ação das toxinas presentes nestes dois tipos celulares são iguais, inativando a subunidade ribossomal 60S (O'Brien & Holmes, 1987).

Os genes que codificam as toxinas das *Escherichia coli* EHEC, estão localizados em um bacteriófago, (Scotland et al., 1983; Smith et al., 1983; O'Brien et al., 1984), e, em *Shigella dysenteriae*, estão no cromossomo. As toxinas das duas espécies bacterianas apresentam uma subunidade A, ligada a cinco subunidades B e os genes estão em uma unidade transcricional simples (O'Brien & Holmes, 1987). O sequenciamento e a posterior comparação dos genes codificadores de Shiga-toxin e Shiga-like toxin demonstrou que a diferença entre eles ocorre em apenas alguns nucleotídeos. As subunidades B não apresentam diferenças em suas estruturas primárias enquanto que a subunidade A que é composta por uma cadeia de 293 resíduos de aminoácidos, apresenta diferença somente em um resíduo de aminoácido (Jackson et al., 1987).

Algumas linhagens de EHEC produzem uma toxina que não é reconhecida por anti soro anti Shiga-toxin, mas é tóxica para células Vero e Hela, designadas de SLT-II (Strockbina et al., 1986) ou Verotoxina-II (Scotland et al., 1985) embora as subunidades

dessas toxinas sejam idênticas em tamanho e apresentam estruturas secundárias similares. Outra variante desta toxina foi observada em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de porcos com edema, esta toxina é reconhecida pelo antisoro contra SLT-II mas não é tóxica contra células Hela, sendo tóxica somente para células Vero (Marques et al., 1987; Gannon & Gyles, 1987; O'Brien & Holmes, 1987).

Estudos realizados em suínos gnobióticos demonstraram que a infecção causada pelas EHEC ocorre com a adesão das cepas nos enterócitos intestinais destruindo as microvilosidades. Este tipo de lesão é semelhante à causada pelas EPECs diferenciando-se deste grupo por proliferarem-se na lâmina própria e nas criptas glandulares (Tzipori et al., 1986).

***Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)**

Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC) apresenta capacidade de invasão das células do cólon produzindo sintomas de diarreia e disenteria semelhante à causada por *Shigella* (Du Pont et al., 1971; Formal & Hornick, 1978; Wanger et al., 1988). A capacidade de invadir e colonizar os tecidos do hospedeiro foi associada à presença de um plasmídeo de alto peso molecular 140Mda, que codifica várias proteínas de membrana externa relacionadas a este processo (Hale et al., 1983), embora outros fatores de virulência sejam codificados no DNA cromossômico (Maurelli & Sansinetti, 1988).

A identificação de EIEC pode ser feita através da sorotipagem das amostras envolvidas em diarreia (Toledo et al., 1983), através do teste de Serény (Serény, 1955; Toledo et al., 1983), ou através da utilização de sondas moleculares construídas a partir do plasmídeo de virulência de *Shigella flexneri* (Wanger et al., 1988).

Escherichia coli enteroagregativa (EAggEC)

Escherichia coli enteroagregativa compreendem amostras de origem humana, que estão associadas a diarreias (Nataro et al., 1987). Estudos realizados no México, Índia e Brasil, reportam que este grupo bacteriano, quando presente no hospedeiro, invadem o epitélio do intestino, e aderindo-se, formando microcolonias de forma característica. Apresenta um quadro clínico com diarreia persistente não hemorrágica e sem leucócitos fecais (Nataro et al., 1987).

O grupo de EAggEC não são portadoras do plasmídeo EAF e pertencem a três tipos distintos de sorogrupos não clássicos: 044:H18 0111ab:H25 0126:H27 (Scotland et al., 1991).

EAggEC tem como característica a adesão a células Hep2, devido à presença de um plasmídeo de 60MDa, que é responsável pela aderência agregativa, de forma característica, como descrito para EPECs. As EPECs não produzem toxinas do tipo ST, LT ou SLT e não invadem células do epitélio intestinal (Levine, 1987; Savarino et al., 1993). O grupo de EAggEC produzem uma enterotoxina, de baixo peso molecular chamada de EAST1 que quando aquecida aumenta o nível de GMPc nos enterócitos

(Savarino et al., 1991). Esta toxina é imunologicamente ativa como hemolisina e é capaz de aumentar o nível de cálcio intracelular em células do epitélio in vitro (Baldwin et al., 1992).

A inativação de um gene plasmidial através da mutagênese com o transposom Tn1, na linhagem LT100, resultou na perda de ação agregativa como também, perda da capacidade de sintetizar a toxina EAST1 (Yamamoto et al., 1991).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1- MEIOS DE CULTURAS.

Todos os meios utilizados para manutenção, cultivo e ensaio das amostras bacterianas foram preparados com reagentes grau P. A. , água destilada, e esterilizados por autoclavagem a 121°C por 20 minutos. Os antimicrobianos foram acrescentados nas concentrações adequadas, quando necessário. Para o preparo dos meios de cultura sólidos foi utilizado ágar (Dífico) na concentração de 15 g/l e para os meios de cultura semi-sólidos, a concentração usada foi de 7 g/l.

Meio de cultura LB (Luria-Bertani Medium) modificado por Miller (1972). O meio de cultura LB foi utilizado para o crescimento de amostras bacterianas em pré-inóculos.

Triptona	10,00 g
Extrato de levedura	5,00 g
NaCl	10,00 g
Água destilada q.s.p	1000,00 ml
pH 7.2	

Meio de cultura LA (Luria Bertani ágar). Miller (1972).

Ágar bacteriológico	15,00 g
meio LB pH 7.2	1000,00 ml

Meio de cultura LA semi-sólido (Luria Bertani Agar), modificado por Miller 1972

Meio utilizado para estocar as amostras bacterianas.

Ágar bacteriológico	7,00 g
meio LB pH 7.2	1000,00 ml

Meio Ágar Mac-Conkey

Meio de cultura ágar Mac-Conkey (Difco Lab), foi usado como meio seletivo, no reisolamento de amostras bacterianas e também em teste de hemaglutinação

Meio Mac- Conkey	50,00 g
Água destilada q.s.p	1000,00 ml

O meio é reconstituído colocando-se os dois componentes sob agitação suave, com aquecimento até completa dissolução do ágar.

Meio Mínimo (M. M.) (Davis & Minglioli, 1950).

1-) Solução Estoque M. M. 20 x

K ₂ HPO ₄	140,00 g
KH ₂ HPO ₄	60,00 g
Citrato de Sódio	10,00 g
(NH ₄) 2 SO ₄	20,00 g
Mg SO ₄ . 7H ₂ O	2,00 g
Água destilada q.s.p.	1000,00 ml

Adicionam-se 10 ml dessa solução estoque M.M. 20 x em 200 ml de ágar 2% glicose para uma concentração final de 0,5 %.

Meio BHI e BHI - ágar (Brain Heart Infusion)

O meio de cultura infusão do cérebro e coração, que foi usado foi de procedência da Biobrás. Para o preparo do meio BHI sólido, foram adicionados ao meio de cultura BHI líquido 1,5 % de ágar.

Meio CFA (Colonization Factor Agar).

Este meio de cultura foi preparado segundo a formulação de Evans et al. (1980). O meio foi utilizado para o crescimento de amostras bacterianas que foram ensaiadas para a capacidade de hemaglutinação com hemácias de diferentes origens.

a) Meio CFA base

Extrato de levedura	1,50 g
Casaminoácidos	10,00 g
Ágar bacteriológico	20,00 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,00 ml

Adicionam-se ao meio base, após ter sido autoclavado, 1 ml das soluções A e B, para cada 100 ml de meio.

b) Solução A:

MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,05 g
H ₂ O mili-Q esterilizada q.s.p.	50,00 ml

c) Solução B

MnCl ₂	0,39 g
H ₂ O Mili-Q esterilizada q.s.p.	50,00 ml

As soluções A e B foram esterilizadas por filtração em membrana Millipore 0,22µm (Swinex 0,47 mm) e estocadas a 4^o C.

Meio de cultura TSB (Trypticase Soy Broth).

Modificado por Scaletsky et al. (1984), este meio foi utilizado na cultura bacteriana para o teste de hemaglutinação.

triptona	50,00 g/l
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,00 ml

Meio de cultura TSA (Trypticase soy ágar)

Ágar bacteriológico	15,00 g/l
TSB q.s.p.	1000,00 ml

Meio de Cultura Ágar Glicose

Meio de Cultura utilizado em teste de hemaglutinação . Este método segue a formulação descrita por Jones & Ruter (1972).

a) Caldo Simples

Extrato de carne	1,00 g/l
Peptona	10,00 g/l
NaCl	5,00 g/l
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,00 ml

b) Solução estoque de glicose 20%

Glicose	20,00 g
H ₂ O destilada q.s.p.	100,00 ml

A solução de glicose foi esterilizada por filtração em membrana Millipore 0.22 µm (Swinex 0,47 mm).

c) Meio Base

KH ₂ PO ₄	0,45 g
Na ₂ HPO ₄	0,81 g
Ágar bacteriológico	12,00 g
Caldo simples	1000,00 ml

A solução de glicose foi adicionada para uma concentração final de 0,1% ao meio base, depois de ter sido resfriado.

Meio de Cultura Peptona-Glicose 1%

Peptona	1,00 g
H ₂ O destilada q.s.p.	100,00 ml
Solução glicose 20%	5,00 ml

A solução estoque de glicose 20% já foi descrita anteriormente e foi adicionada após a esterilização e resfriamento do meio peptona.

Meio de Cultura Eagle

O meio de cultura Eagle foi utilizado para manter células da traquéia de aves com suas funções biológicas.

Este meio de cultura foi preparado segundo as especificações do fabricante. O pH foi ajustado com uma solução de bicarbonato de sódio 10%, e também acrescentou-se nesse meio soro fetal bovino (Cultilab) na concentração de 5%, usado como complemento do meio de cultura para o crescimento bacteriano e para manter as células de traquéia vivas. O meio de cultura foi esterilizado por filtração através do filtro Sartorius e mantido a 4°C.

Meio de Cultura Minca

Extrato de levedura	0,50 g
Casaminoácidos	0,50 g
KH ₂ PO ₄	0,68 g
Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O	5,50 g
Ágar bacteriológico	6,00 g
Sais de Minca	1,00 ml
H ₂ O destilada q.s.p.	500,00 ml

Sais de Minca

MgSO ₄ . 7H ₂ O	1,00 g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,10 g
FeCl ₃ . 6H ₂ O	13,00 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,04 g
H ₂ O mili Q	100,00 ml

Esta solução foi esterilizada por filtração em membrana Millipore 0,22 μ (Swinex 0,47mm) e mantida a 4°C.

4.1.2-Soluções e reagentes de uso geral

Soluções estoques de drogas antimicrobianas.

Os antimicrobianos usados foram ácido nalidíxico, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, canamicina e tetraciclina. As concentrações utilizadas no preparo dos estoques antimicrobianos e os diluentes empregados encontram-se abaixo. Após o preparo as soluções foram aliquotadas e armazenadas a -20°C.

Antimicrobianos com suas respectivas concentrações e diluentes usados no experimento.

Antimicrobianos	Concentrações diluentes
Ampicilina (Ap)	25,0 mg/ml em H ₂ O mili-Q
Cloranfenicol (Cm)	25,0 mg/ml em etanol
Canamicina (Km)	25,0 mg/ml em H ₂ O mili-Q
Ácido Nalidíxico (Nal)	25,0 mg/ml em NaOH 0,2N
Estreptomicina (Sm)	20,0 mg/ml em H ₂ O mili-Q
Tetraciclina (Tc)	12,5 mg/ml em metanol

“Pool” do soro de galinha.

Soro de galinha foi utilizado nos testes de resistência sérica das diferentes amostras bacterianas.

Sangue de 6 a 8 galinhas foi coletado sob condições de assepsia e mantido à temperatura ambiente por 60 a 120 minutos e, em seguida, colocados à temperatura de 4°C por alguns minutos para a formação do coágulo. O soro foi então centrifugado a 1500 r.p.m. por 10 minutos à temperatura de 4°C, o sobrenadante foi coletado por aspiração, distribuídos em alíquotas de 5ml, e estocados a -20°C.

Solução salina 0,85% (solução utilizada para diluição das amostras bacterianas em diversos protocolos)

NaCl	0,85 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,00 ml

Solução tampão PBS 0,05M pH 7,4

a-) Tampão fosfato pH 7.4

K ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
KCl	0,20 g
NaCl	8,00 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,00

Ajusta-se o pH à 7,4 da solução adicionando-se Hcl 1N.

Solução de Alsever

Glicose	20,50 g
Citrato de Sódio 3,8%	8,00 g
NaCL	4,20 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,00 ml

O pH da solução foi ajustado para 6,5 com ácido cítrico e posteriormente esterilizada por filtração, em membrana Millipore 0.22 μ m (Swinex 0.47 mm) e mantida a 4°C

Soluções para extração do DNA plasmidial

a) Solução I (Tris HCl 25mM pH 8,0; glicose 50mM, EDTA 10mM)

Tris	0,3028 g
Glicose anidra	0,9008 g
Solução estoque EDTA 0,5M	2,0000 ml
H ₂ O mili-Q q.s.p.	100,0000 ml

Após a mistura dos compostos, esta solução foi autoclavada a 121°C durante 20 minutos, e após o seu resfriamento, estocada a 4°C. Exceto a solução de glicose que é adicionada após a autoclavagem do material e com temperatura aproximada de 37°.

b) Solução II (NaOH 0,2N; SDS 1%)

NaOH 10N	200,00 μ l
SDS 10%	100,00 μ l
H ₂ O mili-Q esterilizada q.s.p.	700,00 μ l

A solução foi homogeneizada e preparada momentos antes do uso.

c) Solução III (Acetato de Sódio 3M; ácido acético glacial 100%)

Solução acetato de sódio 3M	60,00 ml
Ácido acético glacial	11,50 ml
H ₂ O mili-Q esterilizada q.s.p.	28.50 ml

A certar o pH final 4,8

Solução estoque de RNase (RNase 10mg/ml; NaCl 15mM; Tris 15mM; pH7,5)

RNase	100,00 mg
Tris	18,20 mg
NaCl	8,80 mg
H ₂ O mili-Q esterilizada q.s.p.	10,00 ml

Acertar o pH final 7,5

Esta solução foi colocada em banho a 100°C por 15 minutos e homogeneizada, e após o seu resfriamento foi estocadas em alíquotas de 1ml a 20°.

Solução de ressuspensão 6x (ficol 400 15%; azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol FF 0,25%; RNase 0,1mg/ml)

Após a homogeneização dos componentes, esta solução foi mantida à temperatura ambiente.

Solução para eletroforese de DNA em gel de agarose

Tampão TEB 5x

Tris	54,0 g
Ácido Bórico	27,5 g
Solução de EDTA 0,5M	20,0 ml
H ₂ O mili-Q esterilizada	1000,0 ml

pH final 8.0, ajustado com HCl 1N

Tampão TEB 1x (Tris borato 0,09M pH 8,0; EDTA 2mM)

Tampão TEB 5x	200,00 ml
H ₂ O mili-Q esterilizada q.s.p.	800,00 ml

pH final 8.0, ajustado com HCl 1N

Solução para visualização de DNA em U.V.**Solução corante de brometo de etídio (0,5µg/ml)**

Brometo de etídio 1%	50,00µl
H ₂ O destilada q.s.p.	100,00ml

Soluções empregadas na extração de proteínas de membrana**a) Tampão tris HCl 3,3mM pH 7.4**

Tris HCl	0,3996 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0000 ml

b) Tampão tris HCl 0,1M + EDTA 10mM pH 7.4

Trizma Base	12,110 g
EDTA . 2H ₂ O	3,722 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,000 ml

O pH foi ajustado com solução de HCl 1N

c) Tampão Tris HCl 0,1M + MgCl₂ 10mM pH 7.4

Trizma Base	12,110 g
MgCl ₂ . 6H ₂ O	2,033 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,000 ml

O pH foi ajustado com solução HCl 1N

d) Tampão tris HCl 0,1M + sacarose 0,75M pH 7,4

Trizma Base	12,11 g
sacarose	256,73 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,00 ml

O pH foi ajustado com solução de HCl 1N

e) Tampão tris HCl 63mM + Triton X100 2% (v/v) pH 6,8

Trizma Basel	8,629 g
Triton X100	20,000 ml
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,000 ml

O pH foi ajustado com solução de HCl 1N

f) Tampão de ressuspensão da amostra (Tris 100mM pH6,8, Glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2% e β-mercaptoetanol 10%).

O pH foi ajustado com solução de HCl 1N

Soluções usadas no preparo dos géis de acrilamida SDS-PAGE

As soluções e tampões utilizadas no preparo dos géis de poliacrilamida SDS, seguiram as especificações do "Hoefer Electrophoresis Catalog and Exercises (1990-1991). As concentrações das soluções para gel de 12,5% estão relacionados a seguir.

Soluções utilizadas para a produção de gel SDS-PAGE 12,5% e gel de empacotamento 4%.

Soluções	Gel de Separação 12,5% Acrilamida	Gel de Empacotamento 4% Acrilamida
30%A ^a 1,6% BisA ^b	25,0 ml	2,66 ml
Tris-HCl 1,5M pH 8.8	15,0 ml	-----
Tris HCl 0,5M pH 6.8	-----	5,00 ml
SDS ^c 10%	600,0 µl	200,00 µl
H ₂ O destilada	19,1 ml	12,20 ml
Persulfato de Amônio 10%	300,0 µl	100,00 µl
TEMED ^d	20,0 µl	10,00 µl

^a Solução estoque acrilamida

^b Solução estoque bis-acrilamida

^c dodecil sulfato de sódio

^d N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina

Solução monômero acrilamida (estoque).

Acrilamida 30%	29,20 g
Bisacrilamida 1,6%	1,600 g
H ₂ O destilada q.s.p.	100,00 ml

Tampão Tris-Glicina 1M (estoque).

Trizma Base	15,00 g
Glicina	72,00 g
SDS	5,00 g

Completar o volume para 1000 ml com H₂O destilada q.s.p.

Tampão Tris 0,5M pH 6.8

Trizma Base	6,10 g
H ₂ O destilada q.s.p.	100,00 ml
Ajustar o pH 6,8 com HCl - Estocar a 4°C	

Tampão Tris-HCl 1,5M pH 8.8

Trizma Base	18,20 g
H ₂ O destilada q.s.p.	100,00 ml
Ajustar o pH 8.8 com HCl - Estocar a 4°C	

Tampão da Amostra (Tris 0,06M pH 6,8; SDS 2%, Glicerol 1%; azul de bromofenol 0,025%; 2-β-mercaptoethanol).

Trizma Base 0,5M pH 6.8	2,50 ml
Glicerol	2,00 ml
SDS 10%	4,00 ml
Azul bromofenol	25,00 μl
2-β-mercaptoethanol	1,00 ml
H ₂ O destilada q.s.p.	10,00 ml

Marcadores de peso molecular

Foi utilizado o kit de marcadores de peso molecular da Pharmacia.

Proteínas	PM(KD)
Citocromo C	12.3
Alfa-lactalbumina	14.4
Inibidor de tripsina	20.1
Anidrase carbônica	30.0
Ovalbumina	43.0
Albumina	67.0
Fosfolipase b	94.0

O "pool" de proteínas foi dissolvido em 100μl de tampão de eletroforese, contendo 2,5% de SDS e 5% de β-mercaptoetanol.

A mistura foi fervida a 100°C por 5 minutos e, após o seu resfriamento, estocada a -20°C.

Soluções para coloração com prata.

a) Solução fixadora (Etanol 50%, ácido acético glacial 12%, formaldeído).

Etanol	500,00 ml
Ácido acético glacial	120,00 ml
Formaldeído	0,50 ml
H ₂ O mili-Q q.s.p.	380,00 ml

b) Solução de Etanol 50%

Etanol	50,00 ml
H ₂ O mili-Q q.s.p.	50,00 ml

c) Solução de pré-tratamento (Tiosulfato de sódio 0,02%)

Tiosulfato de sódio	0,06 g
H ₂ O destilada q.s.p.	300,00 ml

d) Solução de impregnação (Nitratato de prata 0,2%; formaldeído)

Nitrato de prata	0,60 g
Formaldeído	225,00 µl
H ₂ O destilada q.s.p.	300,00 ml

e) Solução reveladora (Carbonato de sódio 6%, tiosulfato de sódio 0,4%, formaldeído).

Carbonato de Sódio	18,00 g
Solução de pré-tratamento	6,00 ml
Formaldeído	150,00 µl
H ₂ O destilada q.s.p.	300,00 ml

f) Solução de bloqueio de revelação (Metanol 50%; ácido acético 12%)

Soluções utilizadas no preparo dos cortes histológicos para microscopia.

a) Solução tampão PBS 0,05M pH 7.4 (descrito anteriormente), formolizado a 10%.

b) Solução estoque de Giemsa (usado para corar os cortes histológicos)

Giemsa (Reagen)	1,00 g
Glicerina	54,00 ml
Metanol (Merk)	86,00 ml

O corante Giemsa foi dissolvido em glicerina e mantido em banho-Maria a 60°C por 90 minutos. Após o seu resfriamento, adicionou-se metanol, homogeneizou-se, e posteriormente filtrou-se a solução em papel Whatman nº3, sendo armazenada em frasco escuro a 4°C. O corante utilizado pra coloração estava em uma concentração final de 2% em PBS.

Soluções usadas na extração de Lipopolissacarideos (LPS) da membrana bacteriana.

a) Tampão de lise (SDS 2%, 2-mercaptoetanol 4%, glicerol 10%, 1M Tris (Hcl pH6,8) e bromophenol blue.)

Preparar 10ml deste tampão

b)Proteinase K (Sigma)

Proteinase K	25 mg
H ₂ O destilada esterilizada	1 ml

Soluções para corar o gel SDS-PAGE**a)Solução Fixadora (Etanol 40% (v/v), Ácido Acético 5% (v/v)).**

Completar o volume com água destilada q.s.p.

b)Solução de Oxidação (Etanol 40%, Ácido Acético Glacial 5% e Ácido Periódico 0,7% (v/v/w))

Completar o volume com água destilada q.s.p.

c)Solução de Formaldeído (Ácido Cítrico 10mg e 100µl formaldeído 37% (w/v))

Completar o volume para 200 ml com H₂O destilada q.s.p.

d)Solução para corar o gel SDS-PAGE

Hidróxido de Sódio 0,1M	28ml
Hidroxido de Amonia concentrada	1ml
Nitrato de Prata 20%	5 ml.

4.2 .MÉTODOS

4.2.1. Amostras e Plasmídios

A linhagem bacteriana F3, de *Escherichia coli*, foi isolada a partir do fígado de um frango com colicepticemia na região de Campinas, Estado de São Paulo e caracterizada no Departamento de Microbiologia no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. Esta amostra sintetiza colicinas E1 e E3, fímbrias do tipo-1 e apresenta resistência ao soro de galinha. A linhagem bacteriana *Escherichia coli* MS101 é lac⁻, ácido-nalidíxico resistente, sensível ao soro de galinha e não é patogênica em pintos de um dia de idade. Os plasmídios usados como padrão de peso molecular neste trabalho foram: p307 (Gyles & Barnum, 1986), pRP4 (Datta et al., 1971) e V517 (Macrina et al., 1978).

Quadro IV Linhagem bacteriana selvagem *E. coli* F3, com seus transconjugantes XP2, XP3 e XP4 da mutagênese F3 com TnphA (pRT 733) e padrões de plasmídios pRP4 e V517.

Linhagem de <i>E. coli</i>	Fenótipo	Referência
E. coli F3	Fímbrias do tipo 1, colicina E ₁ e E ₂ resistência ao soro de Galinha	D.M.I.
Pr ₁	Plasmídio 37MD	Centro desenvol. vacinas
PrA ₁	Plasmídio 54MD,	Centro desenvol. vacinas
V517	Plasmídios 32MD, 3.4MD, 1.7MD, 1.5MD 1.2MD	Macrina et al. 1978
SM10λ	Ap ^r , Km ^r , thi, thr, leu, lacY, supE, tonA, recA::plasmídio pRT733	Taylor et al., 1989
XP2	patogenicidade diminuída em aves, Fímbria tipo1, colicina, Km ^r	este estudo
Xp3	patogenicidade diminuída em aves, Fímbria tipo1, colicina, Km ^r	este estudo
Xp4	patogenicidade diminuída em aves Fímbria tipo1, colicina, Km ^r	este estudo

4.2.2 Determinação do padrão de hemaglutinação

Crescimento das amostras bacterianas.

O teste foi realizado com as amostras bacterianas F3, MS101 e os padrões descritos no quadro abaixo.

Quadro V- Padrões utilizados no teste de hemaglutinação.

Linhasgens	Fenótipos	Origem
567/7	F42 ⁺ ,ST _a ,Lac ⁺	(Leite, 1986)
ORN115	Fimbria Tipo 1	(Orndorff et al., 1985)
B14	F41 ⁺ ,K99	(Morris et al.,1980)
B41M	F41 ⁺	(Morris et al.,1982)

DM= Departamento de Microbiologia e Imunologia UNICAMP

CVD= Center of Vaccine Development (Maryland), USA

Amostras bacterianas foram crescidas em 3 ml de meio LB e incubadas a 37 °C por 12-18 horas. A seguir as culturas foram semeadas por esgotamento com alça de platina em placas de Petri com diferentes meios de cultura: Ágar glicose (Jones & Rutter, 1972), CFA (Evans et al., 1980), TSA e Mac Conkey. A seguir as mesmas foram invertidas e incubadas a 37°C, por 12-18 horas.

Preparo dos eritrócitos.

Sangue de boi, cobaia e coelho foram coletados sob condições de assepsia e homogeneizados com igual volume de solução de Alsever. As suspensões, assim obtidas foram, a seguir, distribuídas em tubos de ensaio previamente esterelizados e mantidos a 4°C.

As suspensões de eritrócitos, foram centrifugadas a 1400 g por 10 minutos (4°C), os sobrenadantes removidos por aspiração e então ressuspendidos em solução fisiológica (v/v), foram novamente centrifugadas a 1400 g (4°C, 10 minutos),. A seguir , os eritrócitos foram resuspendidos em tampão fosfato pH 7,2, homogeneizados e centrifugados a 1400 g (4°C, 10 minutos).

Para o teste de hemaglutinação em lâmina foi preparado uma solução a 10% de "papa"de hemácias em tampão fosfato pH 7,2. Às suspensões de eritrócitos de cobaia, adicionou-se D-manose para uma concentração final de 1%.

Teste de Hemaglutinação em lâminas.

Um pequeno raspado do crescimento bacteriano, obtido a partir de placas incubadas a 37°C em meios de culturas (AG, CFA, TSA, Mac.Conkey.), foi homogeneizado em 20µl de tampão fosfato pH 7,2 com 1% de D-manose, sobre uma placa de vidro colocada sobre o gelo. Usada como controle para a verificação da presença de fimbrias do tipo-1, o mesmo procedimento foi efetuado com eritrócitos de cobaio preparados com tampão fosfato pH 7,2 sem manose.

Sobre uma lâmina de vidro, foram adicionados suspensões bacterianas em 20 μ l de suspensão de hemácias em tampão fosfato pH 7,2 e homogeneizados suavemente,. Os resultados foram observados até 2 minutos após a homogeneização das suspensões.

4.2.3. Avaliação de resistência a drogas anti-microbianas.

O volume de 100 μ l de um pré inóculo das amostras bacterianas em meio LB, incubadas a 37 $^{\circ}$ C por 12-18 horas, foram inoculados em placas de Petri com meio LA contendo antimicrobianos nas concentrações determinadas por Fantinatti et al., (1994). Com auxílio da alça de Drigalsk, as suspensões foram espalhadas na superfície do meio que apresentava-se gelificado. As placas foram então invertidas e incubadas a 37 $^{\circ}$ por 18 horas. Os resultados foram então apreciados após este período de tempo.

4.2.4 Teste de produção de colicina

As amostras bacterianas foram crescidas em meio BHI por 18 horas a 37 $^{\circ}$ C, inoculadas em meio BHI-ágar e crescida por 18 horas a 37 $^{\circ}$ C.

Inoculou-se a indicadora universal de colicina (22R80) em meio LB, e esta foi crescida por 18 horas a 37 $^{\circ}$ C. A seguir, colocaram-se 3ml de clorofórmio nas tampas das placas invertidas das amostras a serem testadas, para matar as bactérias, por 30 minutos à temperatura ambiente. As placas foram secas semi-abertas à temperatura ambiente por 30 minutos e, a 37 $^{\circ}$ C por mais 30 minutos.

Foram inoculados 100µl da bactéria indicadora em 4ml de meio BHI-ágar semi-sólido fundido a 50°C, e este foi vertido sobre a placa das amostras a serem testadas e, os mesmos, incubados por 18 horas a 37°C. O resultado foi considerado positivo quando houve a formação de placa de lise (halo ao redor da colônia), e negativo quando não houve a formação da placa.

4.2.5. Transferência de DNA plasmidial por conjugação.

Conjugação F3 x MS101.

A amostra bacteriana de *Escherichia coli* F3 que apresentava marcas de resistência aos antimicrobianos ampicilina (Ap), estreptomicina (Sm), tetraciclina (Tc) cloranfenicol (Cm) e MS101 com marca de resistência ao antimicrobiano ácido-nalidixico (An), foram inoculadas em 3 ml de meio LB e incubadas a 37°C por 18 horas em presença dos antimicrobianos para os quais as mesmas eram resistentes. Uma diluição de 1:20 da amostra doadora foi transferida para um tubo contendo 3 ml de meio LB e acrescidos dos antibióticos Ap, Sm, Tc, e Cm e esta incubada a 37°C até a fase exponencial de crescimento. Após este procedimento, 100 µl da amostra doadora e 300µl da amostra receptora foram centrifugados a 12000 g por 2 minutos e os sedimentos lavados com meio de cultura LB para a completa retirada dos antimicrobianos. A seguir, os sedimentos foram ressuspensos delicadamente em 100µl de meio de cultura LB e esta suspensão depositada sobre uma membrana de filtro (0.2 µm) e incubada a 37°C por 18 horas. O crescimento bacteriano sobre o filtro foi então ressuspendido em 1 ml de solução salina 0,85% previamente

esterilizada. Esta suspensão foi, então, diluída até 10^{-3} e as diluições foram semeadas em placas contendo meio LA com os antibióticos apropriados.

Como controle as amostras parentais foram semeadas e repicadas nos meios LA com antibióticos para verificar a ocorrência de mutantes resistentes naturais.

Mutação com Transposon Tnpho A

A mutagênese com transposon TnphoA (Bouquet et al., 1987), usando plasmídeo pRT733, foi realizada conforme descrito por Taylor et al. (1989).

A amostra Sm10 λ pir possui o plasmídeo pRT733 (Ap^r e Km^r) que possui o transposon Tnpho A (Km^r). Este transposon, possui o gene para fosfatase alcalina. Quando há inserção deste transposon “in frame” no gene de uma proteína do espaço periplasmático ou da membrana externa, de forma que o gene para a fosfatase alcalina se insira, a fosfatase alcalina é expressada para formar uma proteína híbrida com a proteína do espaço periplasmático ou da membrana externa e reagiu com o substrato BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato), também denominado XP, quando este está presente no meio de cultura, originam colônias azuis.

O plasmídeo pRT733 replica-se somente em linhagens que produzem a proteína λ , como por exemplo a amostra de *Escherichia coli* SM10 λ pir. Logo, quando este é transferido para outra amostra, que não produz a proteína λ , este não se replica, funcionando assim como um plasmídeo suicida.

A amostra bacteriana F3 foi crescida em meio de cultura LB por 18 horas a 37°C e a amostra bacteriana SM10 λ pir (pRT733) foi crescida em meio LB adicionando os antibióticos Ap e Km por 18 horas a 37°C. Realizou-se a conjugação conforme metodologia descrita anteriormente porém, após a ressuspensão de ambas as amostras em 100 μ l de meio LB, estas foram inoculadas em um filtro de conjugação colocado sobre placa com meio LA e incubadas por 18 horas a 37°C. Após este período de tempo, os filtros foram mergulhados em um tubo de ensaio contendo 1 ml de meio e este foi agitado suavemente para a ressuspensão das bactérias.

Os mutantes foram selecionados em placas contendo meio LA com 40 μ g/ml de XP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) e o antimicrobiano, canamicina (Km), 50 μ g/ml. Após o período de incubação (18 horas) a 37°C, as colônias azuis obtidas foram estriadas em placas contendo meio LA com XP, Km e incubadas por 18 horas 37°C. As colônias azuis isoladas, indicando a produção de fosfatase alcalina, foram estocadas para posterior análise dos perfis eletroforéticos de proteínas de membrana e para experimentos biológicos do teste de patogenicidade em pintos de um dia de idade, testes de adesão in vitro em anéis de traquéia de pintos, resistência sérica e produção de colicinas.

4.2.6. Extração de DNA plasmidial.

Para a extração rápida do DNA plasmidial foi usado a técnica de lise alcalina de Birboin & Doly (1979), com modificações (Sambrook et al., 1989)

Amostras bacterianas transconjugantes foram pré-crescidas em meio LB por 18 horas a 37°C. Após o período de incubação, 1.0ml das suspensões bacterianas foram transferidas para tubos de microcentrífuga previamente identificados e submetidas a centrifugação a 12000 g por 2 minutos em microcentrífuga. O sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspendido em 100µl de solução I (Tris HCl 25mM pH8.0; EDTA 10mM). Os tubos foram homogeneizados vagarosamente por inversão, mantidos em repouso por 5 minutos no gelo e 200µl de solução II (NaOH 0.2N; SDS 1%) foram adicionados, e homogeneizando-se por inversão. A suspensão clara e viscosa foi mantida em gelo por 3 minutos e após este período, foram adicionados 150µl da solução III (acetato de sódio 3M pH 4.8). Os tubos foram invertidos por alguns segundos e mantidos em repouso no gelo por 15 minutos para a precipitação de proteínas, RNA de alto peso molecular e DNA cromossômico. A preparação foi centrifugada a 12000 g por 6 minutos e 400µl de sobrenadante transferidos para tubos novos de microcentrífugas onde 1.0ml (2,5 vol.) de etanol absoluto gelado foi acrescentado para a precipitação do DNA plasmidial. Os tubos foram invertidos e mantidos a -20°C por 60 minutos e então centrifugados a 12000 g por 6 minutos.

Os sobrenadantes foram retirados e os sedimentos, após a secagem, ressuspendidos em 40µl de TE (Tris HCl 10mM pH 8.0, EDTA

1mM), gelado e mantidos a -20°C . Para análise do perfil de DNA plasmidial por eletroforese em gel de agarose, transferiram-se para tubos de microcentrífuga novos previamente identificados, 10 ou 15 μl de DNA e adicionaram-se 5 μl de solução de ressuspensão 6x (Ficol 400 15%; azul de bromofenol 0.25%, xileno cianol FF 0.25%; RNase A 0.1mg/ml), que foi homogeneizado com pipeta automática e aplicado no gel.

4.2.7. Eletroforese de DNA plasmidial em gel de agarose.

O método de eletroforese de DNA plasmidial em gel de agarose foi realizado conforme descrito por Sambrook et al. (1989).

A agarose em concentração pré determinada foi dissolvida em tampão TBE 1x (Tris-borato 0,09M, EDTA 2mM) sob aquecimento, resfriada a aproximadamente 60° e vertida cuidadosamente sobre uma placa de vidro mantida em posição horizontal.. Em uma das extremidades (aproximadamente 2 cm da borda) foi colocado um pente de acrílico com doze dentes, medindo 6.0 x 15 x 2.5 mm a uma distância de 1.5 mm da borda superior da placa de vidro. Após gelificação, retirou-se cuidadosamente o pente do gel e o conjunto placa gel foi submerso em tampão TEB em cuba de acrílico para eletroforese horizontal. As amostras foram então aplicadas nos poços com o auxílio de pipetas automáticas.

Como pré-corrída, aplicou-se inicialmente uma corrente elétrica de 10 a 15 mA até que as amostras dos poços penetrassem no gel. Em seguida foi aplicada uma tensão de $5\text{V}/\text{cm}^2$ até o final da corrida. Após o término da corrida, o gel foi transferido para uma cuba contendo solução

de brometo de etídio (5 μ g/ml) por 20 minutos à temperatura ambiente, ou por 16 horas a 4 $^{\circ}$ C e visualizado em transluminador de luz ultravioleta de ondas curtas. A revelação e ampliação seguiram especificações do fabricante (Eastman Kodak).

4.2.8. Extração de proteínas de membrana.

A extração de proteínas de membrana seguiu a metodologia descrita por Benedetti (1991) com algumas modificações.

A linhagem de *Escherichia coli* e seus tranconjugantes foram semeadas em quatro placas de Petri contendo meio CFA, por 24 horas a 37 $^{\circ}$. O crescimento bacteriano foi raspado e ressuspenso em tampão Tris 3,3mM, pH 7,4.

As suspensões bacterianas foram homogeneizadas em omnimixer (Sorvall) por 2 minutos, a velocidade 4, sob condições de resfriamento constante. Posteriormente foram centrifugadas a 8000 xg por 5 minutos a 8 $^{\circ}$ C. Descartou-se os sobrenadantes e os sedimentos foram ressuspensos em solução salina 3%.

Após o ciclo de centrifugações a 8000 g por 5 minutos e a 8 $^{\circ}$ C, sempre descartando os sobrenadantes, os sedimentos foram ressuspensos em solução tampão Tris 0,1M + EDTA 10mM, pH7,4. O ciclo de centrifugações foi repetido e a ressuspensão dos sedimentos feita em solução tampão Tris 0,1M + MgCl₂. 10mM, pH 7,4. O homogenato foi centrifugado novamente a 8000 g por 5 minutos a 8 $^{\circ}$, e o sobrenadante descartado.

Após a ressuspensão dos precipitados em solução tampão Tris 0,1M, pH 7,4 + sacarose 0,75M, os homogenatos foram sonicados por 12 ciclos de 20 Khz, 70 a 90 W, por 40 segundos cada, em banho de gelo.

Centrifugou-se a 8000 g por 5 minutos a 8°C e transferiu-se o sobrenadante para tubos apropriados para ultracentrifugação. A ultracentrifugação foi realizada a 37000 r.p.m. por 30 minutos a 4°C. Descartou-se, então, o sobrenadante e o sedimento foi ressuspendido em solução tampão Tris 3.3mM, pH 7,4. Repetiu-se novamente a ultracentrifugação, sob as mesmas condições da primeira, descartando-se posteriormente o sobrenadante.

O sedimento contendo proteínas de membranas bacterianas foi ressuspendido em solução tampão Tris 63 mM, pH 6,8 + Triton X-100 2% (v/v), com a finalidade de solubilizar as proteínas de membranas. Transferiram-se as suspensões para tubos de microcentrífuga e posteriormente agitou-se por inversão durante 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se o homogenato a 12000 g por 3 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi então coletado e transferido para tubos de microcentrífugas devidamente identificados, adicionando-se também volumes iguais de solução tampão dissociante da amostra. Colocaram-se os tubos de microcentrífugas em banho fervente por 4 minutos para que ocorra uma completa denaturação de todas as proteínas presentes no homogenato. Após o resfriamento dos tubos, estes foram estocados em freezer à temperatura de -20°C.

Eletroforese de proteínas de membranas

Realizou-se eletroforese das proteínas de membranas das amostras bacterianas, no sistema descontínuo dissociante (Laemmli 1970) SDS-PAGE em placa vertical utilizando equipamento de eletroforese da Hoefer. A montagem dos géis seguiu a metodologia descrita no Hoefer Electrophoresis Catalog and Exercises (1990-1991).

Após a montagem do gel de separação (12,5%) e do gel de empacotamento (4%), 15 µl das amostras de proteínas foram aplicadas com seringas Hamilton de 50µl.

Os géis foram montados na cuba de eletroforese e submersos em tampão tris glicina. A corrida eletroforética consistiu de uma pré-corrida sob tensão de 100V até a entrada das amostras no gel de separação, e de 150V, até que o azul de bromofenol atingisse o final do gel de separação.

Coloração dos geis SDS - PAGE com prata

A coloração das proteínas seguiu a metodologia descrita por Blum et al.(1987), com modificações. A sequência dos passos para a coloração encontra-se no quadro abaixo (Quadro VI).

Quadro VI Passos da coloração de prata em gel SDS-PAGE

Soluções	Tempo de tratamento
Fixador	60 minutos
Etanol 50%	3 x 20 minutos
Solução de pré tratamento	1 minuto
Água destilada	3 x 20 segundos
Solução de impregnação	20 minutos
Água destilada	2 x 20 segundos
Solução reveladora	10 minutos
Água destilada	2 x 2 minutos
Solução de Bloqueio	10 minutos
Metanol 50%	20 minutos mínimo

Depois de corado, o gel foi transferido para uma cuba contendo a solução de preservação I, por 30 minutos, e na solução de preservação II por mais 30 minutos.

Os géis foram plastificados com papel celofane e submetidos à secagem por 3-5 dias à temperatura ambiente.

4.2.9. Adesão no epitélio da traquéia de aves.

Preparo dos anéis de traquéia.

Utilizaram-se, nesse experimento, pintos de 15 a 20 dias de idade, livres de agentes patógenos específicos (SPF), fornecidos pela firma Salsbury Ltda.

Após o sacrifício das aves, por deslocamento cervical, foi retirada a traquéia e esta colocada em uma placa de petri contendo tampão PBS 0,1M, pH 7,4. Lavou-se o material por mais 3 vezes com o mesmo tampão para retirar o excesso de muco. A traquéia foi cortada em segmentos de aproximadamente 5mm. Os anéis foram colocados em microplacas contendo 25 μ l de meio mínimo Eagle (MEM), com 5% de soro fetal bovino. O mesmo experimento também foi realizado em presença de 1% de D-manose.

Preparo das amostras bacterianas.

Um volume de 100 μ l de pré-inóculo de bactérias em 3 ml de meio de cultura LB, incubadas por 18 horas a 37°C, foi plaqueado em placas contendo meio Minca e estas incubadas por 18 horas a 37°C. Coletaram-se as colônias bacterianas através de raspagem de crescimento bacteriano da superfície do meio de cultura e as mesmas foram ressuspendidas em tampão PBS 0,1M pH 7,4, previamente esterilizado. O número de células bacterianas foi padronizado, usando-se como padrão a escala de Mac-Farland.

Teste de Adesão.

Adicionaram-se 50 μ l de suspensão bacteriana (10^{10} células/ml) em cada orifício da microplaca contendo cortes de anéis de traquéia.

Em seguida, o conjunto traquéia/bactéria, foi homogeneizado levemente e incubados por 6 horas a 37°C. Após esse período foram feitas observações dos anéis em microscopia de inversão para verificar a presença de batimentos ciliares.

Histopatologia.

Para a obtenção dos cortes histológicos, os anéis de traquéia foram fixados em formol tamponado (PBS 0,1M - Formalina 10%) por um período de 24 horas. As peças fixadas foram desidratadas na série: álcool 70%, álcool 80%, álcool 90%, álcool 95%, álcool 100%, álcool-xilol (v/v), xilol-I e xilol-II; todos esses passos foram realizados no tempo de 30 minutos cada. No passo seguinte à diafanização, os cortes foram submetidos a 3 banhos de parafina com temperatura constante de 65°C por um período de tempo de 30 minutos cada incluídos em parafina derretida e, posteriormente, colocada sobre superfície fria para o endurecimento da parafina, formando-se então os blocos. Cortes de 5 μ m de espessura foram obtidos com o auxílio de micrótomo (Zeiss). As preparações foram coradas com Giemsa (Trabulsi et al., 1974)

Montagem das Lâminas Histológicas

A montagem das lâminas procedeu-se com a fixação dos cortes dos anéis da traquéia na superfície das lâminas histológicas, previamente untada com albumina bovina e devidamente identificadas. Após a secagem do material à temperatura ambiente, este passou por um processo de fixação seguindo os passos, Xilol-I, Xilol-II, Xilol- álcool (v/v), Álcool 100%, Álcool 95%, Álcool 90%, Álcool 80%, Álcool 70%, por 15 minutos, cada passo. Em seguida as lâminas foram lavadas por 1 minuto em água corrente e coradas com Giensa 10% por 20 minutos. As lâminas foram lavadas, novamente, em água corrente para se retirar o excesso de corante e colocadas para secar por 18 horas. Após esse período, as lâminas foram colocadas por 10 minutos, no mínimo, em uma cuba contendo Xilol, e então sobre o campo onde se encontravam os cortes adicionou-se uma gota de Bálsamo do Canadá e, em seguida, uma lamínula de vidro. As lâminas foram secas à temperatura ambiente e posteriormente observadas em microscopia óptica no aumento 400x - C 1000x (imersão).

4.2.10. Avaliação da patogenicidade.

Amostras bacterianas: F3, MS101, Col 6, Col 8, Col 10, Col 15, Col 17, Col 18, XP 1, XP 2, XP 3, XP 4, XP 5, XP 6, XP 7, XP 8, foram cultivadas em meio LB a 37°C por 18 horas e, 100µl desse extrato foram adicionados em frascos erlenmeyers com 10ml de LB. Essas bactérias foram incubadas por 4 horas sob agitação constante a 150 rpm a 37°C.

Após esse período, realizaram-se diluições de 10^{-1} até 10^{-7} dessa cultura bacteriana em salina 0,85% esterilizada.

Foram formados grupos de cinco pintos de um dia de idade para cada amostra. Foram inoculados, por via subcutânea, 0,5 ml de extratos bacterianos das respectivas diluições, devidamente identificados. As aves ficaram sob observação por um período de 7 dias e, após esse período, calculou-se a DL_{50} .

4.2.11. Avaliação da resistência sérica.

a). Coleta de soro das aves

O soro foi coletado sob condições assépticas, de frangos jovens SPF através da veia axial da asa. O sangue coletado foi depositado em frascos estéreis de penicilina e colocados inclinados por 5 horas. Após a formação do coágulo e retração do mesmo, o soro foi coletado por aspiração e transferido para outros frascos de penicilina previamente limpos, esterilizados e estocados a -20°C (Vidotto et al., 1990).

b). Teste de resistência sérica

Inicialmente as amostras de *E. coli* foram cultivadas em meio de cultura LB por 18 horas a 37°C . Após esse período, transferiu-se 1ml do cultivo bacteriano para os tubos de ensaios contendo 3,0 ml de caldo peptona glicose 1%. Esta cultura foi incubada a 37°C por 3 horas, até atingir o início da fase exponencial de crescimento (aproximadamente 3 horas) onde o número de bactérias é equivalente a 10^3 - 10^4 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml) quando comparadas com a escala Mc Farland (Otto, 1990).

Adicionaram-se 125µl do caldo bacteriano de cada amostra em tubos de microcentrífuga contendo 500µl de soro de galinha e, estes foram mantidos sob temperatura constante de 37°C. Foram feitas diluições 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵ em NaCl 0,85% e, o plaqueamento, feito nos períodos; instantâneo (imediatamente após o contato das bactérias com o soro de galinha) e 1, 2 e 3 horas em placas contendo meio LA. As placas foram invertidas e incubadas por 18 horas a 37°C. A capacidade de resistir à ação bactericida do soro foi medida pela contagem do número de colônias que cresceram nas placas comparando com o controle que não continha soro.

4.2.12. Determinação da DL₅₀

A partir de um pré inóculo das amostras bacterianas crescidas em meio LB, 37°C por 18 horas, foram feitas diluições em NaCl 0,85% estéril a partir de 10⁻¹ até 10⁻⁷, em seguida foram feitas inoculações (via subcutânea) em pintos de um dia de idade, e também foram feitos plaqueamento dessas amostras com auxílio da alça de Drigalsck, em placas contendo meio LA, sendo essas incubadas a 37°C por 18 horas. As colônias foram contadas e juntamente com o índice de mortalidade das aves no período do experimento, calculou-se a DL₅₀, conforme descrito por Reed & Muench., (1938).

4.2.13. Determinação da curva de crescimento

A partir de um pré inóculo das amostras bacterianas F3, XP2, XP4, em meio LB, crescidos a 37°C por 18 horas, foi feita uma diluição

de 1:10⁵ em 100 ml do mesmo meio. Esta cultura foi incubada a 37°C sob agitação constante a 150 r.p.m. a 37°C. Foram feitas amostragens de 100 µl desse material a cada 60 minutos e por um período de 4 horas. Diluições seriais (10⁻¹ até 10⁻⁹) foram feitas em salina esterilizada 0,85% e plaqueadas em placas contendo meio LA. As placas foram invertidas e incubadas a 37°C por 18 horas. Em seguida foi feito a contagem das colônias que cresceram nas placas e a unidade formadora de colônia CFU foi determinada.

4.2.14 Método para lisar células bacterianas para extração de lipopolissacarides (LPS) para gel SDS-PAGE

O método de extração de LPS seguiu a metodologia descrita por Hitchcock & Brown, 1983)

Bactérias crescidas em meio LA por 12-18 horas, raspadas e diluídas em água até uma turbidez de aproximadamente 200 K_ltt units ou absorvância de 0,400 a 420 nm.

1,5 ml da amostra foi centrifugada por 1,5 minutos em microcentrifuga (e. g. Eppendorf).

O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi dissolvido em 50µl de tampão de lise, este foi homogeneizado e colocado em banho 100^o por 10 minutos.

Após o resfriamento do material, foi adicionado 10µl de solução de proteínas K (2,5 mg/ml) e colocar em banho à 60^o C por 60 minutos.

O procedimento para fazer eletroforese SDS-PAGE 12,5% segue o método de (Laemmli 1970).

Método de coloração com prata nos géis SDS-PAGE para avaliar extração de LPS segue as especificações de (Tsai & Frasch, 1982).

A sequência dos passos para a coloração encontram-se no quadro abaixo, (Quadro VII).

Quadro VII Passos da coloração de prata em gel SDS-PAGE para proteínas lipopólissacardes LPS.

Solução Fixadora	24 horas
Solução de Oxidação	5 minutos
H ₂ O destilada (3 vezes)	10 minutos
Solução de Prata	5 minutos
H ₂ O destilada (3 vezes)	5 minutos
Solução de coloração	10 minutos
H ₂ O destilada	10 minutos
Solução de formaldeído	até visualizar bandas
H ₂ O corrente	rapidamente várias vezes

Após a coloração do gel, este foi colocado em solução álcool 30% para sua conservação e em seguida foi fotografado em filme KODAK PLUS.

Os géis foram plastificados com papel celofane e submetido à secagem por 3-5 dias à temperatura ambiente.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desde que o homem passou a criar aves em escala industrial com fins econômicos, as infecções do trato respiratório constituem a principal causa de perdas por doenças respiratórias em todo o mundo. Não está claro ainda, como as bactérias de origem aviária, causadoras de septicemia, penetram no organismo das aves. Parece que estas bactérias usam essencialmente o trato respiratório. Há duas hipóteses para essa observação: (1) a infecção bacteriana é do tipo secundária, isto é, ocorre logo após uma infecção respiratória causada por outros agentes (vírus ou micoplasmas) que debilitam o sistema imune das aves facilitando, assim, a colonização bacteriana (Harry & Hensley, 1965); (2) ao longo da traquéia, podem ocorrer pequenas cavidades o que ocasiona descontinuidade do epitélio ciliar facilitando a colonização bacteriana, (Ramphal et al., 1984).

A linhagem de *Escherichia coli*, aqui denominada F3, foi isolada do fígado de uma galinha apresentando sinais clínicos de colisepticemia.

Após o seu isolamento, a determinação da LD 50% (Reed & Muench, 1938) mostrou que esta linhagem é patogênica a uma concentração de $3,7 \times 10^2$ bactérias/ml. Este resultado foi determinado através da inoculação via subcutânea em pintos de um dia de idade (Tabela V). Esta concentração caracteriza esta linhagem bacteriana como sendo altamente patogênica, quando comparada com outras amostras já determinadas, (Fantinatti et al., 1994).

A existência de poucos trabalhos descritos na literatura correlacionando a capacidade de patogenicidade com características fenotípicas e genotípicas, como por exemplo, presença de plasmídios,

resistência sérica, resistência à antimicrobianos, produção de toxinas para cultura celular “in vitro”, produção de colicinas, hemaglutinação em eritrócitos de animais de diferentes espécies, adesão a células de traquéia e perfil de proteínas de membrana (Vidotto et al., 1991; Nolan et al., 1992; Wooley et al., 1992; 1994; Fantinatti et al., 1994; Silveira et al., 1994), levou-nos a procurar esta linhagem bacteriana e correlacionar a sua patogenicidade com as características descritas acima.

A caracterização desta amostra demonstrou que a mesma apresenta resistência aos diferentes antimicrobianos: ampicilina (Ap), cloranfenicol (Cm), streptomina (Sm) e tetraciclina (Tc), (Tabela I).

As linhagens de *Escherichia coli* patogênicas para animais apresentam a capacidade de sintetizar tipos de bacteriocinas (colicinas) (Reeves, 1972), com a finalidade de impedir o crescimento de outras linhagens bacterianas no nicho onde se encontram (Dho & Lafont, 1984). O teste para a produção de colicina indica que a linhagem F3 selvagem, produz colicina, (Tabela III), estes resultados estão de conformidade com os de Fantinatti et al. (1994), que determinou que esta linhagem produz colicinas do tipo E1 e E3.

A capacidade hemaglutinante da amostra F3 pôde ser verificada através do teste de hemaglutinação com eritrócitos de diferentes animais. Esta linhagem, hemaglutinou eritrócitos de boi, quando crescidas nos meios de cultura (AG, TSA e CFA), e é manose sensível, indicando a presença de fímbrias do tipo 1 (Tabela II), sua superfície, aglutinando hemácias de cobaia na ausência do açúcar D-manose e não aglutinando na presença deste mesmo açúcar.

O teste “in vitro” de adesão em anéis de traquéia de pintos S.P.F. de 15-20 dias de idade, mostrou a capacidade de adesão da

bactéria F3 nas células do tecido traqueal das aves (Figuras 3 e 4), mesmo quando foi adicionado ao meio, D-manose, indicando assim ou a presença de um outro tipo de adesina na superfície bacteriana ou adesão ao muco que ainda poderia estar presente mesmo após a lavagem dos anéis de traquéia.

Após determinação do perfil eletroforetico do DNA plasmidial em gel de agarose 0,7% da bactéria F3, observamos que esta linhagem bacteriana apresenta 7 plasmídios de peso moleculares: 95, 69, 62, 52, 42, 6 e 5MD, (Figura 1). O sobrenadante da cultura bacteriana, não mostrou atividade biológica em células "Vero".

A produção de colicinas do tipo-V, tem sido associado à patogenicidade em amostras de *Escherichia coli* septicêmicas (Smith, 1974), mas o fator determinante de patogenicidade é a presença do plasmídio col-V, que é conjugativo e, muitas vezes, pode possuir genes responsáveis pela produção de aerobactina através do sistema de captação de ferro (Willians, 1979) e genes responsáveis pela codificação da proteína TraT da membrana externa relacionada a capacidade de resistência ao soro (Binns et al., 1979).

O ferro é um elemento essencial no metabolismo bacteriano proporcionando a multiplicação no hospedeiro. A limitação deste íon no organismo do hospedeiro é considerado um dos mecanismos de defesa contra as infecções bacterianas uma vez que o ferro encontra-se associados às proteínas (transferrinas), presentes no sangue e flúidos linfáticos. Assim, a não disponibilidade de ferro para a bactéria dificulta a sua multiplicação (Bullen et al., 1978; Weinberg, 1984).

Willians (1979) observou que o plasmídio que codificava a produção de colicina-V, carregava informações para sintetizar um composto denominado sideróforo. Este composto químico inorgânico,

de baixo peso molecular, é classificado quimicamente em dois grupos: fenolatos (enteroquelina), cujo genes estão associados ao plasmídio col-V ou nos cromossomos (Willians & Roberts, 1989), enquanto que os genes que codificam a expressão da aerobactina estão associados a plasmídios.

As amostras de *Escherichia coli* são resistentes aos soro devido à presença de componentes de superfície, proteínas de membrana externa e antígeno capsular os quais parecem inibir a ativação ou função do complemento (Taylor, 1976). A proteína de membrana externa, proteína TraT de plasmídios conjugativos e a produção de aerobactina aumentando a capacidade invasiva deste tipos bacterianos (Binns et al., 1982).

Com a finalidade de verificarmos se a patogenicidade era devida a presença de plasmídios conjugativos, realizamos a conjugação entre a amostra F3 e uma linhagem não patogênica MS101. Após a análise da resistência a antimicrobianos dos transconjugantes obtidos, (19 colônias designadas col1 a col19), aqueles que foram diferentes entre si quanto à resistência aos diferentes antimicrobianos foram analisados, (Tabela I).

Quatro transconjugantes (col2, col6, col8 e col14), foram testados quanto à resistência sérica (Figura 7) e, destes, as col6 e col14 foram resistentes à ação bactericida do soro.

A análise do perfil plasmidial (Figura 2) destes dois transconjugantes, mostrou a transferência, no primeiro caso, de todos os plasmídios presentes na amostra F3 e no segundo, dos plasmídios (95, 69, 62, 52, 42MD) (Figura 2). Estes resultados indicam que um destes plasmídios pode ser responsável pela resistência sérica, visto que a linhagem MS101 é sensível ao soro (Figura 6), não conseguimos contudo determinar qual é o plasmídio responsável por esta

característica.. Estes resultados concordam com os de Achatman et al. (1977), que indicam que a presença da proteína TraT, presente em plasmídios conjugativos, é a responsável pela resistência sérica.

O experimento de adesão em células epiteliais de traquéia indicou que, à semelhança da amostra F3, todos os transconjugantes obtidos e mesmo a receptora MS101, tinham a capacidade de adesão. Estes resultados portanto, não relaciona à patogenicidade em nosso experimento.

Quando testados em pintos de um dia de idade para a determinação de patogenicidade por meio da DL 50% verificamos que nenhum transconjugante tornou-se patogênico (Tabela IX). Isto indica que a simples transferência de plasmídios não é suficiente para tornar a linhagem patogênica como descrito por Smith, 1974.

Observou-se alta resistência à ação bactericida do soro de dois transconjugantes, Col2 e Col4, (Figura 5), apesar destes transconjugantes apresentarem sua patogenicidade diminuída, (TabelaV).

A presença de fimbrias do tipo-1 na superfície bacteriana de bactérias septicêmicas para as aves tem sido correlacionada à patogenicidade (Dozois et al.'1994)

Como a bactéria MS101, utilizada neste experimento, também expressa este tipo de fímbria, a transferência de plasmídios para a mesma não a tornariam patogênica (Tabela III). Estes resultados indicaram que outros possíveis mecanismos de patogenicidade poderiam estar presentes nesta linhagem.

Tendo em vista que a simples transferência de plasmídeo não levou à transferência concomitante de patogenicidade, decidimos então, com o auxílio do transposon TnphoA, presente no plasmídeo

suicida pRT733 (Taylor et al., 1989), mutagenizar a linhagem F3 selvagem e analisar os transconjugantes obtidos mutados.

Este transposon (TnphoA), tem como característica a construção de um gene híbrido entre os genes de resistência à canamicina e a extremidade carboxi-terminal da enzima fosfatase alcalina (Boket et al., 1987), quando há inserção deste transposon em qualquer gene cujo produto final se expresse ou no espaço periplasmático ou na membrana bacteriana, permitido que em condições, sob condições apropriadas de seleção, meio contendo canamicina e o substrato BICP (5-bromo 4-Cloro 3-Indolil Fosfato), as colônias azuis e resistentes à canamicina sejam selecionadas. Estes mutantes representam colônias cujos produtos de expressão gênica e localização como descrita anteriormente, sejam selecionados diretamente entre todos os mutantes.

Apartir deste experimento obteve-se nove colônias azuis e canamicina resistente cujas características, comumente associadas à patogenicidade foram estudadas.

Assim após a determinação da LD50% em pintos de um dia de idade, como descrita por Reed & Muench (1938), tres das colônias (XP2, XP3 e XP4), tiveram a sua patogenicidade diminuída (Tabela V).

Estas tres colônias foram ensaiadas para a produção de colicina, expressão de fímbria do tipo-I em sua superfície, resistência sérica. Nenhuma apresentou-se alterada quando comparada com a linhagem selvagem, patogênica F3 (Tabelas III, IV; Figura 6).

Para se verificar se a diminuição da patogenicidade não poderia estar relacionada à mutagênese de proteínas de membrana e ou ao sistema de captação de ferro (Fantinatti et al., 1994; Nolan et al., 1994 e Silveira et al, 1994).

Analisou-se então a expressão deste tipo de proteína de membrana externa, em presença e ausência do íon ferro no meio de cultura, através de um gel de poliacrilamida (Figura 7). Verificou-se através do perfil eletroforético de proteínas de membrana que os mutantes XP2 e XP3 eram idênticos e diferentes de XP4. O mutante XP2 quando crescido em presença de ferro, não expressava as subunidades protéicas de: 127,72, 76; 59; 41; 38,52; 35,2; 27,27 e 14,69kDa, que estavam presentes na amostra selvagem F3. O mutante XP4, por sua vez, nas mesmas condições não expressou uma subunidade protéica de 47,72kDa. Amostras crescidas em meio contendo a droga alpha-alpha- dipiridil, que é um agente quelante do ferro, induziu a expressão de algumas subunidades protéicas de membrana nas amostras em estudo com os pesos moleculares de: 55,68, 35,72 e 27,27kDa. essas subunidades protéicas estão relacionadas com o sistema de captação do ferro, (Figura 7). Observamos no perfil plasmidial de F3, XP2 e XP4 não haver diferenças entre esses três tipos bacterianos, (Figura 9).

Como as amostras XP2 e XP3 foram mais patogênicas do que o transconjugante XP4 (Tabela V), resolveu-se então verificar a expressão de proteína de membrana externa poderia estar interferindo no crescimento bacteriano e conseqüentemente diminuindo a sua patogenicidade (Figura 8). Constatamos que o transconjugante XP2 teve um crescimento um pouco diferente quando comparado com o transconjugante XP4 e a linhagem selvagem F3, que por sua vez tiveram um crescimento idêntico.

Segundo Cross et al., (1988) e Timmis et al.,(1985) o fenótipo LPS pode contribuir com a resistência ao complemento e conseqüentemente pode estar envolvido com a virulência de algumas bactérias Gram-negativas.

A capsula K1 de *Escherichia coli* tem sido associada com a resistência ao complemento e virulência bacteriana (Timmis et al. 1981; Gennski et al., 1980; Agüero & Cabello, 1983; Pluschke et al., 1983; Agüero et al., 1989). Bactérias virulentas que são resistentes ao complemento e apresenta fenótipo LPS diferente ou parcialmente diferentes, frequentemente requer encapsulamento K1 para completa virulência (Gross et al., 1984; 1978).

Wooley et al., 1993 observou em seu trabalho que a resistência ao complemento e a virulência em *Escherichia coli* aviária, estão associadas com a presença de col-V, produção de lipolissacarídeo liso mas não com o antígeno K1 ou gene TraT.

Em nosso experimento, a análise da expressão de LPS na superfície da amostra bacteriana selvagem e mutantes, através de eletroforese em gel SDS-PAGE seguindo o método de Laemmli (1970), não mostrou alteração em qualquer dos perfis protéicos, (figura 10). Este fato, portanto não pode ser relacionado à diminuição de patogenicidade como descrito por Wooley et al. (1993).

Acredita-se, portanto, que a diminuição da patogenicidade pode ser devida à não expressão de diferentes subunidades protéicas (Taylor et al., 1989) e pode levar a uma diminuição da patogenicidade bacteriana.

Como nas amostras bacterianas transconjugantes XP2 e XP3 as subunidades que não se expressam são diferentes daquelas observadas na amostra XP4, sugere-se que duas proteínas regulatórias diferentes, associadas à patogenicidade, tenham sido mutagenizadas. Assim provavelmente, nas linhagens XP2 e XP3 além da diminuição da patogenicidade, ocorre uma alteração no crescimento bacteriano (proteínas associadas ao crescimento) enquanto que na

linhagem XP4 ocorreu uma mutação de uma proteína regulatória cujas proteínas associadas à patogenicidade mas não ao crescimento.

Acredita-se, por isso que as linhagens XP2, XP3 e XP4, apresentam mecanismos de patogenicidade ainda não descritos na literatura.

TABELA I - Resistência a antimicrobianos das amostras F3, MS101e seus respectivos transconjugantes.

Amostras Bacterianas	Antibióticos				
	An	Ap	Sm	Tc	Cm
Ms101	+	-	-	-	-
F3	-	+	+	+	+
Col 1	+	+	-	-	-
Col 2	+	+	-	-	-
Col 3	+	+	-	-	-
Col 4	+	+	-	-	-
Col 5	+	+	-	-	-
Col 6	+	+	+	-	-
Col 7	+	+	-	+	+
Col 8	+	+	-	-	+
Col 9	+	+	-	-	-
Col 10	+	+	-	-	+
Col 11	+	+	-	-	-
Col 12	+	+	-	-	-
Col 13	+	+	-	-	-
Col 14	+	+	+	-	-
Col 15	+	+	-	+	+
Col 16	+	+	-	-	+
Col 17	+	-	+	+	+
Col 18	+	+	+	+	+
Col 19	+	+	+	-	-

An - Ácido nalidixico
 Ap - Ampicilina
 Sm - Streptomicina
 Tc -Tetraciclina
 Cm - Cloranfenicol

Tabela II - Teste de Hemaglutinação das amostras F3 e MS101 frente a diferentes eritrócito.

Amostras bacterianas	Eritrócitos			
	Cobaia		Boi	Coelho
	Sem manose	Com manose		
F3	+	-	-	AG.TSA.CFA
MS101	+	-	-	-
ORN115	+	AG.CFA.TSA (*)	AG.TSA (*)	-
5677	+	CFA.TSA (*)	-	-
CFA I	-	-	-	-
CFA II	+	-	-	-
CFA III	-	-	-	-
B 41M	+	-	-	+
PMF 205	+	-	-	-
BH 101	-	-	-	-
B 41	+	-	-	-

(+) - amostras que cresceram em todos os meios de cultura

(-) - amostras que não cresceram nos meios de cultura

(*) - meios de culturas onde as amostras cresceram

TABELA III - Teste da produção da bacteriocina nos transconjugantes provenientes de F3 x MS101 e F3 x PRT733.

Amostras bacterianas	Produção de colicina
MS101	-
F3	+
Col 1	+
Col 2	+
Col 3	+
Col 4	+
Col 5	+
Col 6	+
Col 7	+
Col 8	-
Col 9	+
Col 10	-
Col 11	+
Col 12	+
Col 13	+
Col 14	+
Col 15	+
Col 16	+
Col 17	+
Col 18	+
Col 19	+
XP1	+
XP2	+
XP3	+
XP4	+
XP5	+
XP6	+
XP7	+
XP8	+

(+) - amostras que expressam colicina

(-) - amostras que não expressam colicina

TABELA IV Teste de hemaglutinação das amostras F3, MS101, transconjugantes da conjugação F3 x MS101 e transconjugantes da conjugação pRT733 x F3. Frente à hemácias de cobaia com e sem D-manose.

Amostras	Hemáceas de cobaia manose resistente	Hemácias de cobaia manose sensível
F3	-	+
MS101	-	+
col1	-	+
col2	-	+
col3	-	+
col4	-	+
col5	-	+
col6	-	+
col7	-	+
col8	-	+
col9	-	+
col10	-	+
col11	-	+
col12	-	+
col13	-	+
col14	-	+
col15	-	+
col16	-	+
col17	-	+
col18	-	+
col19	-	+
XP1	-	+
XP2	-	+
XP3	-	+
XP4	-	+
XP5	-	+
XP6	-	+
XP7	-	+
XP8	-	+

(-) Ausência de aglutinante

(+) Aglutinante positiva

TABELA-V Determinação da DL_{50} das amostras de *E.coli* de origem aviária, **MS101**, os transconjugantes da conjugação **F3 x MS101** e os tranconjugantes obtidos da conjugação **pRT733 x F3**.

Amostras Bacterianas	U.F.C.
F3	$<3.7 \times 10^2$
MS101	1.39×10^8
XP2	1.35×10^4
XP3	1.83×10^4
XP4	3.5×10^8
XP5	6.4×10^6
XP6	4.4×10^4
XP7	$<1.2 \times 10^4$
XP8	$<1.3 \times 10^3$
Col 6	7.5×10^{10}
Col 8	$>1.3 \times 10^{12}$
Col 10	1.1×10^{13}
Col 14	1.2×10^{10}
Col 15	2.3×10^{11}
Col 17	5.5×10^{10}
Col 18	1.6×10^{12}

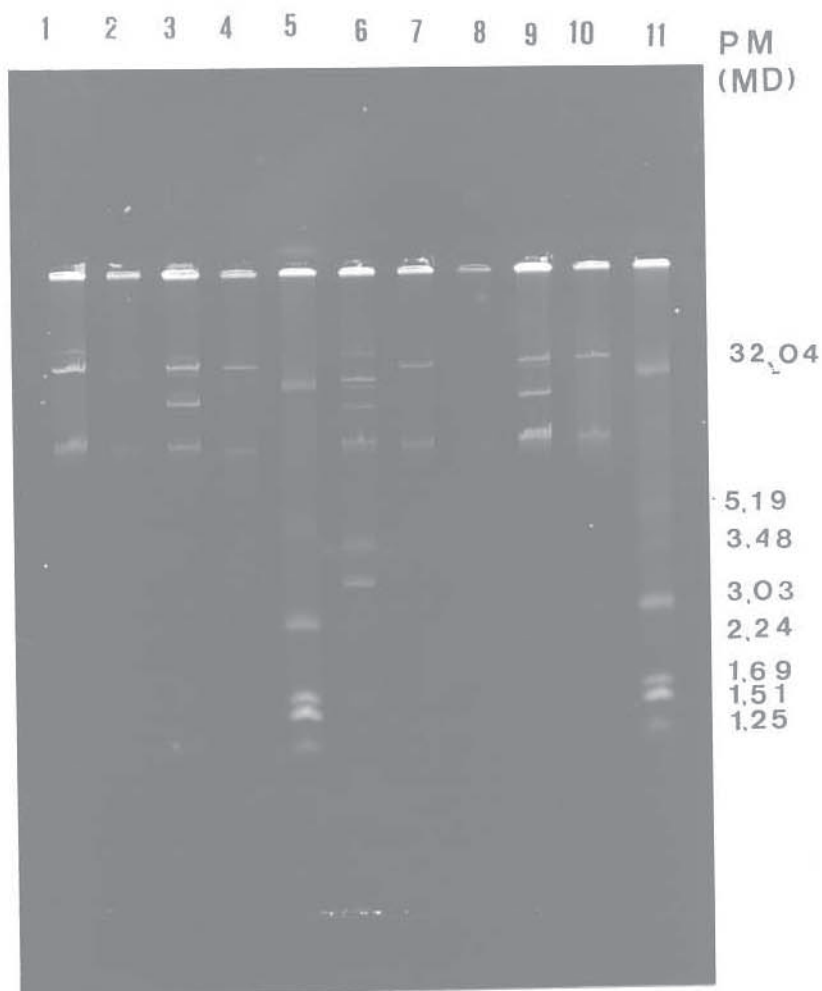


Figura 1. Perfil plasmidial em gel de agarose 0,7% da amostra selvagem F3 e amostras controles Pr40a, PrA1, PR1, P307 e V517

- 1-Amostra J53-1 (pR40a)
- 2-Amostra J53 (pRA1)
- 3-Amostra J53 (pR1)
- 4-Amostra HB101 (P307)
- 5-Amostra V517
- 6-Linhagem selvagem F3
- 7-Amostra J53-1 (pR40a)
- 8-Amostra J53 (pRA1)
- 9-Amostra J53 (pR1)
- 10-Amostra HB101 (P307)
- 11-Amostra -V517

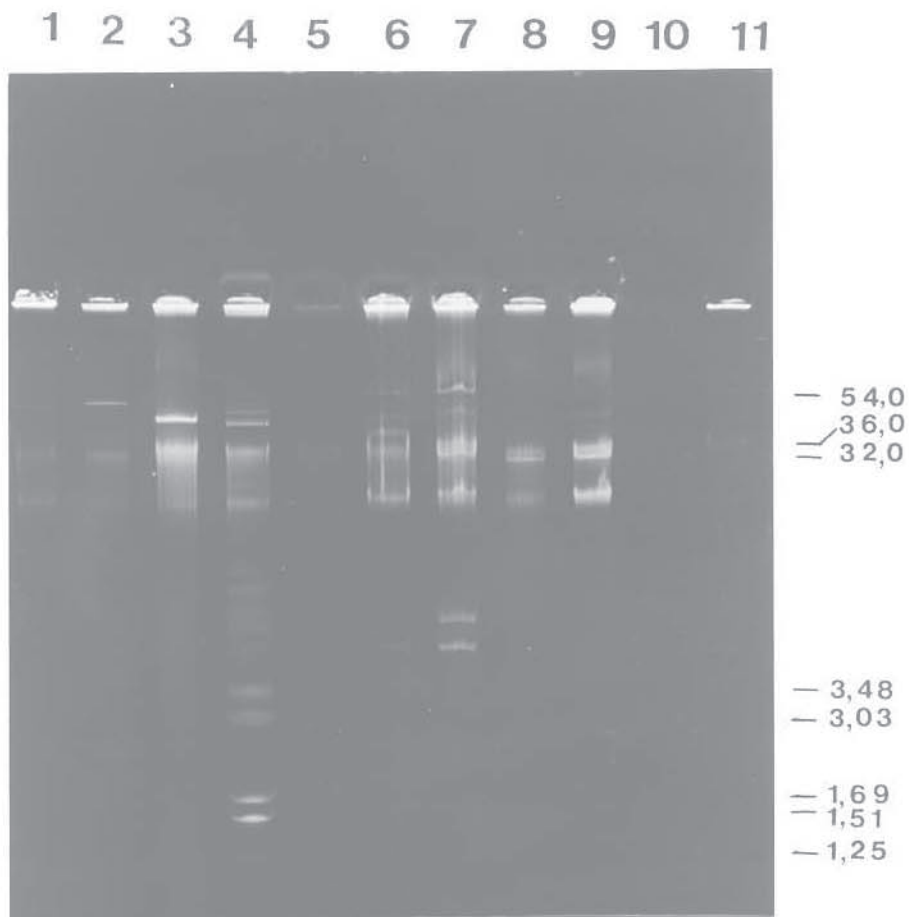


Figura 2. Perfil plasmidial em gel de agarose 0,7% da linhagem *E. coli* colisepticêmica, e linhagem MS101 e transconjugantes provenientes da conjugação F3 x MS101

- 1-Amostra J53-1 (pR40a)
- 2-Amostra HB101 (P307)
- 3-Amostra HB 101 (pRP4)
- 4-Amostra V517
- 5-Amostra receptora MS101
- 6-Amostra selvagem F3
- 7-Transcojugante Col2
- 8-Transcojugante Col6
- 9-Tranconjugante Col14
- 10-Transconjugante Col15
- 11-Transconjugante Col17

Figura 3. Aderência de *E. coli* F3 selvagem isolada do fígado de frangos, no epitélio da traquéia de aves de 15-20 dias de idade. **(A)** Controle, corte do tecido traqueal que recebeu o mesmo tratamento que os demais só que não foi colocado em contato com extrato bacteriano. **(B)** *E. coli* F3, aderida nas células ciliadas, após o cultivo no meio minca a 37°C; **(C)** *E. coli* MS101 receptora, aderida nas células ciliadas após o cultivo no meio minca a 37°C; **(D)** *E. coli* col2 tranconjugante proveniente da conjugação F3xMS101, aderida em células epiteliais, após o cultivo no meio minca; **(E)** *E. coli* col6 transconjugante proveniente da conjugação F3xMs101, aderida nas células epiteliais, após o cultivo em meio minca; **(F)** *E. coli* col14 transconjugante proveniente da conjugação F3xMS101; aderida nas células epiteliais após o cultivo em meio minca 37°C; **(G)** *E. coli* XP2 Transconjugante obtido da conjugação pRT733xF3, após o cultivo no meio minca a 37°C; **(H)** *E. coli* XP4 transconjugante obtido da conjugação pRT733xF3, após o cultivo no meio minca a 37°C. Aumento 1000 X

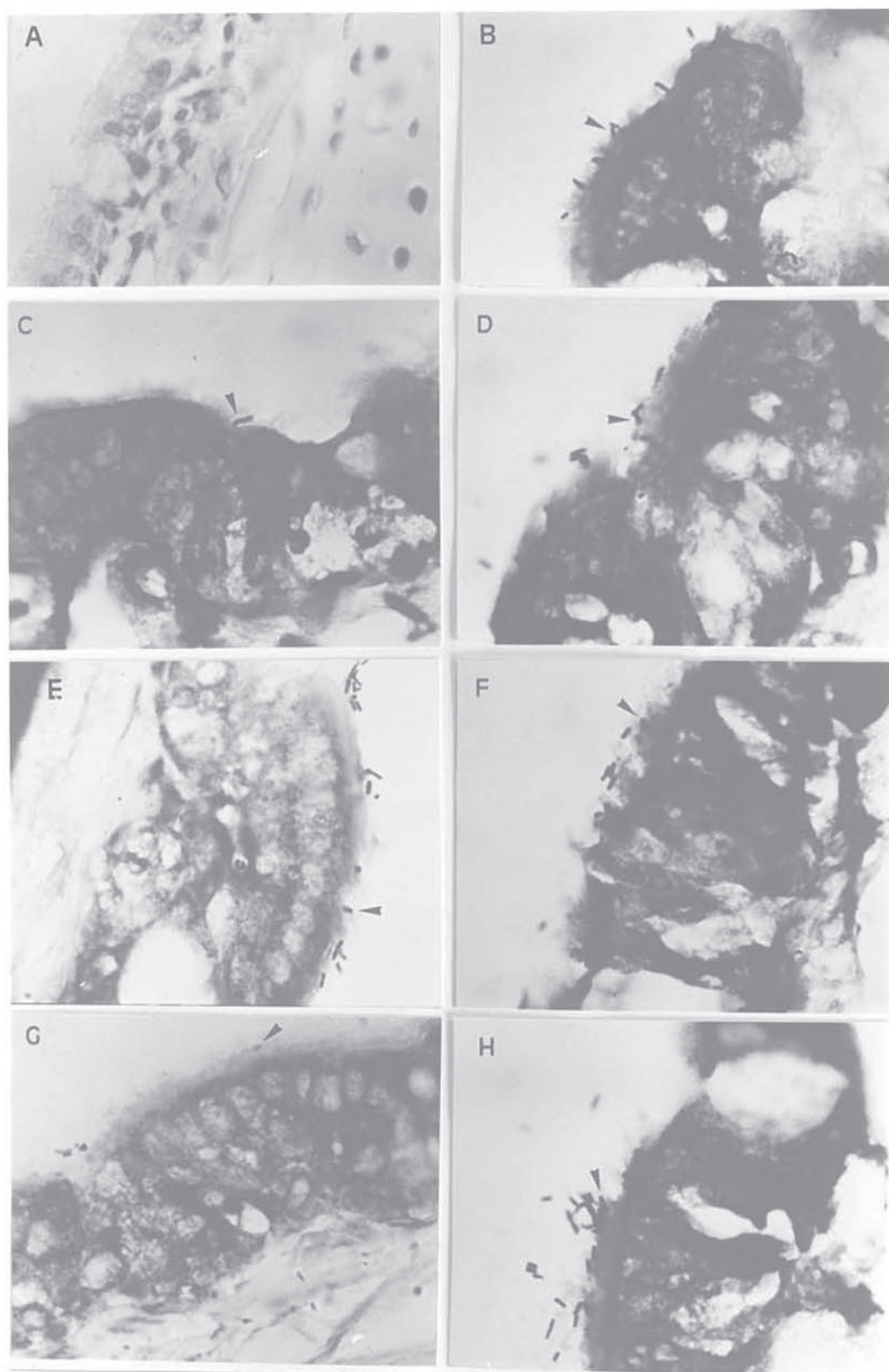
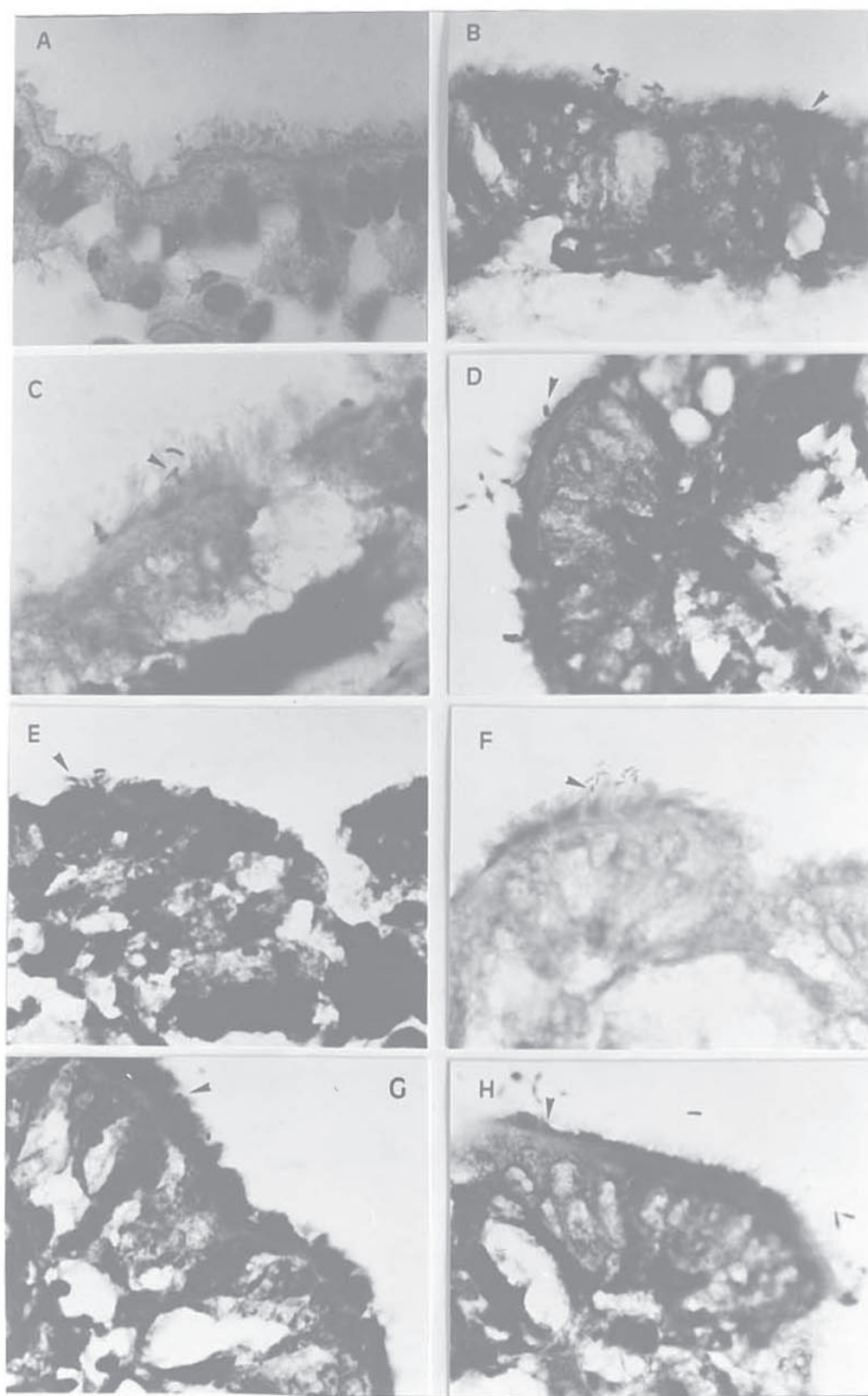


Figura 4. Aderência de *E. coli* F3 selvagem isolada do fígado de frangos, no epitélio da traquéia de aves de 15-20 dias de idade. **(A)** Controle, corte do tecido traqueal que recebeu o mesmo tratamento que os demais só que não foi colocado em contato com extrato bacteriano. **(B)** *E. coli* F3, aderida nas células ciliadas, após o cultivo no meio minca a 37°C; **(C)** *E. coli* MS101 receptora, aderida nas células ciliadas após o cultivo no meio minca a 37°C; **(D)** *E. coli* col2 tranconjugante proveniente da conjugação F3xMS101, aderida em células epiteliais, após o cultivo no meio minca; **(E)** *E. coli* col6 transconjugante proveniente da conjugação F3xMs101, aderida nas células epiteliais, após o cultivo em meio minca; **(F)** *E. coli* col14 transconjugante proveniente da conjugação F3xMS101; aderida nas células epiteliais após o cultivo em meio minca 37°C; **(G)** *E. coli* XP2 Transconjugante obtido da conjugação pRT733xF3, após o cultivo no meio minca a 37°C; **(H)** *E. coli* XP4 transconjugante obtido da conjugação pRT733xF3, após o cultivo no meio minca a 37°C. Nesse experimento, foi adicionado no meio Eagle, 1% de D-manose. Aumento 1000 X



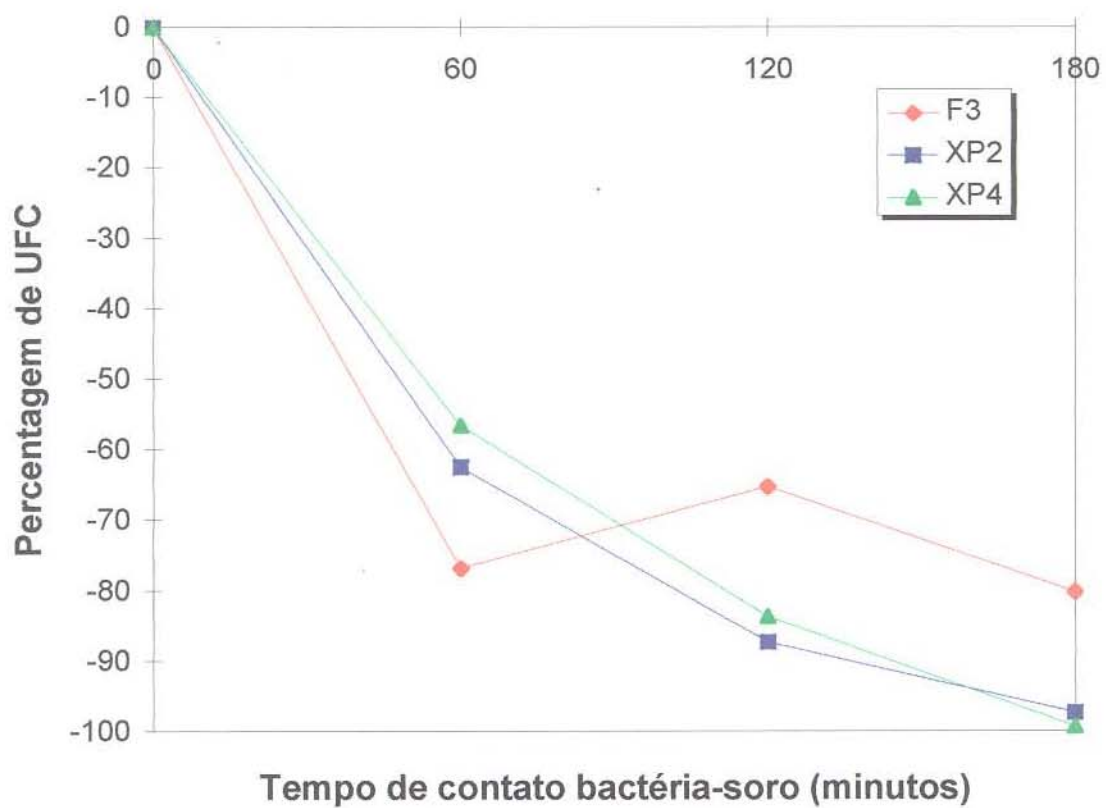


Figura 5. Curva de resistência sérica das linhagens bacterianas F3, XP2 e XP4

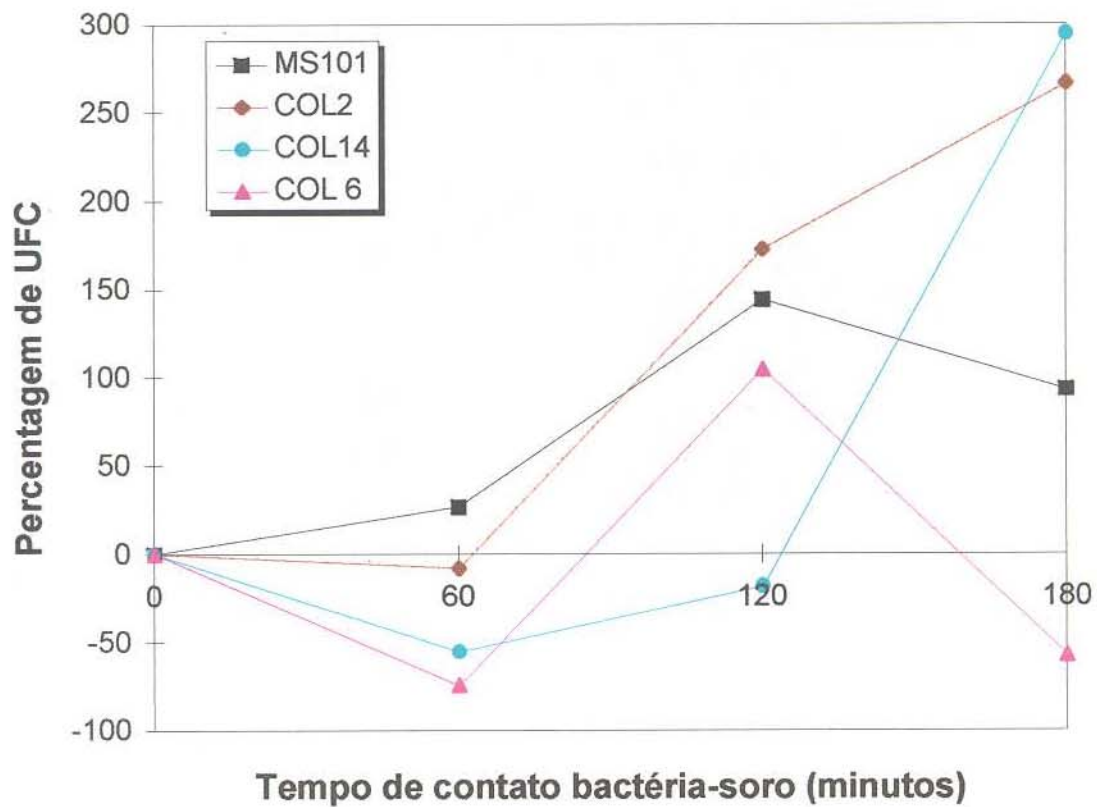


Figura 6. Curva de resistência sérica das linhagens bacterianas MS101, col2, col6 e col14

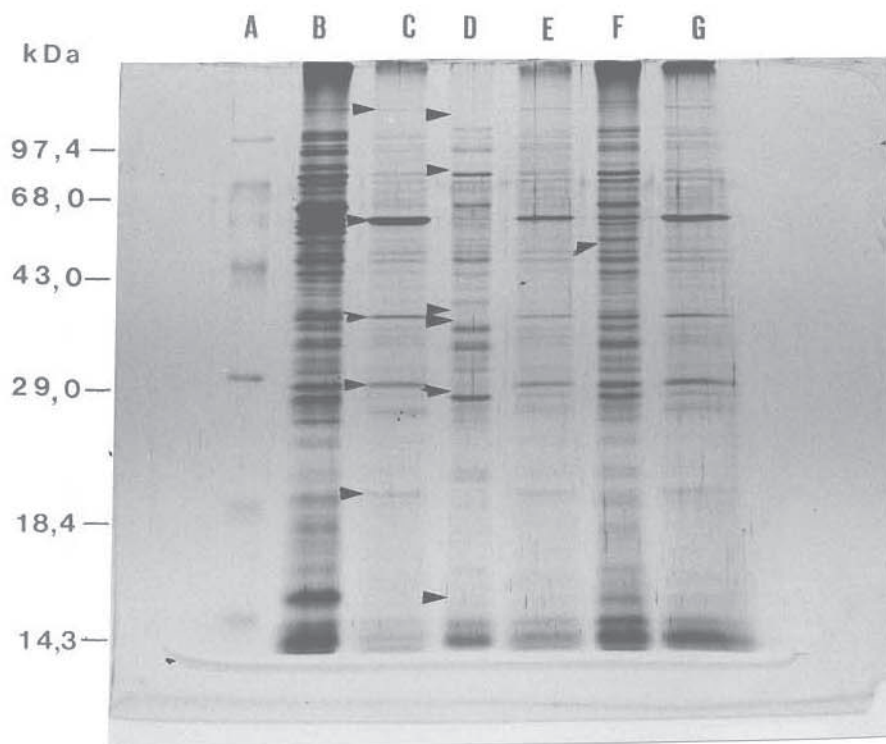


Figura 7. Perfil eletroforetico de proteínas de membrana em gel SDS-Page 12,5% da linhagem selvagem F3 e mutantes XP2 e XP4 crescidas em meio com a presença e ausência de ferro.

A Padrão de pesos molecular (97,4, 68, 43, 29, 18,4, 14,3)KDa.

B Linhagem selvagem F3

C Linhagem selvagem F3, crescidas em meio com ausência de ferro

D Transconjugante XP2,

E Transconjugante XP2, crescidas em meio com ausência de ferro

F Transconjugante XP4

G Transconjugante XP4, crescidas em meio com ausência de ferro

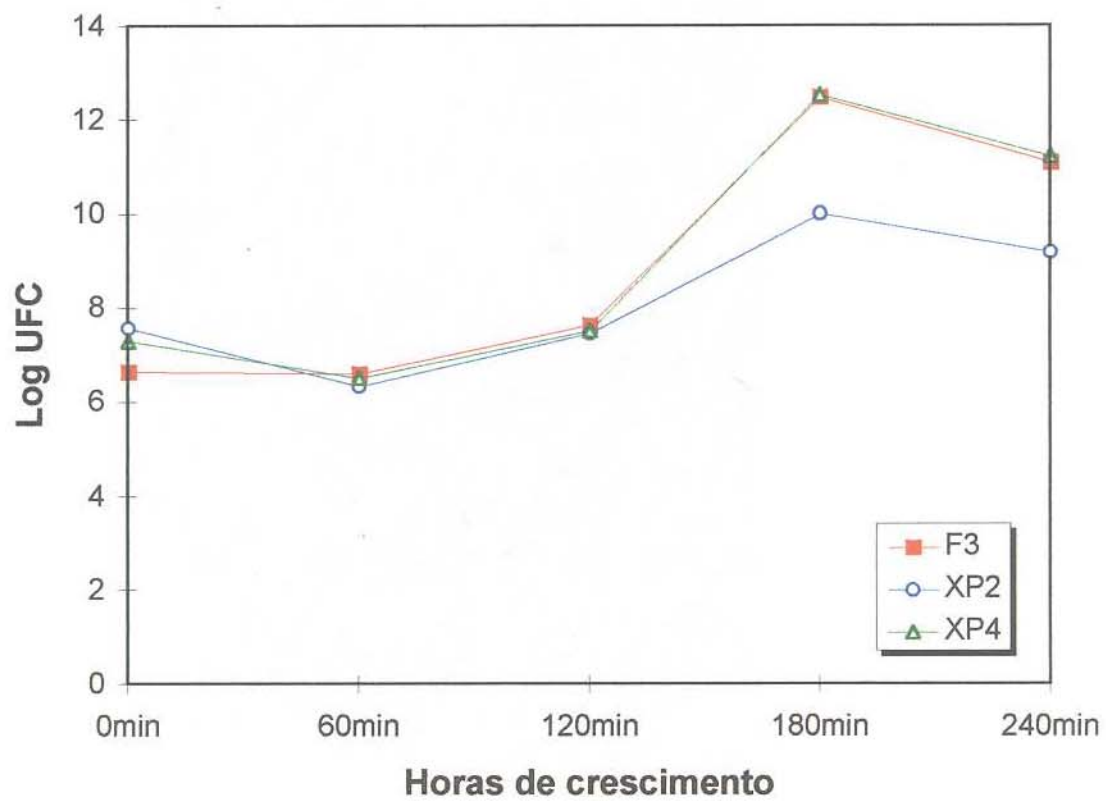


Figura 8. Curva de crescimento de *E. coli* tipo selvagem F3 e os tranconjugantes XP2 e XP4.
UFC - Unidade Formadora de Colônia

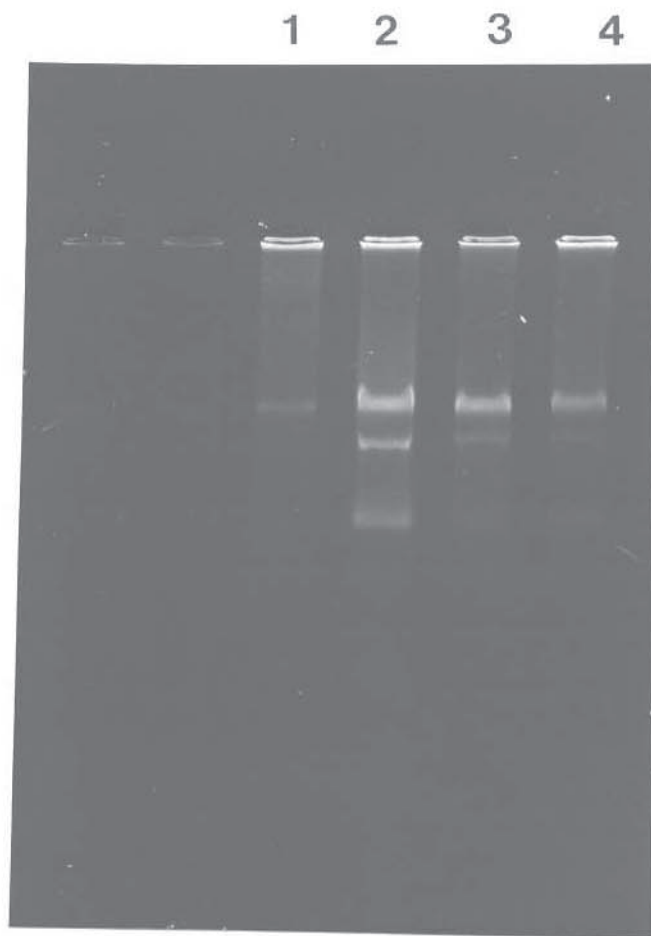


Figura 9- Perfil eletroforetico de plasmidios em gel de agarose 0,7% da amostra selvagem F3 e os transconjugantes XP2, XP3 e XP4

- 1- Amostra selvagem F3
- 2- Transconjugante XP2
- 3- Transconjugante XP3
- 4- Transconjugante XP4

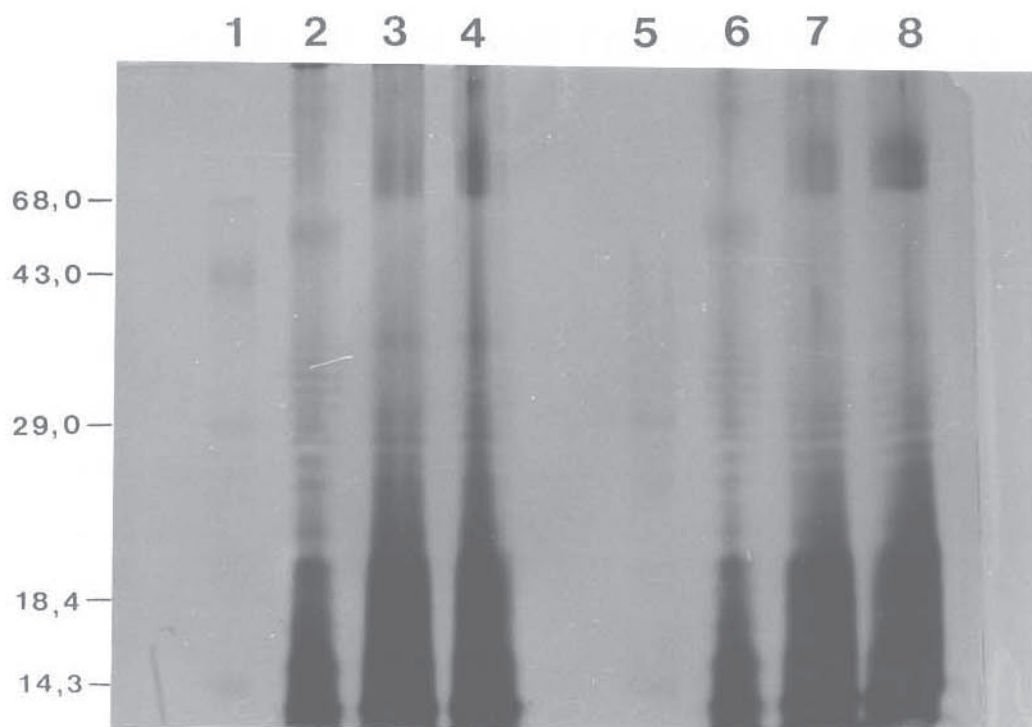


Figura 10- Perfil eletroforetico de proteínas lipolissacarides (LPS) em gel poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% da amostra selvagem F3 e seus transconjugantes XP2 e XP4

- 1- Padrão Sigma
- 2- Amostra selvagem F3
- 3- transconjugante XP2
- 4- Transconjugante XP4
- 5- Padrão Sigma
- 6- Amostra selvagem F3
- 7- Transconjugante XP2
- 8- Transconjugante XP4

6 - CONCLUSÃO

Os resultados obtidos abaixo discriminados:

1 - A linhagem de *E. coli* F3 selvagem altamente patogênica demonstrou a presença de pelo menos 7 plasmídios; 95, 69, 62, 52, 42, 6 e 5MD, produz fímbrias tipo 1 e colicinas E1 e E3.

2 - Os 19 transconjugantes obtidos da conjugação F3 com a receptora MS101 não tiveram sua patogenicidade aumentada quando comparada com o tipo parental, apesar de ter ocorrido transferência múltipla de plasmídios; dois destes transconjugantes (col8 e col10), não produziram colicinas. O transconjugante col14 apresentou-se com uma resistência à ação bactericida do soro mas não foi patogênico.

3 - As colônias mutantes XP2, XP3 e XP4 provenientes da conjugação de F3 com pRT733 tiveram sua patogenicidade diminuída, todas expressam fímbrias do tipo 1, produzem colicinas e não apresentaram alterações no perfil plasmidial ou na expressão de LPS.

4 - A curva de crescimento das linhagens XP2, XP4 e F3 mostrou que o mutante XP2 teve um crescimento diminuído quando comparado com as demais amostras.

5 - A amostra mutante XP2 e XP3 são idênticas e diferentes de XP4. O crescimento desses tipos bacterianos em presença de ferro

mostrou que os mutantes **XP2** e **XP3** não expressaram várias subunidades protéicas de 127,72; 76; 59; 41; 38,52; 35,72; 35,2; 27,27 e 14,69kDa e o mutante **XP4** não expressou a subunidade protéica de 47,82kDa, nos permite concluir que; as linhagens **XP2** e **XP3** sofreram uma mutação no gene(es) responsável(eis) pela expressão de uma proteína reguladora importante de 47,82kDa não expressa pelo mutante **XP4**, provavelmente está relacionada aos mecanismos de patogenicidade.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHATMAN, M.; KENNEDY, N. & SKURRAY, R., 1977. Cell interactions in conjugating *Escherichia coli* role of Tra-t protein superface exclusion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **74**: 5104-5108.
- AGUERO, M. E. & CABELLO, F. C., 1983. Relative contribution of col-V, plasmide and K antigen to the pathogenicity of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **40**: 359-369.
- AGUERO, M. E.; LA-FUENTE, G. & VIVALD, E., 1989. Col-V, increases the virulence of *Escherichia coli* K1, strains in animals models of neonatal meningitis and urinary. **Infect immunol**, **178**;211-216.
- ARONSON, M.; MEDALIA, O. & SHORI, L., 1979. Prevention of *Escherichia coli* colonization of the urinary tract by blocking bacterial adherence with methyl α -D-mannopyranoside. **J. Infect. Dis.**, **139**: 329.
- ARP, L. H. & JENSEN, A. E., 1980. Piliation, hemaglutinação, motility and generation time of *Escherichia coli* that are virulent or avirulent for turkeys. **Avian Dis.**, **24**: 153-161.
- ARTHUR, M.; CAMPANELLI, C.; ARBEIT, R. D.; KIM, C.; STAINBACH, S.; JOHNSON, C. E.; RUBIN, R. H. & GOLDSTEIN, R., 1989. Structure and copy number of gene clusters related to the pap P-adhesin operon of uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immunol.**, **57**: 314-321.
- BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M.; CANDY, D. C. A. & MOON, H. W., 1983. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, **2**: 534-538.
- BALDWIN, T. J.; KNUTTON, S.; SELLERS, L.; MANJARREZ HERNANDEZ, H. A.; AITKEN, A. & WILLIAMS, P. H., 1992. Enteroaggregative *Escheichia coli* strains secrete a heat-labile toxin antigenically related to *E. coli* hemolysin. **Infect. Immunol.**, **60**:2092-2095.
- BENEDETTI, C. A., 1991. Análise eletroforética de proteínas de membrana de *Pseudomonas avenae* e *Pseudomonas rubrilineans* patogênicas a gramíneas. **Tese de Mestrado Universidade Estadual de Campinas**, 75 páginas.
- BETTLEY, M. J.; MILLER, V. L. & MIKELANOS, J. J. 1986. Genetics of bacterial enterotoxins. **Ann. Rev. Microbiol.**, **40**: 577-608.
- BINDEREIF, A.; BRAUN, V. & HANTKE, K., 1982. The cloacin receptor of col-V bearing *Escherichia coli* is part of the Fe³⁺ aerobactin transport system. **J. Bacteriol.**, **150**: 1472-1475.

- BINDEREIF, A.; GARIBALDI, J.A. & NEILANDS, J.B., 1981. Annual meeting American Society for Microbiology, 815th, Dallas TX. March 16 p119, Abtr.
- BINNS, M. M.; DAVIES, D. L. & HARDY, K. G., 1979. Cloned fragments of the plasmid Col V, I-K94 specifying virulence and serum resistance. **Nature**, **279**: 778-781.
- BINNS, M. M.; MAYDEN, J. & LEVINE, R. P., 1982. Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes *TraT* of *R* and *iss* of Col V, I-K94. **Infect. Immun.**, **35**: 654-659.
- BITTER-SUERMAN, D., PETERS, H., NEHRBASS, R., MONTENEGRO, M., TIMMIS, K.N., 1984. Monoclonal antibody detection of inc F group plasmid. Encoded *traT* protein in clinical isolates of *E. coli*. **Infect Immun.**, **46**: 308-313.
- BLACK, R. E.; BROWN, K. H. BECHER, S.; ABDUL ALIM, A. R. M. & HUG, I., 1982. **A. J. Epidemiol.**, **115**: 315-324.
- BLUM, H.; BEIER, H. & GROSS, H. J., 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, **8**: 93-99.
- BOARD, R. G., 1985. The microbiology of Hen's egg. **J. Appl. Bacteriol.**, **28**: 245-281.
- BOQUET, P. L., MANOIL, C. AND BECKWITH, J., 1987. Use of *TnphoA* to detect genes for exported proteins in *Escherichia coli*: identification of the plasmid-encoded gene for a periplasmic acid phosphatase. **J. Bacteriol.**, **169**: 1663-1669.
- BRAUN, V.; 1981. *E. coli* cells containing the plasmid col V produce cell aerobactin. **FEMS Microbiol LETT.**, **11**: 225-228.
- BROWN, E. J., 1985. Interaction of Gram-positive microorganisms with complement. **Microbiol. Immun.**, **121**:159-187.
- BULLEN, J. J., 1981. The significance of iron in infection. **Reviews of infect. Dis.**, **76-84**.
- BULLEN, J. J.; ROGERS, H. J. & GRIFFITHS, E., 1978. Role of iron in bacterial infection. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, **3**: 1-35.
- BURKE, W. H., 1988. Avian reproduction (egg formation and embryo development) Rio de Janeiro, Guanabara, 853-862.
- CALNEK, B. W.; BARNES, H. J. & BEARD, C. W., 1991. Diseases of poultry. 9. ed. Iowa, State Versity, 929.
- CAVALIERI, S. J., BOHASCH, G. A. & SNYDER, I. S., 1984. *Escherichia coli*-hemolysin characteristics and probable role pathogenicity. **Microb. Rev.**, **48**: 326-343.

- CHANG, P. P.; MOSS, J.; TWIDDY, E. M. & HOLMES, R. K., 1987. Type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* activates adenylate cyclase in human fibroblasts by ADP ribosylation. **Infect. Immun.**, **55**: 1854-1858.
- CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A. & BEACHEY, E. H., 1985. Microbial adherence in infection. In: Mendell; DOUGLAS & BENNETT. **Principles and practice of infectious diseases. 2ed. Part I Seção A, Cap. 2**, pp 6-23.
- CLEMENTS, J. D.; YANCEY, R. J. & FINKELSTEIN, R. A. 1980. Properties of homogenous heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*. **Infect. Immunol.**, **29**: 91-97.
- CRAVIOTO, A.; GROSS, R. J.; SCOTLAND, S. M. & ROWE, B., 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Curr. Microbiol.**, **3**: 95-99.
- CRAVIOTO, A.; TELLO, A.; NAVARRO, A.; RUIZ, J.; VILLAFAN, H.; URIBE, F. & ESLAVA, C., 1991. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with tipe and duration of diarrhoea. **Lancet**, **337**: 262-264.
- CROSA, J. H., 1984. The relationship of plasmid-mediated transport and bacterial virulence. **Ann. Rev. Microbiol.**, **38**: 68-89.
- CROSS, A. S.; SADOFF, J. C.; GEMSKI, P. & KIM, S, K, 1988. The relative role of lipopolysaccharide and capsule in the virulence of *Escherichia coli*. In bacteria, complement and the phagocytic cell. CABELLO, F. C. and PUZZO, C., eds Springer Verlaaj, Berlin pp319- 334.
- CURTISS, R.; MAURELLI, A.T. & GULIG, P. A.. 1988. Genetic analysis of pathogenesis of enteric bacteria. In OWEN, P. & FOSTER, T. J. (eds). Immunochemical and molecular genetic analysis of bacterial pathogens. cap 6, 67-81.
- DALLAS, W. S. & FALKOW, S. 1980. Amino acid sequence homology between *cholerae* toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin. **Nature**, **288**: 499-501.
- DATTA, N.; HEADJES, R. W.; SHAW, E. J.; SYKES, R. & RICHMOND, M. H., 1971. Propierts of an R-factor from *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, **180**: 1244-1249.
- DAVIS, B. D. & MINGLIOLI, E. S., 1950. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12. **J. Bacteriol.**, **60**: 17-28.
- DAVIS, C. P.; AVOTS-AVOTINS, A. E. & FADER, R. C., 1981. Evidence for a bladder cell glycolipid receptor for *Escherichia coli* and the effect neuroaminic acid and colonic acid on adherence. **Infect. Immunol.**, **34**: 944.

- DEAN, A. G.; CHING, Y. C.; WILLIAMS, R. G. & HARDEN, L. B., 1973. Test for *Escherichia coli* enterotoxin of diarrhea in children in Honolulu. **J. Infect. Dis.**, **125**: 407-411.
- Dho, M. & LAFONT, J. P., 1984. Adhesive properties and iron uptake abilities in *Escherichia coli* lethal and nonlethal for chickens. **Avian Dis.**, **28**: 1016-1025.
- DHO, M & LAFONT, J. P., 1982. *Escherichia coli* colonization of trachea in poultry comparison of virulent and avirulent strains in gnotobiotic chickens. **Avian Dis.**, **26**: 787-797.
- DOZOIS, C. M.; CHANTELOUP, N.; MOULIN, M.; Dho-BREE, A.; DESLTEUS, C. & FAIRBROTHER, J. M., 1993. Bacterial colonization and in vivo expression of (F1) antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. **Avian Dis.**, **38**: 239-249.
- DRASAR, B. S. & HILL, M. J. 1974. Human intestinal flora. The distribution of bacterial flora in the intestine. London **Academic Press**. pp 36-43.
- DU-PONT, H. L.; FORMAL, S. B.; HORNICK, R. B.; SNYDER, M. J.; LIBONATI, J. P.; SHEAHAN, D. G.; LA-BREC, E. H. & KALAS, J. P., 1971. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. **N. Engl. J. Med.**, **285**: 1-9
- DUGUID, J. P. & OLD, D. C., 1980. Adhesive properties of Enterobacteriaceae. In: BEACHEY, E. H. (ed). Bacterial adherence (receptors and recognition) **Ser. B. Vol. 6**, pp 184 London and Methuen, New York, Chapman and Hall.
- DYKES, C. W.; HALLIDAY, I. J.; HOBDEN, A. N.; READ, M. J. & HARFORD, S. 1985. A comparison of the nucleotide of the A subunit of heat-labile enterotoxin and cholerae toxin. **Fems Microbiol. Letters**, **26**: 171-174.
- EDWARDS, P. R. & EWING, W. H., 1972. Identification of Enterobacteriaceae **3ed Mineapolis Publishers.**
- ELLIS, M. G.; ARP, L. H. & LAMONT, S. J., 1988. Serum resistance and virulence of *Escherichia coli* isolated from turkeys. **Amer. J. Veter. Res.**, **49**: 2034-2037.
- ESCHERICH, T., 1985. Classification of enterobacteriaceae . Begey's Manual of Sistematic Bacteriology. London, **Willians Baltimore**, **1**: 420.
- EVANS, D. J.; EVANS, D. G.; YOUNG, L. S. & PITT, J., 1980. Hemagglutination typing of *Escherichia coli*: definition seven hemagglutination type. **J. Clin. Microbiol.**, **12**: 235-242.
- FALADE, S., 1977. Colibacilose. **Vet. Rec.**, **101**: 31.
- FANTINATTI, F.; SILVEIRA, W. D. & PESTANA de CASTRO, A. F., 1994. Characteristics associated with pathogenicity of avian septicemic *Escherichia coli* strains. **Vet. Microbiol.**, **41**: 75-86.

- FARUQUE, S. M.; HAIDER, K.; RAHAMAN, M. M.; ALIM, A. A. R. M.; BAQUI, A. H.; AHAMED; Q. S.; HOSSAIN, K. M. B. & ALBERT, M. J., 1992. Evaluation of a DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli* from children with diarrhoea in Bangladesh. **J. Diar. Dis. Reser.**, **10**: 31-34.
- FERRAZA, D. & LEVY, S.B. 1980. Biochemical and immunological characterization of an R plasmid-encoded protein with properties resembling those of major cellular outer membrane proteins. **J. Bacteriol.**, **144** (1): 149-158.
- FIELD, M.; GRAF, L. H.; LAIRD, W. J. & SMITH, P. L. 1978. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: in vitro effects on guanylate cyclase, cGMP concentration, and ion transport in small intestine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **75**: 2800-2804.
- FIRON, N.; OFEK, I. & SHARON, N., 1982. Interaction of manose-containing oligosaccharides with the fimbrial Irctin of *Escherichia coli*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **105**: 1426.
- FORMAL, S. B. & HORNICK, R. B., 1978. Invasive *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, **137**: 641-644.
- FRANK, M. M.; MAY, J. E. & KANE, M. A., 1983. Colibacillose. **Infect. Dis.**, **128**: 176-181.
- FRANTZ, F. C.; JASO-FRIEDMAN, L. & ROBERTSON, D. C. 1984. Binding of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to rat intestinal cells and brush border membranes. **Infect. Immunol.**, **43**: 622-630.
- FROST, G. E. & ROSEMBERG, H., 1973. The citrate-dependent iron transport system in *Escherichia coli* K12. **Biochem. Biophys. Acta**, **330**: 90-101.
- GAASTRA, W. & de GRAF, F. K. 1982. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Microbiol. Rev.**, **46**: 129-161.
- GARIEPY, J. & SHOOLNIK, G. K. 1986. Design of a photoreactive analogue of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin ST-Ib: use in identifying its receptor on rat brush border membranes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **83**: 483-487
- GARIEPY, J.; JUD, A. & SCHOOLNIK, G. K. 1987. Importance of disulfide bridges in the structure and activity of *Escherichia coli* enterotoxin ST-Ib. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **84**: 8907-8911.
- GARIEPY, J.; LANE, A.; FRAYMAN, F.; WILBUR, D.; ROBIEN, W.; SCHOOLNIK, G. K. & JARDETZKI, O. 1986. Structure of the toxin domain of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin ST-I. **Biochem.**, **25**: 7854-7866.
- GENNSKI, P.; CROSS, A. S. & SADOFF, J. C., 1980. K1 antigen associated resistance to the bactericidal activity of serum. **FEMS Microbiol. Lett.**, **9**: 193-197.
- GHOSH, S. S., 1987. Occurrence of *Escherichia coli* serotypes in chicks. **Indian Vet. J.**, **64**: 464-466.

- GIBSON, F. & MAGRATH, D. I., 1969. The isolation and characterization of a hydroxamic acid (aerobactin) formed by *Aerobacter aerogenes*. **Biochem. Biophys. Acta.**, **152**: 175-184.
- GILL, D. M.; & RICHARDSON, S. H. 1980. Adenosine diphosphate-ribosylation cyclased by heat-labile enterotoxin. **Infect. Immunol.**, **33**: 677-682.
- GLANTZ, P. J.; NABOTSKY, S. & BUBASH, H. G., 1962. *Escherichia coli* serotypes isolated from salpingites and chronic respiratory diseases of poultry. **Avian Dis.**, **6**: 322-328.
- GLUNDER, G., 1990. Dermatitis in broiler, caused by *Escherichia coli*. Isolation of diseases with *Escherichia coli* 078:K80 and conclusions under consideration of predisposing factors. **J. Veter. Med. Berlin**, **37**:383-391.
- GRANDSEN, W. R.; DAMM, M. A. S.; ANDERSON, J. D.; CARTER, J. E. & LIOR, H., 1986. Further evidence associating hemolytic uremic syndrome with infection by verotoxin-producing *Escherichia coli* 0157:H7. **J. Infect. Dis.**, **154**: 522-524.
- GREEN, B. A.; NEILL, R. J.; RUYECHAN, W. T. & HOLMES, R. U. 1983. Evidence that new enterotoxin of *Escherichia coli* which activates adenylate cyclase in eucariotic target cells is not plasmid mediated. **Infect. Immunol.**, **42**: 393-390.
- GREENBERG, R. N. & GUERRANT, R. L. E., 1980. *E. coli* heat-stable enterotoxin. **Pharmacol. ther.**, **13**: 507.
- GREWAL, K. K.; WARNER, P. J. & WILLIAMS, P. H., 1982. An inducible outer membrane protein involved in aerobactin-mediated iron transport by Col V strains of *Escherichia coli*. **Febs Lett.**, **140**: 27-30.
- GROSS, R. F.; ENGELBRECHT, B. & BRAUN, V. 1984. Identification of the gene and their polypeptide products responsible for aerobactin biosynthesis by Col-V plasmids. **Mol. Genet.**, **201**: 204-212.
- GROSS, W. B. Colibacillosis. In: HOFSTAD, M. S.; CALNEK, N. W.; HELMBOLDT, C. F.; REID, W. M.; YODER, H. W. (eds), 1978. Diseases of poultry (7th ed) Iowa State University Press, Ames, Iowa pp 392-405.
- GROSS, W. B., 1984. Colibacillosis. In HOFSTAD, M. S.; CALNECK, B. W.; HELMOOD, C. F.; REID, W. M.; YODER, H. W. eds. Diseases of poultry. **Ames, Iowa State University Press**, 392-405.
- GUPTA, R. N. & SINGH, C. M., 1969. Eggs and hatchery. **Hyg. Vet.**, **4**: 5-15.
- GYLES, C. & BARNUM, D. A., 1986. A heat labile enterotoxin from strains of *Escherichia coli* enteropathogenic for pigs. **J. Infec. Dis.**, **20**: 419-426.
- GYLES, C. L., 1979. Limitations of the infant mouse test for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins. **Can. J. Comp. Med.**, **34**: 337-340.

- GYLES, C. L., 1986. *Escherichia coli*. In GYLES, C. L. & THOEN C. O., eds. In: Pathogenesis of bacterial infections in animals. **Am. Iowa State University Press**, 114-131.
- GYLES, C. & BARNUM, D. A., 1969. A heat labile enterotoxin from strains of *Escherichia coli* enteropathogenic for pigs. **J. Infect. Dis.**, **120**: 419-426.
- HALE, T. L.; SANSONETTI, P. J.; SHAD, P. A., AUSTIN, S & FORMAL, S. B., 1983. Characterization of virulence plasmids and plasmid associated outer membrane proteins in *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **40**: 340-350.
- HARRY, E.G. & HEMSLEY, L. A., 1965. The association between the presence of septicaemia strains of *E. coli* in the respiratory and intestinal tracts of chickens and the occurrence of colisepticaemia. **The Veterinary Record**, **77**: 35-45.
- HARRY, E. G. & CHUBB, L. G., 1964. Relationships between certain biochemical characteristics and pathological activity in avian strains of *Escherichia coli*. **J. Comp. Path.**, **74**: 180-187.
- HINSON, G. & WILLIAMS, P. H. 1989. Adhesins of pathogenic *Escherichia coli* In: HOPWOOD, D. A. & CHARTER, K. E. Genetics of Bacterial Diversity, cap. 14, pp.287-307, Academic Press Limited, London, U.K.
- HITCHCOCK, P.,J. & BROWN, T., M., 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver stained polyacrilamide gel. **J. Bacteriol.**, **154**:269-272.
- HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS, 1990. Hoefer electroforesis. **Catalog and Exercises (1990-1991)** San Francisco.
- HOFFMAN-VOLKER, 1968. Anatomia e fisiologia de las aves domesticas. **Zaracosa, Acribia**,pg 1968.
- HOFSTAD, M. S.; CALNEK, B. W. & HELMBOLDT, C. F., 1978. Diseases of poultry **7ed Ames, Iowa State University Press**, pg 940
- HOLMGREN, J. 1973. Comparison of the tissues receptors for *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins by means of gangliosides and natural cholerae toxoid. **Infec. Immunol.** **8**: 851-859.
- HOLMGREN, J.; FREEDMAN, P.; LINDBALD, M.; SVENNERHOLM, A. M. SVENNERHOLM, L. 1982. Rabbit intestinal glycoprotein receptor for *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin lacking affinity for cholerae toxin. **Infect. Immunol.**, **38**: 424-443
- HUGHES, C.; HACKER, J.; ROBERTS, A.& GOEBEL, W., 1983. Hemolysin production as a virulence marker, in symptomatic and assinptomatic urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. **Infect. Immunol.**,**39**: 546-551.
- HUGHES, C.; PHILLIPIS, R. & ROBERTS, A. P. Serum resistance among *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in relation to "O" type and the carriege determinants. **Infect. Immunol.**, **35**:270-275, 1982

- HUGHES, J. M.; MURAD, F.; CHANG, B. & GUERRANT, R. L. 1978. Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. **Nature**, **271**: 755-756.
- INOUE, K.; YONE, M. K. K. & TAKAMIZAWA, A. et al. 1986. Studies on the immune bacteriolysis XIV requirement of all nine components of complements. **J. Biken**, **11**: 203.
- JACKSON, M. P.; NEILL, R. J.; O'BRIEN, A. D.; HOLMES, R. K. & NEWLAND, J. W., 1987. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin-I and Shiga-like toxin-II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli*. **FEMS. Microbiol. Letters**, **44**: 109-114
- JAKES, K; ZINDER, N. D. & BOON, T., 1974. Purification and properties of Colicin E3 immunity protein. **J. Biol. Chem.** **249**: 438-444.
- JOHNSON, G. W. ; LIOR, H. & BEZANSON, S. G., 1983. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. **The Lancet**, **i**: 76.
- JOYNER, K. A.; SCHEMTZ, M. A. S. & GOLDMAN, R. C. et al., 1984. Mechanism of bacterial resistance to complement mediated killing: inserted C5b-9 correlates with killing for *Escherichia coli* O111 B4 varying in O antigen capsule and O-polysaccharide coverage of lipid A core oligosaccharide. **Infect. Immun.**, **45**: 113-117.
- JONES, C. W. & RUTHER, J. M., 1974. The association of K88 antigen with haemagglutinating activity in porcine strains of *Escherichia coli*. **J. Gen. Microbiol.**, **84**: 135-144.
- JUANG, R. H.; CHANG, Y. D.; SUNG, H. Y. & SU, J. C., 1984. Owendryng method for polyacrylamide gel slab placked in cellophane sandwich. **Ann. Biochem.**, **141**: 348-350.
- KALCHEMBEEK, A.; JOSSE, M. & SCHOENNAERS, R., 1977. Relations ches les *Escherichia coli* d'origine bovine entre le pouvoir enteropathogene, l'antigene K99 et l'hemagglutination. **Am. Ed. Vet.**, **121**: 239-248.
- KARMALI, M. A.; PETRIC, M.; LIM, C. FIRING, P. C. & STEELE, B. T., 1983. *Escherichia coli* cytotoxin, hemolytic uremic syndrome, and hemorrhagic colitis. **Lancet**, **2**: 1299-1300.
- KAUFMAN, P. E. 1981. Production and evaluation of antibody to the heat-stable enterotoxin from a human strain of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.** **42**: 611-614.
- KENNEDY, D. J.; GREENBERG, R. J.; DUNN, J. A.; ALBERTHY, R.; RYERSE, J., S. & GERRANT, R. L. 1984. Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STb on the intestine of mice, rats, rabbits and piglets. **Infect. Immunol.** **46**: 639-646.
- KLIPSTEIN, F. A.; ENGERT, R. F. & CLEMENTS, J. D. 1982. Development of a vaccine of cross-linked and heat-labile enterotoxins that protects against *Escherichia coli* producing either enterotoxins. **Infect. immunol.** **37**: 550-557.
- LAEMMLI, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during that assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**: 680-685.

- LANGMAN, L.; YOUNG, I. G.; FROST, G. E. et al., 1972. Enterochelin system of iron transport in *Escherichia coli* mutations affecting ferric-enterochelin esterase. **J. Bacteriol.**, **112**: 1142-1149.
- LEE, C. H.; MOSELEY, S. L.; MOON, H. W.; WHIPP, S. C.; GYLES, C. L. & SO, M. 1983. Characterization of the gene encoding heat-stable toxin II and preliminary molecular epidemiological studies of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin II producers. **Infect. Immunol.** **42**: 264-268.
- LEITE, D. S., 1986. Isolamento, purificação e caracterização de um novo fator de colonização (F42) de *Escherichia coli* enterotoxigênica de origem suína. Tese de mestrado apresentada à Universidade Estadual de Campinas.
- LEVINE, M. M. & EDELMAN, R., 1984. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. **Epidemiol. rev.**, **6**:31-51.
- LEVINE, M. M., 1984. *Escherichia coli* infections. In: Bacterial Vaccines, Academic press, London, cap. 7:187-235.
- LEVINE, M. M., 1985. *Escherichia coli* infections. **New England J. Med.**, **313**: 445-447.
- LINGOOD, M. A.; ROBERTS, M.; FORDS, S.; PARRY, S. H. & WILLIAMS, P. H., 1987. Incidence of the aerobactin iron uptake system among *Escherichia coli* isolate from infections of farm animals. **J. Gen. Microbiol.**, **133**: 835-842.
- MACRINA, D. L.; KOPECKO, D. J.; JONES, K. R.; AYERS, D. J. & Mc-COWEN, 1978. A multiple plasmide containing *Escherichia coli* strains convenient source of size reference plasmide moleculares. **Plasmid**, **1**: 417-420.
- MANNING, P. A., TIMMIS, K. N. & STAVENSON, G., 1980. Colonization factor antigen II (CFA/II) of enterotoxigenic *Escherichia coli*: molecular cloning of the determinant. **Molecular and General Genetics**, **200**: 322-327.
- MATHEWSON, J. J. JOHNSON, P. C.; DU-PONT, H. L.; SATTERWHITE, T. K. & WINDSOR, D. K. 1986. Pathogenicity of enteroadherent *Escherichia coli* in adult volunteers. **J. Infect. Dis.**, **154**: 524-527.
- MATHEWSON, J. J.; JOHNSON, P. C.; DU PONT, H. L.; MORGAN, D. R. THORTON, S. A.; WOOD, L. V. & ERCSSON, C. D. 1985. A newly recognized cause of traveller's diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.** **151**: 471-475.
- MAURELLI, A. & SANSINETTI, P. J., 1988. Genetics determinants of *Shigella* pathogenicity. **Ann. Rev. Microbiol.**, **42**: 127-150.
- McCONNEL, M. M.; SMITH, H. R.; WILLSHAW, G. A.; FIELD, A. M. & ROWE, B., 1981. Plasmid coding for heat-labile enterotoxin production isolated from *Escherichia coli* 078 comparison of properties. **J. Bacteriol.**, **143**: 148-157.
- MEAS, R.; SILVA, R. M.; GOMES, T. A. T.; TRABULSI, L. R. & MAAS, W. K., 1985. Detection of genes for heat-stable enterotoxin I in *Escherichia coli* strains isolated in Brazil. **Infect. Immun.** **49**: 46-51.

- MERSON, M. H.; ORSKOV, I.; SACK, R. B.; HUG, I. & KOSTER, F. T., 1979. *Infect. Immunol.*, **23**:235-229.
- METACALFE, J.; STOK, M. K. & INGERMAN, R. L., 1986. Development of the embryo New York, pg376.
- MILCH, H., NIKOLNIKOU, S. & CZIROX, 1984. *E coli* V plasmid and their role in pathogenicity. *Acta Microbiol Hung.*, **31** (2): 117-125.
- MILLER, J. H., 1972. Experiments in molecular biology. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.
- MOLL, A.; MANNING, P. A. & TIMMIS, K., 1980. Plasmid determined resistance to serum bactericidal activity; a major outer protein, the *tra T* gene product, is responsible for plasmid- specified serum resistance in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **28**: 357-367.
- MOLL, A.; CABELLO, F. & TIMMIS, K., 1979. Rapid assay for the determination of bacterial resistance to the lethal activity of serum. *Fem. microbiol. Letters*, **6**: 273-276.
- MOOI, F. R. & de GRAAF, F. K. 1985. Molecular biology of fimbriae from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **118**:119-138.
- MOOI, F. R.; de-GRAAF, F. K. & VAN EMBDEN, J. D. A., 1979. Cloning mapping and expression of the genetic determinant that encodes for the K88 antigen. *Nucleic Acid Res.*, **6**: 849-865.
- MOON, H. W.; WIPP, S. C.; ARGENZIO, R. A.; LEVINE, M. M. & GIANELLA, R. A., 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestins. *Infect. Immunol.*, **41**: 1340-1351.
- MORRIS, J. A., THORNS, C.; SCOTT, A. C.; SOJKA, W. J. & WELLS, G. A., 1982. Adhesion in vitro and in vivo associated with an adhesive antigen (f41) produced by a K99 mutant of the reference strain *Escherichia coli* B41. *Infect. Immunol.*, **36**: 1146-1153.
- MORRIS, J. A.; THORNS, C. J. & SOJKA, J., 1980. Evidence for two adhesive antigens on the K99 reference strain *Escherichia coli* B41. *J. Gen. Microbiol.*, **118**: 107-113.
- MOSELEY, S. L.; HARDY, J. W.; ECHEVERRIA, P. & FALKOW, S. 1983. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **39**: 1167-1174.
- NATARO, J. P.; BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; BLACK, R. E.; BRAVO, N. & LEVINE, M. M., 1985. Detection of adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. *J. Infect. Dis.*, **152**: 560-565.
- NATARO, J. P.; DENG, Y.; MANEVAL, D. R.; GERMAN, A. L.; MARTIN, W.C. & LEVINE, M. M., 1992. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect. Immun.*, **60**: 2297-2304.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V.; VIAL, P. & LEVINE, M. M., 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediat. Infect. Dis. J.*, **6**:829-831.

- NAVEH, M. W.; ZUSMAN, T.; SKUTELSKY, E. & RON, E. Z., 1984. Adherence pili in avian strains of *Escherichia coli*: Effect on pathogenicity. **Avian Dis.**, **28**: 651-661.
- NEILANDS, J. B., 1981. Microbiol iron compounds. **Ann. Rev. Biochem.**, **50**: 715-731.
- NOLAN, L. K.; WOOLEY, R. E. & COOPER, R. K., 1992. Transposon mutagenesis used to study the role of complement resistance in the virulence of an avian *Escherichia coli* isolate. **Avian Diseases**, **36**: 398-402.
- NOLAN, L. K.; WOOLEY, R. E.; GIDDINGS, C. W. & BROWN, J., 1994. Characterization of an avirulent mutant of a virulent avian *Escherichia coli* isolate. **Avian. Dis.**, **38**: 146-150.
- O'BRIEN, A. D. & HOLMES, R. K., 1987. Shiga and Shiga-like toxins. **Microbiol. Rev.**, **51**: 206-220.
- O'BRIEN, A. D.; LIVELY, T. A.; CHEN, M. E.; ROTHMAN, S. W. & FORMAL, S. B., 1983. *Escherichia coli* 0157:H7 strains associated with hemorrhagic colits in the United States produced a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like citotoxin. **Lancet**, **I**: 702.
- O'BRIEN, A. D.; NEWLEND, J. W.; MILLER, S. F.; HOLMES, R. K.; SMITH, H. W. & FORMAL, S. B., 1984. Shiga-like toxin converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colits of infantile diarrhea. **Science**, **226**: 694-696.
- OGATA, R.T., WINTERS, C., LEVINE, R.P. 1982. Nucleotide sequence analysis of the complement resistance gene from plasmid R100. **J. Bacteriol.**, **151** (2): 819-829.
- OLLING, S., 1977. Sensitivity of Gram-negative bacillus to the serum bactericidal activity a marker of the host parasite seldoms strip in acute and persisting infection. **J. Infect. Dis.**, **10**: 1-40.
- ONDORFF, P. E.; SPEARS, P. A.; SCHAUER, D. & FALKOW, S., 1985. Two models of control pil A, the gene encoding type 1 pilin in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, **164**: 321-330.
- ORAJARA, L. J. E. & MOHAN, K., 1986. *Escherichia coli* serotypes isolated from deaded in shell chickens embryos from Nigeria. **Bull. Anim. Hith. Prod. Afr.**, **34**: 139-141.
- ORSKOV, F.; ORSKOV, I.; EVANS, D. J.; SACK, D. A. & WADSTROM, T., 1976. **Med. Microbiol. Immunol.**, **162**: 73-80
- ORSKOV, I. & ORSKOV, F., 1977. **Med. Microbiol. Immunol.**, **163**: 99-110
- OTTO, G. B.; IVAN, M.. *Imunologia basica e aplicada* Rio de Janeiro, Editora Guanabara, pag 497, 1990.
- PARRY, S. H. & ROOKE, D. M., 1985. Adhesins and colonization factors de *Escherichia coli*. In SUSSAN, M., ed. *The virulence of Escherichia coli*. **Orlando, Academic Press**, 79-155.

- PATHAK, R. C.; SINGH, C. M. & TANGRI, R. P., 1960. Chick mortality and the contamination of yolks by members of the enterobacteriaceae. **Brith**, **16**: 81-84
- PATTEN, B. M., 1957. Early embriology of chicken 4ed New York
- PAYNE, S.M., 1980. Synthesis and utilization of sideroplores by *Shigella flexnery*. **J. Bacteriol.**, **143**; 1420-1424.
- PICKETT, C. L.; TWIDDY, E.,M.; BELISLE, B. W. & HOLMES, R. K., 1986. cloning of genes that encode a new heat- labele enterotoxins of *Escherichia coli*. **Baterial** , **165**: 348-352.
- PLUSCHK, G.; MAYDEN, J.; ACHATMAN, M. AND LEVINE, R. P., 1983. Role of capsule and the antigen in resistance of O18:K1 *Escherichia coli* complement mediated killing. **Infect. Immun.**, **42**: 907-913.
- POLOTSKY, Y. U. E.; DRAGUNSKAYA, E. M.; SELIVERSTOVA, V. G.; AVDEEVA, T. A.; CHAKHUTINSKAYA, M. G.; KÉTYI, I.; VERTENYI, A.; RALOVICH, B. EMODY, L.; MALOVICS, I.; SAFANOVA, N. V.; SNIGIREVSKAYA, E. S. & KARYAGINA, E. L., 1977. Pathogenic effect of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Escherichia coli* causing infantile diarrhoea. **Acta. Microbiol. Hung.**, **24**: 221-236
- POURBAKSH, S. A. and FAIRBROTHER, J. M., 1994. Purification and characterization of ;P-fimbriae from an *Escherichia coli* strains isolated from a septicemic turkey. **FEMS.MICROBIOL LETTERS**, **122**: 313-318.
- RAMPHAL, R.; SADOFF, J. C. PYLE, M. & SILIPIGNI, J. D., 1984. Role of pili in the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to injured tracheal epithelium. **Infect. Immun.**, **44**:38-40.
- REED, L. J. & MUENCH, H., 1938. A simple method for estimativy fifty per cent and points. **Am. J. Hyg.**, **27**: 493-497.
- REEVES, P., 1972. The bacteriocins. In: KLEINZELLER, A.; SPRINGER, G.F.; WITTMANN, H. G. eds. **Molecular Biology Biochemistry and Biophysics** N. Y. Springer Verlag, p 1-142.
- REMIS, R. S.; Mac-DONALD, K. L.; RILEY. L. W.; PUSH, N. D.; WELL, J. D.; DAVIS, B. R.; BLAK, P. A. & COHEN, M. L., 1984. Sporadic cases of hemorrhagic colits associated with *Escherichia coli* O157:77. **An. Intern. Med.**, **101**: 624-626.
- RICE, P. A.& KASPER, D. Characterization of gonoccal bactericida in dissiminated infection. The role gonococcal endotoxin. **J. Clin. Invest.**, **60**: 1149.
- RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D.; MAGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T.; BLAKE, P. A. & COHEN, M. L.'1982. Hemorrhagic colits associated with rare *Escherichia coli* serotypes. **N. Engl. J. Med.**, **308**: 681-685.
- ROGERS, A., I., 1983. Iron-binding catechols and virulence in *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **7**: 445-456.

- ROSEMBERG, S. S. C.; FRIES, P. A. & WILSON, P. A., 1985. In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli* I. Serotypes metabolic activity and antibiotic sensitivity. **Avian Dis.**, **29**: 1094-1097.
- ROSEMBERG, S. S. C.; FRIES, P. A.; COLD, S. S. & NILSON, R. A., 1985. In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli* II. Factor associated with pathogenicity. **Avian Dis.**, **29**: 1094-1107.
- ROTHBAUM, R.; Mc ADANS, A. J.; GIANELLA, R. & PARTIN, J. C., 1982. A clinicopathologic study of enterocyte-adherent *Escherichia coli*: a cause of protracted diarrhea in infants. **Gastroenterol.**, **83**: 441-454.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. & MANIATES, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual 2 ed. New York, Cold Spring Harbor Press.
- SAVARINO, J. F.; FASANO, A.; ROBERTSON, D. C. & LEVINE, M. M., 1991. Enteraggative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. **J. Clin. Invest.**, **87**: 1450-1455.
- SAVARINO, J. F.; FASANO, A.; WATSON, J.; MARTIN, B. M.; LEVINE, M. M. GUANDALINE, S. & GUERRY, P., 1993. Enteraggative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin-I represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, **90**:3093-3097.
- SAVOV, D., 1963. Studies on colisepticemia in chickens. **Arch. Exp. Vet. Med. Ass. Zarasparzite-Bolest, Sophia**, **9**: 97.
- SCALETSKY, I. C. A.; SILVA, M. L. M. & TRABULSI, L. R., 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to Hella cells. **Infect. Immun.**, **45**: 534-536.
- SCHIMONISHI, Y.; HIDAKA, Y. KOIGUMI, M; HAME, M.; AIMOTO, S.; TAKEDA, K.; MIWLANI, T. & TOLEDO, Y., 1987, Mode of disulfide bond formation of a heat-stable enterotoxin (STH) produced by a human strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEBS Letter** **215**: 165- 170.
- SCHLTER, K. & NOMURA, M., 1976. Colicin E2 is a DNA, **Proc. Natl. Acad Sci., USA**. **73**: 3989-3993.
- SCHNAITMAN, C. A., 1971. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by triton X100. **J. Bacteriol**, **108**: 545-552
- SCHWIRING, C., 1982. New era vaccination. **Nature**, **296**: 792.
- SCOTLAND, S. M. 1988. Toxins. **J. Appl. Bacteriol.** **5**: 1055-1295.
- SCOTLAND, S. M.; SMITH, H. R. & ROWE, W., 1985 Two distinct toxins active in Vero cells from *Escherichia coli* O157:H7. **Lancet II**, 885-886.
- SCOTLAND, S. M.; SMITH, H. R. WILLSHAW, G. H. & ROWE, B., 1983. Vero citotoxin production in strains of *Escherichia coli* is determined by genes carried of bacteriophage. **The Lancet**, **II**, 216-224.

- SCOTLAND, S. M.; SMITH, H. R.; SAID, B.; WILLSHAW, G. A.; CHEASTY, T. & ROWE, B., 1991. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in Britain as enteroaggregative or as members of a subclass of attaching and effacing *E. coli* not hybridising with the EPEC adherence-factor probe. **J. Med. Microbiol.**, **35**: 278-273.
- SERENEY, B., 1955. Experimental *Shigella* heteroconjunctivitis. A preliminary report. **Act. Microbiol Acad. Sci. Hung.**, **2**: 293-296.
- SILVEIRA, W. D.; FANTINATI, F. & PESTANA de CASTRO, A. F., 1994. Transposon mutagenesis and membrane protein studies in an avian colisepticemic *Escherichia coli* strains. **Brazil. J. Genetics.**, **17**: 9-14.
- SMITH, H. W., 1974. A search for transmissible pathogenic characteristics, invasive strains of *Escherichia coli* the discovery of a plasmid-controlled toxin and a plasmid-controlled lethal character closely associated, or identical with colicine V. **J. Gen. Microbiol.**, **83**: 95-111.
- SMITH, H. H. & GYLES, G. L. 1970. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. **J. Med. Microbiol.** **3**: 387-401.
- SMITH, H. W. & HUGGINS, M. B., 1976. Further observations on the association of the colicine V plasmid of *Escherichia coli* with pathogenicity and with survival in the alimentary tract. **J. Gen. Microbiol.**, **92**: 335-350.
- SMITH, H., R.; SCOTLAND, S. M.; CHART, H. & ROWE, W., 1987. Vero cytotoxin production and presence of VT genes in strains of *Escherichia coli* and *Shigella*. **FEMS Microbiol. letters**, **42**:173-177.
- SMITH, N. W. & SACK, R. B. 1973. Immunologic cross-reactions of enterotoxins from *Escherichia coli* and *Vibrio Cholerae*. **J. Infect. Dis.** **127**: 164-170.
- SO, M. & MACARTHY, B. J., 1980. Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Proc. Natl. Sci. USA**, **77**: 4011-4015.
- SOJKA, W. J. & CARNAGHAN, R. B. A., 1961. *Escherichia coli* infection in poultry. **Res. Vet. Sci.**, **2**:340-351.
- SPICER, E. K. & NOBLE, J. A., 1982. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin-nucleotide sequence of the subunit gene. **J. Biol. Chem.**, **257**: 5716-5731.
- SRINIVASAN, V. A.; BARONI, M. U. & KALARARA, D., 1979. Isolation of different *Escherichia coli* serotypes from colisepticemia in poultry. **Indian Veter. J.**, **56**: 629.
- STUART, P.; GREENWOOD, K. T. & LUKE, R. K. J., 1980. Hydroxamate-mediated transport of iron controlled by Col V plasmids. **J. Bacteriol.**, **143**: 35-42.
- SUWANICHKUL, A. & PANIGRAHY, B., 1986. Biological and immunological characterization of pili of *Escherichia coli* serotypes O1, O2 and O78 pathogenic to poultry. **Avian Dis.**, **30**: 781-787.
- SVANBORG-EDEN, C.; HAGBERG, L. & HANSON, L. A., 1983. Bactericidal adherence a pathogenic mechanism in urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. **Progress in Allergy**, **33**: 175-188.

- SCOTLAND, S. M.; SMITH, H. R.; SAID, B.; WILLSHAW, G. A.; CHEASTY, T. & ROWE, B., 1991. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in Britain as enteroaggregative or as members of a subclass of attaching and effacing *E. coli* not hybridising with the EPEC adherence-factor probe. **J. Med. Microbiol.**, **35**: 278-273.
- SERENEY, B., 1955. Experimental *Shigella* heteroconjunctivitis. A preliminary report. **Act. Microbiol Acad. Sci. Hung.**, **2**: 293-296.
- SILVEIRA, W. D.; FANTINATI, F. & PESTANA de CASTRO, A. F., 1994. Transposon mutagenesis and membrane protein studies in an avian colisepticaemic *Escherichia coli* strains. **Brazil. J. Genetics.**, **17**: 9-14.
- SMITH, H. W., 1974. A search for transmissible pathogenic characteristics, invasive strains of *Escherichia coli* the discovery of a plasmid-controlled toxin and a plasmid-controlled lethal character closely associated, or identical with colicine V. **J. Gen. Microbiol.**, **83**: 95-111.
- SMITH, H. H. & GYLES, G. L. 1970. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. **J. Med. Microbiol.** **3**: 387-401.
- SMITH, H. W. & HUGGINS, M. B., 1976. Further observations on the association of the colicine V plasmid of *Escherichia coli* with pathogenicity and with survival in the alimentary tract. **J. Gen. Microbiol.**, **92**: 335-350.
- SMITH, H., R.; SCOTLAND, S. M.; CHART, H. & ROWE, W., 1987. Vero cytotoxin production and presence of VT genes in strains of *Escherichia coli* and *Shigella*. **FEMS Microbiol. letters**, **42**:173-177.
- SMITH, N. W. & SACK, R. B. 1973. Immunologic cross-reactions of enterotoxins from *Escherichia coli* and *Vibrio Cholerae*. **J. Infect. Dis.** **127**: 164-170.
- SO, M. & MACARTHY, B. J., 1980. Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Proc. Natl. Sci. USA**, **77**: 4011-4015.
- SOJKA, W. J. & CARNAGHAN, R. B. A., 1961. *Escherichia coli* infection in poultry. **Res. Vet. Sci.**, **2**:340-351.
- SPICER, E. K. & NOBLE, J. A., 1982. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin-nucleotide sequence of the subunit gene. **J. Biol. Chem.**, **257**: 5716-5731.
- SRINIVASAN, V. A.; BARONI, M. U. & KALARARA, D., 1979. Isolation of different *Escherichia coli* serotypes from colisepticemia in poultry. **Indian Veter. J.**, **56**: 629.
- STUART, P.; GREENWOOD, K. T. & LUKE, R. K. J., 1980. Hydroxamate-mediated transport of iron controlled by Col V plasmids. **J. Bacteriol.**, **143**: 35-42.
- SUWANICHKUL, A. & PANIGRAHY, B., 1986. Biological and immunological characterization of pili of *Escherichia coli* serotypes 01, 02 and 078 pathogenic to poultry. **Avian Dis.**, **30**: 781-787.
- SVANBORG-EDEN, C.; HAGBERG, L. & HANSON, L. A., 1983. Bactericidal adherence a pathogenic mechanism in urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. **Progress in Allergy**, **33**: 175-188.

- TACKET, C. O.; MANEVAL, D. R. & LEVINE, M. M., 1987. Purification morphology and genetics of a new fimbrial putative colonization factor enterotoxigenic *Escherichia coli* O159:H4. **Infect. Immun.** **55**: 1063-1069.
- TAYLOR, P. W., 1983. Bactericidal and bacteriolytic of serum against Gram-negative bacteria. **Microbiol. Reviews**, **47**:46-83.
- TAYLOR, P. W., 1976. Bactericidal and bacteriolytic of serum against Gram-negative bacteria. **Microbiol. Reviews**, **47**: 46-83.
- TAYLOR, P. W. & KROLL, A. L., 1985. Effect of lethal doses of complement on the functional integrity of target enterobacteria. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, **121**: 135-138.
- TAYLOR, R. K.; MANOIL, C. & MEKALANOS, J. J., 1989. Broad-host-range vectors for delivery of Tnp_{phoA}: Use in genetic analysis of secreted virulence determinants of *Vibrio cholerae*. **J. Bacteriol.**, **171**: 1870-1878.
- THOMAS, L. V.; CRAVIOTO, A.; SCOTLAND, S. M. & ROWE, B., 1981. New fimbrial antigenic type (E8775) that may represent a colonization factor in enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans. **Infect. Immunol.**, **35**: 1119-1124.
- THOMPSON, M. R. & GIANELLA, R. A. 1985. Revised amino acid for a heat stable enterotoxin produced by an *Escherichia coli* strain (18D) that is pathogenic for humans. **Infect. immunol.**, **47**:834-836.
- TIMMIS, K. N.; BOULNOIS, G. J.; BITTER-SUERMAN, D. & CABELLO, F. C., 1985. Surface components of *Escherichia coli* that mediate resistance to the bactericidal activities of serum and phagocytes. Gentical approaches to microbial pathogenicity. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, **118**: 197-218.
- TIMMIS, K. N.; MANNING, P. A.; ECHARTI, C.; TIMMIS, J. K. & MOOL, A., 1981. resistance in *Escherichia coli*. In molecular biology, pathogenicity and ecology of bacterial plasmid. S. B. LEVY, R. C. CLOWES AND KONING, E. L. eds Plenum Press New York 1991; 133-134.
- TRABULSI, L. R.; FERNANDS, M. R. F. & ZULIANI, M. E., 1967. Novas bactérias patogênicas para o intestino do homem. **Rev. Inst. Trop. São Paulo**, **9**: 31-39.
- TRUSCOTT, R. B., 1973. Studies on the chicken-lethal toxin of *Escherichia coli*. **Can. J. Comp. Med.**, **38**: 160-167.
- TSAI, C. M. and FRASH, G. E., 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem.**, **119**: 115-119.
- TSUJII, T.; JOYA, J. E.; HONDA, T. & MIWATANI, T., 1988. Purification and characterization, of heat-labile enterotoxin isolated from chicken enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, **52**: 79-84.
- ULSHEN, M. H. & ROLLO, J. L., 1980. Pathogenesis of *Escherichia coli* gastroenteritis in man: another mechanism. **N. Engl. J. Med.**, **302**: 99-101
- Van den BOSCH, J.F., HENDRIKS, J. . I. M GLADIGAU, I.; WILLIAMS, H. M. C. , STORM, P. K., & de-GRAAF, F. K., 1993. Identification of F11 fimbriae on chicken *Escherichia coli* strains. **Infect Immun.**, **61**: 800-806

- Van DIE, I.; WAUBEN, M.; Van MEGEM, I. & BERGMANS, H., 1988. Genetic manipulation of major P-fimbrial subunits and consequences for formation of fimbriae. **J. Bacteriol.**, **170** (12): 5870-5876.
- Van DIE; VAN MEGEM I, HOCHSTRA, W. & BERGMANS, H., 1985. Molecular organization of the genes involved in the production of fimbriae causing mannose resistant hemagglutination of a uropathogenic *Escherichia coli* O6:H1:F7 strains. **MGG**, **194**: 528-533.
- VERMA, R., 1983. *Escherichia coli* strains isolated from yolk-sac infection in baby chickens. **Indian J. Anim. Sci.**, **53**: 686-687.
- VIDOTTO, M. C.; MULLER, E. E.; FREITAS, J.C.; ALFIERI, A. A.; GUIMARÃES, I. G. & SANTOS, D. S., 1991. Virulence factors of avian *Escherichia coli*. **Avian dis.** 34-38
- VIDOTTO, M. C.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C.; ALFIERI, A. A. GUIMARÃES, I. G. & SANTOS, D. S., 1990. Virulence factor of avian *Escherichia coli*. **Avian dis.**, **34**: 531-538.
- WANGER, A. R.; MURRAY, B. E.; ECHEVERRIA, P.; MATHEWSON, J. J. & DUPONT, H. L., 1988. Enteroinvasive *Escherichia coli* in travelers diarrhea. **J. Infect. Dis.**, **158**: 640-642.
- WATANABE, M.; REIKO, H.; & TAKAPE, K., 1983. Serological of *Escherichia coli* strains isolated from chickens affected with colibacillosis. **J. Bacteriol.**, **29**: 29-35.
- WEIKEL, C. S.; NELLANS, H. N. & GUERRANT, R. L., 1986. In vivo and in vitro effects of a novel enterotoxin Stb, produced by *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.** **153**: 893-901.
- WEINBERG, E. D., 1984. Iron withholding: A defense against infection and neoplasia. **Physiol. Rev.**, **64**: 65-102.
- WEINBERG, E. D., 1977. Infection and iron metabolism. **Am. Clin. Nutr.**, **30**: 1485-1490.
- WHIPP, S.; MOON, H. W. & ARGENZIO, R. A. 1981. Comparison of enterotoxic activities of a heat-stable enterotoxin from class 1 and class 2 *Escherichia coli* of swine origin. **Infect. Immunol.** **31**: 245-251.
- WILLIAMS, P. H., 1979. Novel iron uptake system specified by col-V plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **26**: 925-932.
- WILLIAMS, P. H. & ROBERTS, M., 1989. Iron scavenging in the pathogenesis of *Escherichia coli*. In: HOPWOOD, D. A. & CHATER, K. E., ed. *Genetics of Bacterial Diversity*. London, Academic Press cap. 16, 331-350.
- WILLIAMS, P. H. & WARNER, P. J., 1980. Col V plasmids-mediated, colicin V independent iron uptake system of invasive strains of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **29**: 411-416.

- WOOLEY, R. E. ; SPEARS, K. R.; BROWN, J.; NOLAN, L. K. & DEKICH, M. A., 1992. Characteristics of conjugative R-plasmids from pathogenic avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, **36**: 348-352.
- WOOLEY, R. E.; BROWN, J.; GIBBS, P. S.; NOLAN, L. K. & TURNER, K. R., 1993. Effect of normal intestinal flore of chicken on colonization, and mutant colicin-V avian *Escherichia coli*. **Avian Dis.**, **37**: 1092-1096.
- WOOLEY, R. E.; NOLAN, L. K.; BROWN, J.; GIBBS, P. S. & BOUNOUS, D. I., 1994. Phenotypc expression of recombinant plasmids pKT 107 and pHK11 in an avirulent avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, **38**: 127-134.
- YAMAMOTO, T.; GORJOBORI, T. & YOKOTO, T. 1987. Evolutionary origin of pathogenic determinants in enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* 01. **J. bacteriol.** **169**: 1352-1357.
- YAMAMOTO, Y. S.; YOKOTA, E. T. & ECHEVERRIA, P., 1991. Characteristics of the adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to human and animal mucosa. **Infect. Immun.**, **59**: 3722-3739.
- YOUNG, J. D. E., COHN, Z. A. & PODACK, E. R., 1986. The ninth complement and the pore forming protein (perforin) from citotoxic. T cells structural immunochemical and functional similaries. **Science**, **223**: 184-190.
- ZAHADEH, A. H., 1987. Studies on the problem of onphalitis in baby chickens. I on the role of *Escherichia coli* 078:K80. **J. Egypt Vet. Med. Ass.**, **47**: 511-519.