

UNIVERSIDADE ESTADUAL de CAMPINAS

SECRETARIA  
DE  
PÓS-GRADUAÇÃO  
L. B.

INSTITUTO de BIOLOGIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PAULO AFONSO NOGUEIRA

Estudo Comparativo dos Fatores de Virulência e Análises  
Eletroforéticas de Plasmídios, DNA "Fingerprinting" e  
Proteínas de Membrana e Superfície de isolados de  
Escherichia coli Uropatogênicas

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Bioquímica do  
Instituto de Biologia para obtenção  
do título de Mestre em Ciências  
Biológicas na área de Bioquímica

Este exemplar corresponde à redação final  
tese defendida pelo(a) candidato(a)

*Paulo Afonso Nogueira*  
*U. Silveira*

aprovada pela Comissão Julgadora.

Orientador : Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Campinas 1994

N689e

23658/BC

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

## DEDICO

A minha esposa PATRÍCIA por todo amor e carinho, força de vontade, espírito vencedor e independência que encontrei numa só mulher. E dessa aliança, a gente colhe os frutos, a criança mais linda e generosa que eu já tive o prazer de conviver, meu filho THIAGO a quem eu também dedico.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço ao Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira por todos os ensinamentos recebidos e pela possibilidade de trabalhar num Laboratório de Excelência.

Agradeço eternamente ao Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira pelo companherismo deste senhor que não faz distinção a nenhum de seus alunos, e que, hoje, sou o que sou graças aos seus incentivos e conselhos. Sinto-me um privilegiado por ter iniciado a minha vida acadêmica seguindo seus exemplos e considero-o como meu "Mentor Espiritual".

Ao Prof. Br. Hiroshi pela amizade e pela sua insistência em favor dos Pós-graduandos da Bioquímica para o credenciamento do Curso junto ao MEC.

Ao Prof. Benedito agradeço pela aprecação e pelas críticas construtivas referentes à pré-banca.

Ao pessoal do Laboratório de Bacteriologia Fitopatológica do Instituto Biológico, Júlio, Beriam, Irene, Waldemar e Moaçira, por todos os ensinamentos que recebi, a amizade e convivência que me deixa com saudades.

Ao amigo Mauro, pela amizade que começou desde o nosso ingresso no curso de Pós-graduação.

A meus pais que me proporcionaram os estudos para que eu pudesse chegar aonde estou.

Aos colegas do Laboratório, Fabiana, Paulo Moreti, Sérgio, Edymir, Palma que mesmo entre algumas desavenças, nós nos mantivemos como um grupo.

Ao Marcelo Brochi, desejo-lhe toda a felicidade com sua esposa.

Ao amigo Celso Benedetti, que a muito tempo não me comunico, toda sorte do mundo.

À Andreia da secretaria de Pós-graduação da Bioquímica, muito obrigado pela força.

À Eni, agradeço pela grande força que você nos dá.

E a vocês Pat e Thiago, agradeço por ter vocês dois perto de mim.

## RESUMO

Esta dissertação teve como objetivo principal estudar as linhagens de Escherichia coli uropatogênicas que representam a forma mais frequente de infecções extraintestinais em mamíferos. Dezoito cepas uropatogênicas de E. coli, isoladas no Hospital de Clínicas da UNICAMP, foram utilizadas para o estudo comparativo de características genéticas associadas à patogenicidade. Estes ensaios genéticos compreenderam a expressão de fímbrias, a adesão em células uroepiteliais, produção de hemolisinas, análises eletroforéticas de proteínas de superfície e de membrana em géis de poliacrilamida/SDS, presença de plasmídios e produtos de reação da técnica de PCR - DNA Fingerprinting (RAPD). Dentre os resultados obtidos destacam-se: 1) a capacidade da maioria das cepas uropatogênicas em aderir a células uroepiteliais; 2) a presença de plasmídios de diferentes pesos moleculares em praticamente todas as cepas; 3) não uniformidade na expressão de determinados fatores de virulência, como por exemplo, fímbrias e hemolisinas; 4) similaridade em todos os perfis eletroforéticos de proteínas de membrana; e 5) classificação das linhagens em grupos determinados com base nos perfis eletroforéticos de proteínas de superfície; 6) a diferenciação das linhagens através da técnica de PCR - DNA Fingerprinting com o primer utilizado não foi possível.

## SUMMARY

This work had as main objective to study Uropathogenic Escherichia coli strains, that represent the most frequent form of extraintestinal infection in mammalian species. Eighteen uropathogenic E. coli strains isolated at the Medical School of Universidade Estadual de Campinas were utilized for comparative studies of genetic characteristics associated to the pathogenicity. The genetic traits comprised expression of fimbriae, intensity of adhesion on uroepithelial cells, production of hemolysins, electrophoretic analysis of surface and outer membrane proteins in SDS/PAGE, presence of plasmids and products of PCR - DNA Fingerprinting (RAPD). Among the obtained results we could detach: 1) capacity of the majority of the strains to adhere to uroepithelial cells; 2) presence of plasmids with different molecular weights in all strains; 3) differences at the expression of virulence factors as fimbriae and hemolysins; 4) similarity of outer membrane proteins in profile SDS/PAGE; 5) classification of the strains in groups according to the electrophoretic profile of surface proteins; and 6) the differentiation of strains through PCR - DNA - Fingerprinting was not possible.

## ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 - O gênero <i>Escherichia coli</i>	3
2.2 - Linhagens de <i>Escherichia coli</i>	6
2.3 - <i>Escherichia coli</i> UROPATOGÊNICAS	13
2.3.1 - Fatores de Virulência - UPEC	15
2.4 - TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO BACTERIANO	17
2.4.1 - Perfil Plasmidial	17
2.4.2 - Proteínas de Membranas	18
2.4.3 - Proteínas de Superfície	19
2.5 - PCR Fingerprinting - RAPD	20

3 - MATERIAL e MÉTODOS	24
3.1 - Linhagens de Escherichia coli Uropatogênicas	24
3.2 - Os meios de cultura	25
3.3 - Teste de Adesão a Células Uroepiteliais	27
3.4 - Solução de Alsevier	28
3.4.1 - Teste de Hemaglutinação em lâmina	28
3.5 - Teste de Hemolisina	29
3.6 - Soluções empregadas na extração de proteínas memb.	30
3.7 - Extração de proteínas de membrana	31
3.8 - Soluções empregadas na Extração de Prot. superf.	33
3.9 - Extração de proteínas de superfície	34
3.10 - Soluções de Preparo dos Géis de polia	35
3.11 - Eletroforese de Proteínas	36
3.12 - Marcadores de Pesos Moleculares para SDS-PAGE	38
3.13 - Soluções para Coloração de prata	38
3.14 - Soluções para extração de plasmídeo	40
3.15 - Extração de plasmídios	42
3.16 - Reagentes para reação de PCR - RAPD	43
3.17 - Teste de RAPD - DNA - Fingerprinting	44



4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 - Teste de Adesão	46
4.2 - Teste de Hemaglutinação	48
4.3 - Teste de Hemolisina	50
4.4 - Perfil Plasmidial	52
4.5 - Perfil de Proteínas de Membranas	53
4.6 - Perfil de Proteínas de Superfície	57
4.7 - PCR - DNA Fingerprinting (RAPD)	61
5 - BIBLIOGRAFIA	68

## 1 - INTRODUÇÃO

As infecções intestinais em humanos são causadas principalmente por bactérias da família Enterobacteriaceae, entre as quais destacam-se Escherichia coli, Salmonella, Shigella e Yersinia. As infecções do trato urinário (ITU) são as formas de infecções extraintestinais mais frequentes e, a bactéria Escherichia coli é o patógeno mais comum (JOHNSON 1991).

As doenças diagnosticadas no trato urinário resumem-se em pielonefrite aguda, induzida por uma infecção nos rins; cistite aguda, infecções limitadas à bexiga urinária; e bacteriúria, manifestada apenas pela presença de bactérias na urina (HAGBERG et al., 1981).

Entre os fatores de virulência das Escherichia coli de infecções extraintestinais destacam-se as fímbrias tipo 1 e tipo P, entre outras, e que promovem a adesão às células uroepiteliais dos hospedeiros. Hemolisinas que são toxinas citotóxicas e fator necrosante citotóxico (CNF), que provoca a dermonecrose "in vivo" e multinucleação em células cultivadas "in vitro", também são importantes fatores de virulência (CAPRIOLI et al., 1987).

Até hoje, a classificação das linhagens bacterianas de Escherichia coli se faz pela determinação de sorogrupos e sorotipos, através de reações sorológicas contra os três antígenos ocorrentes na espécie, O, K e H (TRABULSI, 1989).

Recentemente, porém, outros métodos de tipagem molecular foram desenvolvidos com a finalidade de comparar as diferentes linhagens isoladas de casos de infecções. Entre estes novos métodos destacam-se a análise de perfil eletroforético de

plasmídios e proteínas de membrana, "imunoblotting" e análise de fragmentos de restrição de DNAs plasmidial e cromossômicos (PFALLER & HOLLINS 1989) e, mais recentemente, RAPD - "Random Amplified Primer DNA", isto é, amplificação de segmentos de DNA aleatórios através de "primers" inespecíficos (AKOPYANZ et al., 1992).

Assim sendo, este trabalho teve como principal objetivo a caracterização de linhagens de Escherichia coli uropatogênicas isoladas de pacientes do Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) através de: (1) Determinação da capacidade de adesão "in vitro" a células uroepiteliais e expressão de possíveis fatores de adesão; (2) - Detecção de possíveis toxinas como por exemplo as hemolisinas; (3) utilização de eletroforese para detectar proteínas estruturais localizadas na membrana e na superfície externa bacteriana em gel de poliacrilamida/SDS, presença de DNAs plasmidiais e fragmentos amplificados por PCR DNA - Fingerprinting em gel de agarose.

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - O gênero Escherichia coli e sua patogenicidade.

A bactéria Escherichia coli era conhecida apenas como um bacilo gram negativo residente no trato intestinal de pessoas sadias. Entretanto, em 1940, após uma epidemia de diarreia em crianças recém-nascidas, a bactéria Escherichia coli foi reconhecida como a causadora dessa doença (BRAY 1945).

Pertencente à família Enterobacteriaceae, este anaeróbico facultativo desempenha papel fundamental na fisiologia e manutenção da microbiota intestinal (DRASAR & HILL, 1974).

Entre as patologias causadas por Escherichia coli destacam-se as diarreias e disenterias em mamíferos, como consequência de infecções intestinais e, pielonefrite e cistite devido às infecções no trato urinário. (LEVINE, 1984).

O critério utilizado para identificação das linhagens de Escherichia coli ainda segue o sistema proposto em 1947 por Kauffman, o qual reúne as diversas linhagens em grupos e tipos sorológicos, identificados através da variação de três antígenos de superfície, conhecidos como:

**antígenos O** - também denominados de antígenos somáticos, que correspondem à cadeia de unidades repetitivas de oligossacarídeos, do lipopolissacarídeo presente na membrana externa de bactérias gram-negativas;

**antígenos K** - antígenos capsulares, que representam polímeros lineares compostos de subunidades de carboidratos, muitas vezes associados a aminoácidos e lipídeos;

**antígenos H** - antígenos flagelares, compostos por proteínas denominadas flagelinas. Um dos aspectos importantes deste tipo de antígeno é que eles são encontrados apenas em bactérias móveis.

Atualmente, são conhecidos 171 antígenos O, 100 antígenos K e 57 antígenos H (TRABULSI, 1989).

A patogenicidade de Escherichia coli é complexa e multifatorial. Depende de fatores de virulência que podem atuar, individualmente ou em conjunto, no estabelecimento da infecção (FINLAY & FALKOW, 1989). Entre estes fatores destacam-se:

**Adesinas ou Fímbrias** - apêndices protéicos, localizados na superfície da célula bacteriana, capazes de promover a adesão das bactérias à superfície das células do hospedeiro.

**Toxinas** - moléculas com estruturas complexas, geralmente de caráter proteínáceo, que provocam alterações no metabolismo de células, especialmente as intestinais, gerando um fluxo de íons e água para o lúmen provocando um quadro diarréico.

**Hemolisinas** - toxina citolítica, geralmente de constituição protéica, responsável pela lise de eritrócitos de vários hospedeiros. As hemolisinas mais conhecidas são as alfa e beta.

**Aerobactinas** - são moléculas compostas de hidroxamato com capacidade de se ligarem a íons de ferro por um processo de quelatação, e que estes complexos são absorvidos através de sistemas de canais na membrana bacteriana denominadas de sideróforos.

**Resistência Sérica** - capacidade que as linhagens bacterianas têm de impedir o reconhecimento pelos anticorpos do hospedeiro através da cápsula, lipopolisacarídeos ou proteínas codificadas por plasmídios e que impedem a ativação da reação em cascata do sistema complemento do hospedeiro (JOHNSON, 1991).

O estabelecimento da infecção bacteriana inicia-se, a princípio, com a adesão da bactéria à superfície de uma célula-alvo do hospedeiro. Este processo é fundamental para a colonização de tecidos do hospedeiro, pois mede a habilidade destas bactérias patogênicas em competir com as bactérias comensais da flora normal do hospedeiro. Como particularidade dos patógenos intestinais, o processo de aderência tem, também, a função de resistir aos movimentos peristálticos do intestino e ao fluxo da massa fecal, que servem como um mecanismo de limpeza do lúmen intestinal (GAASTRA & de GRAAF, 1982).

Após a fixação da bactéria no tecido-alvo, o processo infeccioso pode prosseguir por dois caminhos distintos. Assim, linhagens bacterianas que se multiplicam e colonizam a superfície das células do hospedeiro, são classificadas como **não-invasivas**. As linhagens que utilizam a adesão como uma via essencial antes de promover a invasão de tecidos, são classificadas como **invasivas** (FINLAY & FALKOW, 1989 e GAASTRA & de GRAAF, 1982).

Entre as linhagens de E. coli classificadas como não-invasivas destacam-se as enteropatogênicas, enterotoxigênicas, enterohemorrágicas e Enteroagregativas, ligadas às infecções intestinais, (Levine et al., 1987), e as representantes uropatogênicas. Entre as linhagens invasivas salientam-se as Enteroinvasivas, como as únicas da espécie Escherichia coli, e algumas representantes dos gêneros Salmonella spp e Shigella spp.

## **2.2 - Linhagens de Escherichia coli associadas às infecções intestinais**

As infecções bacterianas entéricas representam um dos principais problemas de saúde pública de regiões menos desenvolvidas do mundo, principalmente por serem moléstias que constantemente afetam crianças e adultos (LEVINE, 1983).

As linhagens de Escherichia coli associadas às infecções intestinais constituem um grupo heterogêneo que provocam certas patologias por mecanismos diferentes. Em 1987, Levine e colaboradores propuseram um sistema de classificação destas linhagens de Escherichia coli, separando-as em grupos, que até hoje é utilizado. Este sistema caracteriza-se por distinguir os diferentes tipos de fatores de virulência de cada grupo, as características das suas interações com as mucosas intestinais, as diferentes síndromes clínicas, os estudos epidemiológicos de cada representante e os diferentes sorotipos O e H.

O sistema distingue cinco grandes grupos:

- EPEC - Escherichia coli enteropatogênicas
- ETEC - Escherichia coli enterotoxigênicas
- EHEC - Escherichia coli enterohemorrágicas
- EIEC - Escherichia coli enteroinvasivas
- EAEC - Escherichia coli enteroagregativas

**EPEC - Escherichia coli enteropatogênica**

As linhagens representantes deste grupo são as principais causadoras de diarréia em recém-nascidos, exibindo um dos quadros clínicos mais severos entre todas as Escherichia coli associadas às infecções intestinais (TOLEDO et al., 1983).

As EPECs são atoxigênicas, isto é, não produzem nenhuma das enterotoxinas conhecidas. Levine e colaboradores (1978) demonstraram que estas linhagens eram responsáveis por quadros diarreicos provocados por mecanismos diferentes daqueles já conhecidos, como das ETEC e EHEC.

A partir deste trabalho, os mecanismos de patogenicidade das EPEC foram investigados através de estudos de ultraestrutura de lesões histopatológicas intestinais, os quais mostraram que após a aderência das bactérias nos enterócitos, sucedia a destruição das microvilosidades intestinais. Desta forma, haveria a diminuição da absorção de fluidos pelos enterócitos e, por conseguinte, acarretando um quadro diarreico de caráter não-absortivo, ou seja, independente da ação de enterotoxinas (LEVINE & EDELMAN 1984).



Uma característica marcante exibida pelas EPEC em testes experimentais é a capacidade de adesão localizada em células "Hep 2", não verificada nas linhagens representantes das ETEC, EHEC, EIEC e também nas linhagens da flora normal (CRAVIOTO et al., 1979).

Mais tarde, esta propriedade de adesão em células Hep 2 foi associada a genes localizados em um plasmídio de 60 MDa denominado EAF "EPEC - Adherence Factor". A expressão de genes cromossomais também está envolvida nesta capacidade de adesão (BALDINI et al., 1983; NATARO et al., 1985; JERSE & KAPER, 1991; DONNENBERG & KAPER, 1991).

A nível de microscopia eletrônica, estes fatores permitem a fixação das bactérias à membrana do enterócito, provocando, posteriormente, destruição das microvilosidades e ruptura do citoesqueleto do mesmo.

### **ETEC - Escherichia coli enterotoxigênica**

É o segundo maior grupo associado com quadro de diarreia. Também é uma das maiores causas de diarreia infantil em países subdesenvolvidos. Devido à grande incidência nestes países, estes quadros diarréicos causam certo temor aos turistas oriundos de países do Primeiro Mundo, quando estes visitam estes locais afetados (LEVINE et al., 1983).

Adquiridas através da ingestão de alimentos e águas contaminadas, as linhagens aderem aos enterócitos e proliferam rapidamente, colonizando a superfície do intestino delgado.

Esse grupo compreende as linhagens produtoras das enterotoxinas ST e/ou LT, as quais são as responsáveis pelo quadro de diarreia. Essas toxinas induzem a uma alteração no metabolismo dos enterócitos, que provoca a secreção de íons e fluídos dos tecidos para o lúmen intestinal (LEVINE et al 1983).

As designações ST e LT representam a distinção dessas enterotoxinas quanto à estabilidade uma vez aquecidas a 100°C. A enterotoxina ST permanece ativa mesmo após aquecimento e, em contra partida, a LT torna-se inativa após aquecimento (LEVINE et al, 1983).

Com relação ao processo de adesão das ETECs, várias fímbrias foram reportadas. Em 1961, Orskov et al. descreveram em linhagens de E. coli, isoladas de edemas e enteritis em suínos, um novo antígeno de superfície designado K 88. Estes autores verificaram que as linhagens isoladas de fezes diarreicas de recém-nascidos suínos recém-nascidos compartilhavam este mesmo antígeno K 88. Assim, a habilidade destas linhagens em aderir e colonizar enterócitos foi atribuída a esta adesina.

Mais tarde, em 1972, Smith & Linsgood descobriram que linhagens enteropatogênicas isoladas de fezes diarreicas de bezerro e carneiro e que possuíam diferentes sorotipos O apresentavam um antígeno K em comum. Este foi denominado K 99. Da mesma forma, a habilidade destas linhagens em aderir às superfícies celulares dos hospedeiros também foi atribuída a esta adesina.

Um antígeno similar ao K88 foi detectado posteriormente em ETECs de humanos. Este recebeu a denominação de CFA I (EVANS et al., 1975). Logo depois, uma segunda adesina com propriedades imunogênicas diferentes da anterior foi descoberta, também em linhagens de ETEC de origem humana, e denominada CFA II (EVANS et al., 1980). Mais tarde outras adesinas foram descritas em ETECs de humanos, CFA III (HONDA et al., 1984) e CFA IV (THOMAS et al., 1982).

Assim, entre as fímbrias pertencentes às ETECs mais conhecidas destacam-se: K88 e 987P originárias de isolados de suínos; K99 e F41 originárias de suínos, ovinos e bovinos; e CFA I e CFA II de humanos (GAASTRA & de GRAAF, 1982).

Com relação à expressão destas fímbrias, a temperatura de crescimento em cultura é um dos fatores de regulação de expressão, pois, temperaturas entre 16 - 25°C inibem a expressão enquanto que a 37°C, há expressão das mesmas. Este sistema de regulação de expressão indica que as fímbrias só se expressam eficientemente, se a bactéria estiver no interior de um hospedeiro, onde a temperatura corpórea gira em torno de 37°C, a qual é dificilmente observada no meio ambiente (GAASTRA & de GRAAF, 1982).

Outro sistema de expressão que regula a produção de fímbrias é conhecido como variação de fase. Neste sistema, a existência de uma região promotora, que faz parte de um transposon, pode ser ativada, ou não, dependendo da orientação da mesma. Entre as fímbrias que são reguladas por este sistema de expressão estão a 987P e tipo 1, estando esta última presente na

maioria das linhagens de E. coli, patogênicas ou não (HINSON & WILLIAMS, 1989).

### **EHEC - Escherichia coli Enterohemorrágica**

As linhagens de E. coli do grupo das EHECs não produzem as enterotoxinas ST ou LT, nem apresentam a característica de invasão como forma de infecção. Em contra partida, as EHECs produzem uma citotoxina ativa contra células Vero e Hela, a qual acredita-se estar associado à patogenicidade causada por este tipo de E. coli (RILEY et al., 1982).

O'Brien e colaboradores (1983) mostraram que um antissoro anti-toxina de Shigella dysenteriae I neutralizava a citotoxina das EHECs. Por este fato, a citotoxina ficou conhecida como "Shiga-Like toxin". No entanto, devido ao efeito apresentado em células Vero "in vitro" é também conhecida como verotoxina (SCOTLAND et al., 1985).

A toxina na sua conformação oligomérica é constituída de seis subunidades, sendo cinco (5) subunidades do tipo A e uma (1) do tipo B. A citotoxina age inativando a subunidade ribossomal 60 S (O'BRIEN & HOLMES, 1987).

O quadro clínico exibido pelas EHECs diferencia-se daquele causado por outros grupos de E. coli, por apresentar colite hemorrágica, também conhecida como diarréia sanguinolenta. Foi verificado, também, o envolvimento das EHECs com doenças do sistema urinário (RILEY et al., 1982).

Estudos de ultramicroscopia histopatológica mostram a aderência destas linhagens nos enterócitos com destruição total das microvilosidades. Este efeito se assemelha muito àquele exibido pelas EPECs, todavia, as EHECs se distinguem pela proliferação na lâmina própria e nas criptas glandulares do tecido intestinal (TZIPORI et al., 1986).

Com relação à adesão dessas linhagens em células intestinais, Karch et al. (1987) descreveram a existência de um plasmídeo de 60 MDa, responsável pela produção de uma fímbria não hemaglutinante que a poderia ser responsável pela adesão em células intestinais Henle 407 "in vitro".

#### **EIEC - Escherichia coli Enteroinvasiva**

As linhagens de E. coli representativas deste grupo são invasivas. Este processo se dá pela aderência bacteriana a receptores de membranas das células epiteliais intestinais, seguida de internalização em vesículas formadas por um processo semelhante à endocitose, denominadas "membrane-bound inclusion" (FINLAY & FALKOW, 1989).

Dentro do citoplasma, as linhagens internalizadas escapam destas vesículas pela ação de toxinas semelhantes às hemolisinas. Soltas no citoplasma, elas encontram um ambiente extremamente farto de nutrientes e se proliferam até a completa destruição da célula epitelial. Posteriormente, as bactérias livres no tecido epitelial infectam as células vizinhas causando

ulcerações, secreção de fluidos e inflamação, acarretando, conseqüentemente, uma diarreia com muco e sangue (FINLAY & FALKOW, 1989).

O processo infeccioso das EIECs é semelhante ao da Shigella spp, e é mediado por um plasmídeo de alto peso molecular responsável pela produção de alguns fatores de virulência. Entre estes fatores destacam-se a toxina análoga à hemolisina e proteínas de membranas de caráter imunogênico, que estão envolvidas no processo de invasão (HARRIS et al., 1982).

#### **EAEC - Escherichia coli Enteroagregativas**

As EAECs foram, recentemente, separadas em um quinto grupo dentro das E. coli intestinais associadas com diarreia (BALDWIN et al., 1992). Devido à aderência do tipo agregativo as representantes destes grupo foram referidas como enteroagregativas (JOHN ALBERT et al., 1993).

Embora tendo sido considerada como atoxigênica, Baldwin e colaboradores descreveram a presença de uma toxina citolítica secretada pelas EAECs, com característica antigênica relacionada a uma hemolisina de E. coli.

#### **2.3 - Escherichia coli UROPATOGÊNICAS**

As infecções do trato urinário (ITU) representam um problema significativo na área da saúde mundial e que pode ser exemplificado com os dados obtidos nos EUA onde, anualmente, mais

de cem mil pacientes são hospitalizados por causa de infecções urinárias (JOHNSON & STAMM, 1989).

A incidência destas infecções nas mulheres é maior do que nos homens, ou seja, em toda a vida, entre 10 e 20% das mulheres adquirem as infecções sintomáticas, enquanto que, este percentual nos homens não ultrapassa os 12% (JOHNSON 1991).

Com relação aos quadros clínicos, estas infecções urinárias são classificadas de acordo com o grau de severidade. A síndrome pielonefrite recebe a categoria de infecção muito severa à qual estão associados os sintomas de febre, calafrios e dores nas regiões renais. A cistite é classificada como de severidade moderada ou intermediária, responsável pelos sintomas de edema e dor na região da bexiga, além da frequente sensação de micção. E por último, a bacteriúria classificada como pouco severa e que é responsável por quadros assintomáticos (JOHNSON 1991).

Com relação aos órgãos-alvo de cada um dos dois quadros sintomáticos, a pielonefrite envolve a infecção do trato urinário superior, isto é, os rins e os uretères, enquanto que a cistite está associada ao trato inferior, onde se encontram a bexiga e a uretra (JOHNSON & STAMM, 1989).

Quanto à capacidade de adesão das linhagens uropatogênicas, a prevalência e o número de bactérias aderidas às células uroepiteliais estão associados também ao grau de severidade das síndromes urinárias. Através de testes de adesão em células uroepiteliais coletadas de urina, foi verificado que 70 a 100% dos isolados de pielonefrite tinham a capacidade de

aderir nestas células, com um número médio de 30 bactérias aderidas por célula epitelial. Os isolados de cistite mostraram entre 50 a 60% de bactérias capazes de aderir, com um número médio de 20 bactérias por célula. E, dos isolados de bacteriúria, 22 a 36% foram capazes de aderir, com 10 bactérias aderidas por célula epitelial, em média (HAGBERG, et al., 1981).

### 2.3.1 - Fatores de Virulência - UPEC

As linhagens uropatogênicas distinguem-se dos grupos de Escherichia coli anteriores não só pela patogenicidade ao sistema urinário, mas também por alguns de seus fatores de virulência. O principal fator que as diferencia como uropatogênicas é a presença de uma fímbria hemaglutinante, denominada P.

Também conhecida como uma adesina manose-resistente em testes de hemaglutinação, a fímbria P reconhece receptores específicos de membranas de células uroepiteliais ricos em dissacarídeo galactosídeo. Estes receptores fazem parte do grupo de antígenos do sistema sanguíneo tipo P, presentes nos esfingolipídeos de membranas de células humanas (JOHNSON, 1991).

Estruturalmente, a fímbria P é composta por um extenso polímero constituído de quatro subunidades proteicas. Uma subunidade estrutural "major" que se repete por toda a extensão do filamento, duas subunidades "minor" também estruturais, presentes na região apical do filamento e a subunidade G contendo o sítio de ligação com o receptor, localizado na extremidade da fímbria (JOHNSON, 1991).



Além destas proteínas estruturais, a fímbria P é constituída de um "pool" de proteínas acessórias, que envolve desde proteínas de membranas sensoriais, de carreadoras e de montagem, como também proteínas regulatórias presentes no citoplasma. Assim, a fímbria P compreende um sistema genético do tipo "Operon" (JOHNSON 1991).

A expressão da fímbria P é regulada por condições ambientais ou de cultivo, isto é, é expressa a 37°C quando cultivadas em meio sólido, e inibida quando cultivada entre 18-22°C e em meio líquido (ABRAHAM et al., 1986).

Outras adesinas manose-resistentes também são associadas com as linhagens uroepiteliais. Entre estas adesinas destacam-se as denominadas X, S, M e F1C. Pouco é conhecido a respeito das mesmas (JOHNSON, 1991).

Ainda com relação à propriedade de adesão, as Escherichia coli uropatogênicas possuem fímbrias tipo 1, que ao contrário da fímbria P não hemaglutina eritrócitos de cobaia na presença de manose. Outra particularidade da tipo 1 é a expressão em temperaturas abaixo de 37°C, como por exemplo 20°C.

Outros dois fatores de patogenicidade encontrados nas uropatogênicas são a produção de hemolisinas e citotoxina (CNF). As hemolisinas são responsáveis pela lise de eritrócitos contribuindo para formação de edemas e inflamações nos tecidos epiteliais (CAPRIOLI et al., 1987). Com relação ao fator necrosante, o mesmo apresenta estrutura protéica e atividade citotóxica em células Hela (CAPRIOLI et al., 1983).

## 2.4 - TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO BACTERIANO

Os métodos considerados de rotina envolvem técnicas como antibiograma, biotipagem, sorologia, produção de bacteriocinas e fagotipagem.

Entre as técnicas consideradas como sendo recentes destacam-se as análises eletroforéticas de plasmídios e de proteínas de membranas, detecção de isoenzimas e métodos de "imunoblotting". Tais métodos têm como base a análise de constituintes do citoplasma bacteriano, como por exemplo proteínas estruturais e plasmídios.

Tanto as técnicas de rotina quanto as recentes detectam a expressão de características fenotípicas dos agentes infecciosos.

### 2.4.1 - Perfil Plasmidial

A análise do perfil de DNA plasmidial como técnica de caracterização foi primeiro utilizada por Sadowiski et al. (1979) com isolados de Klebsiella pneumoniae. Estes autores caracterizaram plasmídios R, ditos fatores de resistência.

O princípio que rege o método determina que isolados da mesma cepa que contenham o mesmo número de plasmídios de mesmo pesos moleculares são fenotipicamente idênticos (PFALLER & HOLLINS, 1989).

#### 2.4.2 - Proteínas de Membranas

Boa parte dos trabalhos envolvendo a extração de proteínas de membranas bacterianas segue a metodologia empregada por Schnaitman (1970 & 1971). Esta técnica baseia-se na ruptura das membranas celulares através de vários ciclos de sonicação.

Assim, Miller & Mekalanos (1988), identificaram uma proteína transmembrânica em Vibrio cholerae, envolvida com o mecanismo de virulência da mesma. Esta proteína "Tox R" faz parte de um sistema regulatório/sensorial da bactéria, que permite que a mesma discrimine o meio ambiente do hospedeiro. A proteína funciona como um receptor de membrana a estímulos externos como a alcalinidade do pH gástrico, da temperatura corpórea e da presença de alguns aminoácidos próprios de seu hospedeiro. Desta forma, a Tox R regula a expressão da toxina colérica e proteínas acessórias necessárias tanto para a exportação desta toxina quanto para a formação de fímbria colérica.

Osborn & Wu (1980), publicaram uma revisão sobre as proteínas "formadoras de poros - porinas" em bactérias gram-negativas. Dentre as diversas classes de porinas, foi verificado uma proteína carreadora de maltose que funcionava como receptora de fago lambda, denominada LamB. Da mesma forma que a proteína transmembrânica de Vibrio cholerae, estas proteínas possuem características exclusivas à espécie a qual pertence, dado pela interação específica entre bacteriófagos e a linhagem bacteriana-alvo.

Outro exemplo clássico de proteínas de membranas, envolvidas com a regulação dos mecanismos de patogenicidade bacteriana, é a proteína de Chlammydia spp, um patógeno intracelular de humanos. Esta proteína é rica em resíduos de cisteína e por isso, são hábeis em perceber alterações nos potenciais oxidativos do meio externo. Estas proteínas transmembrânicas apresentam também a função de "porinas" de nutrientes encontrados na célula hospedeira. Assim, perante as variações nestes potenciais oxidativos, as ligações dissulfeto dos resíduos de cisteína alternam-se nas formas oxidadas e reduzidas, provocando modificações conformacionais nestas proteínas, que permitem a passagem de nutrientes para a célula bacteriana (BAVOIL et al., 1984).

Portanto, a utilização de proteínas de membranas como método de caracterização bacteriana apresenta grande viabilidade mediante a existência de proteínas específicas para cada tipo de cepa bacteriana. Nesta área vários autores propuseram a diferenciação inter e intraespecífico utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida (VAISANEN-RHEN et al., 1984; DIJKSHOORN et al., 1990; WALIA et al., 1988; DELMER et al., 1986; BENEDETTI, 1991 e NOGUEIRA & COSTA, 1991).

#### **2.4.3 - Proteínas de Superfície**

A utilização de proteínas localizadas na superfície externa da bactéria como forma de diferenciação bacteriana se

fundamenta principalmente na análise dos componentes estruturais das fímbrias.

Como já mencionados anteriormente, estes componentes estruturais compreendem um número relativamente pequeno de tipos de subunidades (JOHNSON 1991; HANSON et al., 1988; MAURER & ORNDORFF 1987).

Embora existam vários trabalhos que defendam uma forma ancestral comum para as fímbrias, tendo como base as análises de homologias de sequências das subunidades (KLEMM et al., 1985), entende-se que existam diferenças com relação às propriedades fisicoquímicas das subunidades fimbriais, e que estas diferenças acarretam variações tanto inter-específicas como também intra-específicas.

Desta forma, a utilização de análises eletroforéticas destes componentes fimbriais aparece com um importante método de diferenciação intraespecífico, pois, linhagens de Escherichia coli uropatogênicas mostram variações com relação ao tipo e número de fímbrias expressas (LUND et al., 1988 e FINLAY & FALKOW, 1989).

## **2.5 - PCR Fingerprinting - RAPD**

Em 1984, pesquisadores da "Cetus Corporation" desenvolveram uma técnica que promovia a síntese de DNA "in vitro" e denominaram-na de "reação de polimerização em cadeia" (Polymerase Chain Reaction PCR). A técnica que envolve um princípio bastante simples, mas com extrema utilidade, resulta

na amplificação em massa de um sequência de DNA (SAIKI et al., 1985).

Os primeiros experimentos de PCR foram realizados com o fragmento Klenow da enzima DNA polimerase de Escherichia coli na temperatura de 37 °C. Estas reações, embora amplificassem em massa sequências de DNAs, produziam muitas vezes amplificados incompletos (ARNHEIM & ERLICH, 1992). Saiki et al. (1988), isolaram uma DNA polimerase resistente ao calor de uma bactéria termófila chamada Thermus aquaticus. Com a utilização da enzima "Taq", o método de PCR tornou-se automatizado.

Esta metodologia pode ser aplicada em diagnóstico clínico, diagnoses pré-natal e câncer. As diagnoses de doenças infecciosas foram realizadas com parasitas e vírus. Com relação à diagnose viral, os testes tradicionais de diagnóstico utilizados antigamente, eram realizados sorologicamente. Todavia, muitos dos resultados negativos se davam pela não detecção do vírus devido ao estágio de profago que, dependendo do período de incubação do mesmo, poderia levar meses até o aparecimento dos sintomas. Com a utilização de PCR o estágio de profago pôde ser detectável em indivíduos que não mostravam a enfermidade (DeMARCHI, 1990).

Entretanto, Ehrlich (1991) ressalta que a natureza da técnica de PCR não se fundamenta como teste de diagnóstico, pois sendo uma técnica recente, ela baseia-se em princípios primitivos apresentando muitos erros e falhas. O autor afirma que os ensaios baseados em hibridizações de DNAs com probes específicos foram proclamados na comunidade científica como diagnósticos

inteiramente confiáveis, e muitos investimentos "emocionais" foram excessivamente gastos. O método de PCR herdou este conceito de "infallibilidade" a ponto da enzima Taq ser proclamada como "a molécula do ano".

A sugestão dada pelo autor, de que "devemos ter em mente que esta técnica possui suas dificuldades e limitações" deve ser levada em consideração pois existem contaminações que podem levar a resultados falsos e o custo dos reagentes ainda é elevado

A aplicabilidade do método, segundo o autor, é em sistemas onde os ensaios tradicionais não conseguem demonstrar resultados satisfatórios. Deve ser utilizado ou quando os agentes infecciosos demoram muito tempo para crescer em cultura, como por exemplo, Mycobacterium tuberculosis, ou quando os resultados obtidos em testes sorológicos se mostram ambíguos ou ainda, com retrovírus humanos, como por exemplo o HIV.

A necessidade de diferenciação de linhagens, de maneira mais precisa, levou ao desenvolvimento de uma técnica de análise de polimorfismo no DNA genômico com os mesmos fundamentos da reação de polimerase em cadeia. Esta técnica denomina-se RAPD - "Random Amplified Polymorphic DNA" ou também AP-PCR - "Arbitrary Primer - Polymerase Chain Reaction" e consiste na detecção de diferenças entre os fragmentos de DNA que são amplificadas aleatoriamente. Da mesma forma que os ensaios de PCR, a amplificação de tais fragmentos baseia-se no uso de oligonucleotídeos. As diferenciações e caracterizações inter e intra-específicas resultam das variações nos perfis de bandas em

eletroforese em gel de agarose.

Williams et al . (1990), acreditam que a técnica RAPD possa detectar mudanças de até uma (1) base no DNA genômico.

Welsh e McClelland (1990) demonstraram o RAPD com linhagens de Staphylococcus, Streptococcus e algumas variedades de arroz. Esses autores obtiveram perfis eletroforéticos idênticos entre linhagens de uma mesma espécie e concluíram que essa deveriam ser sub-espécies. Akopyanz et al. (1992) aplicaram a técnica RAPD em isolados clínicos de Helicobacter pylori.



### 3.MATERIAL e MÉTODOS

#### 3.1 - Linhagens de Escherichia coli Uropatogênicas e Controles

As linhagens de Escherichia coli uropatogênicas utilizadas neste trabalho foram isoladas urina de pacientes com infecções urinárias do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Das dezoito (18) linhagens fornecidas, dezessete (17) foram causadoras de cistite e uma (1) causadora de pielonefrite. As linhagens foram classificadas de acordo com as características observadas na urina dos pacientes como BL (Bacteriúria e Leucocitúria), BSL (Bacteriúria sem Leucocitúria) e BLH (Bacteriúria com Leucocitúria e Hematúria) (Tabela I). As cepas bacterianas da espécie Escherichia coli utilizadas como controles foram as seguintes: HB101 (Boyer & Rouland-Dussoise, 1969); C600 (Young & Davis, 1983); DH5alfa (Hanahan, 1983); H10407 (Evans et al., 1975); O157:H7 (E. coli enterohemorrágica isolada de um surto de diarreia no Brasil); O55:H6 (E. coli enteropatogênica isolada de um surto de diarreia infantil no Brasil).

TABELA I Linhagens de Escherichia coli uropatogênicas

Grupo	Código Clínico	Depto. HC	Patologia - UNICAMP
B S L (Bacteriúria Sem Leucocitúria)			63
			66
			154
			177
			202
B L (Bacteriúria e Leucocitúria)			7
			9
			28
			46
			168
			178
B L H (Bacteriúria com Leucocitúria e Hematúria)			189
			33
			70
			81
			121
		198	
PIELONEFRITE			DT

### 3.2. Os meios de cultura utilizados rotineiramente no laboratório

#### 3.2.1 - Meio LB "Luria Bertani" (Cultivo de rotina)

triptona ..... 10,0g  
 extrato de levedura..... 5,0g  
 NaCl ..... 10,0g  
 H<sub>2</sub>O ..... completar para 1000ml  
 pH 7,0

3.2.2 - Meio LA "Luria Bertani Ágar" (Cultivo p/ extração de proteínas de membranas)

meio LB ..... acrescido 1,5% de ágar  
(concentração final)

3.2.3 - Meio CFA

Casaminoácidos ..... 10,0 g  
Extrato de Levedura ..... 1,5 g  
Ágar ..... 20,0 g  
Água destilada q. s. p. .... 1000,0 ml

3.2.3.1 - Solução de sais para meio CFA

Solução A

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O .....0,1 g  
Água destilada q. s. p. .... 100,0 ml

Solução B

MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O ..... 0,1 g  
Água destilada q. s. p. .... 100,0 ml

Autoclavar cada solução separada e adicionar 1 ml de cada solução A e B em cada 100 ml de meio CFA esterilizado

### 3.3 Teste de Adesão a Células Uroepiteliais

#### 3.3.1 - Células uroepiteliais

As células uroepiteliais foram obtidas a partir de urina de mulheres voluntárias sem histórico de infecções urinárias.

A urina foi centrifugada e o precipitado foi lavado 2 vezes por centrifugação a 90 x g, com tampão PBS pH 7,4.

Após centrifugação de 90g por 5 min, os sedimentos foram lavados em PBS pH 7,4 por duas vezes centrifugando-se a 90g por 5 min. A contagem das suspensões de células foi estimada através da técnica de contagem direta. Alíquotas de suspensões celulares, diluídas em série em PBS, foram contadas com auxílio de Câmaras de Neubauer. As suspensões celulares foram ajustadas para concentrações de  $10^5$  células por ml.

Da mesma forma, as suspensões das linhagens uropatogênicas e controle, cultivadas em meio LB, por 24h a 37°C, foram ajustadas para uma concentração de  $10^9$  células/ml em PBS, comparando-se com a escala de McFarland.

Alíquotas de 1 ml de cada uma das suspensões de linhagens uropatogênicas e controles, e das suspensões celulares foram misturadas em recipientes tipo "Eppendorf" e mantidos sob rotação branda por 60 min a 37°C. A seguir, as misturas foram centrifugadas a 90g. Os precipitados de cada uma das misturas originais foram utilizados para a estimativa de bactérias aderidas às células.

Lâminas de microscopia óptica foram preparadas com esfregaços do material precipitado e coradas com Azul de Tripam. O número de bactérias aderidas foi determinado em quarenta células escolhidas ao acaso. Estimativas de intensidade de adesão foram feitas através das médias calculadas para cada bactéria.

### 3.4 - Solução de Alsevier pH 6,5 empregada no teste de Hemaglutinação

glicose .....	20,5 g
citrato de sódio .....	8,0 g
NaCl .....	4,2 g
H <sub>2</sub> O destilada q. s. p. ....	1000,0ml

Esterilizar por filtração em Membrana Millipore 0,45um

#### 3.4.1 - Teste de Hemaglutinação em lâmina

Sangues de humanos e de "cobaia" foram coletados e misturados separadamente (v/v) com a solução de Alsevier. Alíquotas da mistura foram adicionadas em um mesmo volume de solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada, mantida em refrigerador. Após centrifugação a 90g por 5min, os precipitados contendo as hemáceas foram ressuspensos com tampão PBS pH 7,4 acrescidos ou não com D-manose para uma concentração final de 1%.

Para os testes de hemaglutinação, as linhagens uropatogênicas e controles foram cultivadas em meio LA a 16°C e a 37°C por 24h. O crescimento bacteriano de cada uma das linhagens, cultivadas nas duas temperaturas de incubação, foi coletado com auxílio de alça de platina e homogeneizado em PBS pH 7,4. A suspensão bacteriana foi misturada com a suspensão de eritrócitos. Os resultados foram lidos após alguns minutos da adição das misturas.

### **3.5 - Teste de Hemolisina**

#### **3.5.1 - Ágar sangue (teste de hemolisina)**

O sangue de carneiro foi colhido em condições de assepsia em recipiente de 500ml esterilizado contendo pérolas de vidro, sob agitação constante. Em seguida o mesmo foi deixado em repouso por 12h a 4°C.

O meio base para a adição de sangue de carneiro foi preparado e esterilizado com ágar bacteriológico na concentração de 1,5%.

Alíquotas de 50ml de sangue foram adicionadas ao meio base liquefeito, na temperatura próxima a 60°C e, posteriormente, foram transferidas em placas de culturas.

Após pré-inóculo das linhagens uropatogênicas em meio LB, por 24h e aq 37°C, as mesmas foram inoculadas em meio ágar-sangue e incubadas a 37°C por 18h. A presença de halo de

hemólise ao redor da colônia foi indicativa da produção de hemolisina.

### 3.6 - Soluções empregadas na extração de proteínas de membranas.

#### 3.6.1 - Pré lavagem (sol. tampão Tris-HCl 3,3mM) pH 7,4

Tris HCl .....0,3996 g  
H<sub>2</sub>O destilada q. s. p. ....1000,0 ml

#### 3.6.2 - Solução NaCl 3%

NaCl .....3,0 g  
H<sub>2</sub>O destilada q. s. p. ....100,0ml

#### 3.6.3 - Tris HCl 0,1M + EDTA 10mM pH 7,4

Tris HCl .....12,110 g  
EDTA . 2 H<sub>2</sub>O .....3,722 g  
H<sub>2</sub>O destilada q. s. p. ....1000,0 ml

#### 3.6.4 - Tris HCl 0,1M + MgCl<sub>2</sub> 10mM pH 7,4

Tris HCl .....12,110 g  
MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O .....2,033 g  
H<sub>2</sub>O destilada q.s.p.....1000,0 ml

3.6.5 - Tris 0,1M + sacarose 0,75M (SONICAÇÃO) pH 7,4

Tris .....12,11 g  
sacarose .....256,73 g  
H<sub>2</sub>O destilada q. s. p. ....1000,0 ml

3.6.6 - Tris HCl 63mM + Triton X-100 2% (v/v) pH 6,8

Tris .....8,629 g  
Triton X-100 .....20,0 ml  
H<sub>2</sub>O destilada q. s. p. ....1000,0 ml

3.6.7 - Solução Tampão de Ressuspensão de Amostra em PAGE 2X

(Tris HCl 100mM pH 6,8, glicerol 20%, SDS 4%, azul  
de bromofenol 0,2% e beta-mercaptoetanol 10%)

Tris .....0,12 g  
SDS .....0,40 g  
Azul de bromofenol .....0,02 g  
Glicerol .....0,12ml  
Beta-mercaptoetanol .....0,10ml  
H<sub>2</sub>O destilada q. s. p. ....10,0 ml

**3.7 - Extração de proteínas de membrana**

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



As linhagens de Escherichia coli foram cultivadas em quatro placas contendo meio LA por 24 h a 37°C. O crescimento bacteriano foi raspado e ressuspendido em 20ml de tampão Tris HCl 3,3mM pH 7,4.

As suspensões foram homogeneizadas em omini-mixer (Sorvall) por 2 min, a velocidade 4, em banho de gelo. Centrifugaram-se as suspensões a 8000g por 5 min a 8°C. Descartaram-se os sobrenadantes e, os precipitados foram ressuspendidos em 20ml de solução salina NaCl 3%.

Após novo ciclo de centrifugação a 8000g por 5 min a 8°C, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados ressuspendidos em 20ml de Tris HCl 0,1M pH 7,4 + EDTA. Repetiu-se o ciclo de centrifugações e ressuspensão dos precipitados em Tris HCl 0,1M pH 7,4 + MgCl<sub>2</sub>. Novamente, centrifugaram-se as suspensões a 8000g por 5 min a 8°C, descartando-se posteriormente os sobrenadantes.

Após ressuspensão dos precipitados em 20ml de Tris HCl 0,1M pH 7,4 + sacarose 0,75M, as suspensões foram sonicadas por 6 ciclos de 20 Khz, 70 a 90 W por 30 s cada, em banho de gelo.

Centrifugou-se a 8000g por 5 min a 8°C, mas desta vez 10ml dos sobrenadantes foram transferidos em tubos apropriados para ultracentrifugação. A ultracentrifugação foi realizada a 37000g por 30 min a 4°C. Novamente, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados ressuspendidos em 10ml de Tris HCl 3,3 mM pH 7,4. Repetiu-se o ciclo de ultracentrifugação, descartando-se, posteriormente, os sobrenadantes.

Os precipitados contendo vesículas de membranas bacterianas foram ressuspensas em 1ml de Tris HCl 63 mM pH 6,8 + Triton X-100 2% (v/v), com a intenção de solubilizar as proteínas de membranas. As suspensões foram transferidas para tubos Ependorf e agitadas por inversão durante 20 min à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se a 12000g por 3 min à temperatura ambiente e, finalizando, os sobrenadantes foram coletados e transferidos em tubos limpos adicionando-se volumes iguais de solução tampão dissociante de amostra. Os tubos devidamente marcados foram fervidos por 4 min para completa denaturação de todas as proteínas. Os mesmos foram estocados em "freezer".

### 3.8 - Soluções empregadas na Extração de Proteínas de Superfície

#### 3.8.1 - Tampão PBS 1M

##### 3.8.1.1 - Tampão fosfato

Preparar duas soluções:

I -  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ..... 1M

II -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ..... 1M

Em 50 ml da solução da solução I adicionar um volume da solução II até acertar pH final 7,4.

### 3.8.1.2 - Tampão PBS

Tampão fosfato (item 3.3.1.1) ..... 50,0ml  
Salina NaCl 3M ..... 50,0ml  
H<sub>2</sub>O destilada q. s. p. .... 1000,0ml

### 3.8.2 - Solução de ácido tricloroacético TCA 40%

TCA ..... 4,0 g  
H<sub>2</sub>O destilada q. s. p. .... 10,0ml

### 3.8.3 - Solução Etanol- Éter v/v

etanol ..... 100,0ml  
éter ..... 100,0ml

## 3.9 - Extração de proteínas de superfície

Os crescimentos das linhagens bacterianas a 16°C e a 37°C em meio CFA foram homogeneizados com auxílio de alça de vidro, em volume de tampão PBS pH 7,4 (3ml/placa). Em seguida, as suspensões foram transferidas para frasco esterilizado.

As suspensões bacterianas foram aspiradas e injetadas utilizando-se de seringas contra o fundo do frasco por dez (10) vezes.

Transferiu-se cada uma das suspensões para tubos Ependorfs, devidamente identificados, os quais foram mantidos em banho-termostatizado à temperatura de 65°C, por 5 min.

Em seguida, centrifugou-se a 12000g por 5 min, e coletaram-se os sobrenadantes, descartando-se os precipitados.

Aos volumes dos sobrenadantes coletados, adicionaram-se volumes de solução de ácido tricloroacético a 40% para uma concentração final de 5%, sendo mantidos no gelo por 30 min.

Os tubos foram centrifugados e os sobrenadantes descartados. Os precipitados foram lavados em solução de etanol-éter (v/v) com agitação violenta e mantidos em gelo por 30 min. Passados este tempo, os tubos foram centrifugados a 12000 X g por 10 min. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes.

Após o descarte dos sobrenadantes, os sedimentos foram secos com papel em forma de "cauda de rato" esterilizados e em seguida, mantidos a temperatura ambiente até evaporação completa da solução de etanol-éter.

Finalmente, os precipitados foram ressuspensos em solução tampão de ressuspensão e fervidos por 5 min. Alíquotas de cada extrato foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida.

### **3.10 - Soluções de Preparo dos Géis de poliacrilamida**

#### **3.10.1 - Solução de monômero acril. 30% e bis. 2,7%**

Acrilamida .....	58,4 g
Bisacrilamida .....	1,6 g
H <sub>2</sub> O destilada q. s. p. ....	200,0ml

3.10.2 - Tampão gel de corrida 4X tris HCl 1,5M pH 8,8

Triz .....36,33 g

H<sub>2</sub>O destilada q. s. p. .... 200,0ml

3.10.3 - Tampão de empacotamento 4X tris HCl 0,5M pH 6,8

Triz .....3,03 g

H<sub>2</sub>O destilada q. s. p. ....50,0ml

3.10.4 - Solução catalizadora (persulfato de amônio 10%)

Persulfato de amônio ..... 5,0 g

H<sub>2</sub>O destilada q. s. p. .... 50,0 ml

3.10.5 - Tampão de corrida tris HCl 0,025M + glicina 0,192M

+ SDS 0,1%.

Triz .....12,11 g

Glicina .....57,60 g

SDS .....40,0 ml

H<sub>2</sub>O destilada q. s. p. .... 4000,0 ml

### 3.11 - Eletroforese de Proteínas de Membrana e Superfície

A eletroforese das amostras de proteínas foi realizada no sistema descontínuo dissociante de placa vertical utilizando equipamento de eletroforese da Pharmacia Sistema 2001, seguindo os modelos de HAMES & RICKWOOD, 1982. A preparação e montagem

dos géis de separação e de empacotamento com concentrações 12,5% e 4%, respectivamente, seguiram as especificações do fabricante Hoefer Electrophoresis Catalogue and Exercises (1990-1991). A Tabela II indica a quantidade dos reagentes utilizados para a montagem dos géis 12,5% e 4%.

TABELA II Montagem dos Géis de Separação e Empacotamento

Soluções	Gel de separação 12,5%	Gel de empacotamento 4%
acril./bis	25ml	2,66ml
Tampão pH 8,8	15ml	-
Tampão pH 6,8	-	5,0ml
SDS 10%	0,6ml	0,2ml
H <sub>2</sub> O destilada	19,1ml	12,2ml
catalisador	0,3ml	0,15ml
TEMED	0,02ml	0,02ml

### 3.12 - Marcadores de Pesos Moleculares para SDS-PAGE

Kit da Sigma ( MW - SDS - 70) Tabela III

TABELA III - Marcadores de Pesos Moleculares

Marcador	PM kDa
ALFA-LACTALBUMINA	14,4
INIBIDOR DE TRIPSINA	20,1
ANIDRASE CARBONICA	30,0
OVOALBUMINA	43,0
ALBUMINA BOVINA	66,0
FOSFORILASE B	94,0

### 3.13 - Soluções para Coloração de prata (BLUM et al. 1987)

3.13.1 - Fixador (etanol 50%, ácido acético 12% e formaldeído

(37% 0,5ml/l)

Etanol .....	100,0	ml
Ácido acético glacial .....	24,0	ml
Formaldeído a 37% ... ..	0,100	ml
H <sub>2</sub> O destilada q. s. p. ....	76,0	ml

3.13.2 - Solução de etanol 50%

Etanol .....300,0ml  
H<sub>2</sub>O destilada q. s. p. ....300,0ml

3.13.3 - Solução de Pré-Tratamento (Tiosulfato  
de sódio 0,02%)

Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O ..... 0,06 g  
H<sub>2</sub>O destilada q. s. p. .... 300,0 ml

3.13.4 - Solução de Impregnação (Nitrato de Prata 0.2%  
0,75ml/1 de formaldeido a 37%)

AgNO<sub>3</sub> .....0,6 g  
Formaldeido a 37% ..... 0,225ml  
H<sub>2</sub>O destilada q. s. p. ....300,0 ml

3.13.5 - Solução Reveladora (Carbonato de sódio 6%)

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> .....8,0 g  
Sol. pré-trat. (5.3) .....6,0 ml  
Formaldeido a 37% .....0,15ml  
H<sub>2</sub>O destilada q. s. p. ....300,0 ml

3.13.6 - Solução de Bloqueio de Revelação

Etanol .....100,0ml  
Ácido acético .....24,0ml  
H<sub>2</sub>O destilada q. s. p. ....76,0ml



### 3.13.7 - Coloração dos géis de proteínas

Para coloração dos géis utilizou-se a técnica de coloração por prata para proteínas e ácidos nucleicos descrita por Blum et al (1987), e os mesmos foram preservados seguindo técnica de secagem de Juang et al (1984). A tabela IV resume os passos da coloração.

TABELA IV Resumo dos passos de coloração por prata segundo Blum et al., 1987.

Soluções empregadas	item (Parte dos Materiais)	tempo
Fixador		no mínimo 1 h
Lavagem água dest.		três séries de 20 min
Pré-tratamento		1 minuto
Água destilada		três séries de 20 seg
Impregnação		20 minutos
Água destilada		três séries de 20 seg
Reveladora		10 minutos
Água destilada		duas séries de 20 seg
Bloqueio (stop)		10 minutos
Preservação		24 horas

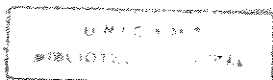
### 3.14 - Soluções para extração de plasmídeo em pequena escala (Mini-prep)

#### 3.14.1 - Solução I (tris HCl 25mM + EDTA 10mM pH 8,0)

Solução estoque de Tris HCl 1M pH 8,0 ....2,5ml

Solução estoque de EDTA 0,5 M pH 8,0 .....1,0ml

H<sub>2</sub>O destilada q. s. p. .... 100,0ml



3.14.2 - Solução II (NaOH 0,2N + SDS 1%)

NaOH 10 N ..... 2,0ml  
SDS 10% ..... 10,0ml  
H<sub>2</sub>O destilada q. s. p. .... 100,0ml

3.14.3 - Solução III (acetato de sódio 3M pH 4,8)

Acetato de sódio .....24,6 g  
H<sub>2</sub>O destilada q. s. p. .... 100,0ml  
Ajustar pH 4,8 com ácido acético glacial

3.14.4 - Solução de ressuspensão 6X para aplicação em gel

Ficoll 400 ..... 7,5 g  
Azul de bromofenol ..... 0,125 g  
Xileno cianol FF .....0,125 g  
Solução estoque de RNase ..... 0,5 ml  
H<sub>2</sub>O destilada q. s. p. ....50,0 ml

3.14.5 - Tampão de corrida eletroforética em gel de agarose

TEB Tris-EDTA-Borato 5X concentrado

Trizma base ..... 54,0 g  
ácido bórico ..... 27,5 g  
0,5M de EDTA pH 8,0 ..... 20,0ml  
H<sub>2</sub>O destilada q. s. p. .... 1000,0 ml

### 3.15 - Extração de plasmídios

Após crescimento em meio LB por 18h a 37<sup>o</sup> C, 1,3 ml de culturas bacterianas foram centrifugadas a 12000g por 1min. Os sedimentos foram ressuspensos em 100 microlitros de solução I e mantidos no gelo por 1 minuto. A seguir, adicionaram-se 200 microlitros da solução II, misturando-se suavemente por inversão e colocando-os no gelo por 3 minutos. A seguir, 150 microlitros da solução III foram adicionadas agitando-se por inversão, suave, e os tubos mantido no gelo por 15 min. Em seguida, centrifugou-se cada tubo a 12000g por 5min e 400 microlitros de cada sobrenadante foram transferidos para outro tubo. Adicionou-se 1ml de etanol 100% gelado em cada tubo, homogeneizando-se suavemente por inversão e os mesmos mantidos a -20<sup>o</sup> C por no mínimo 1 hora. Para a purificação do DNA, os tubos foram centrifugados a 12000g por 5 min e os sobrenadantes descartados. Os tubos foram secos com auxílio de tiras de papel esterilizadas em forma "cauda de ratos" e os sedimentos ressuspensos em 50 microlitros de solução I. Para análise em gel de agarose, uma alíquota de 15 microlitros de cada suspensão foi adicionada de 5 microlitros da solução de ressuspensão 6X e, a mistura aplicada em gel de agarose. Os géis foram corados com brometo de etídio (500ng/ml) e visualizados sob luz ultra-violeta (UV), em transiluminador de UV.

### 3.16 - Reagentes para reação de PCR - RAPD

#### 3.16.1 - Tampão de Reação 10 X da Enzima Taq polimerase

Tris HCl 0,1mM pH 8,3; KCl 0,5mM; MgCl<sub>2</sub> 0,015mM;

Tris HCl 1M pH 8,3 .....	0,1	ml
KCl 1M .....	0,5	ml
MgCl <sub>2</sub> 1M .....	0,015	ml
H <sub>2</sub> O destilada q. s. p. ....	1,0	ml

#### 3.16.2 - Primers utilizados nas reações de PCR

O primer utilizado nas reações de PCR foi sintetizado e gentilmente fornecido pelo Prof. Dr Spartaco Astolfi Filho, do Departamento de Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília. O primer constituído de fita simples e de 10 nucleotídeos de tamanho apresenta a seguinte sequência 5' -- 3': TGCCGAGCTG.

#### 3.16.3 - Soluções de nucleotídios

Os desoxirribonucleotídios (dNTPs) utilizados nas reações foram de procedência da "Pharmacia LKB Biotechnology". As soluções estoques dATP, dTTP, dCTP e dGTP continham concentrações de 10mM. Vinte (20) microlitros de cada uma das soluções de dNTPs foram adicionadas em uma solução aquosa de mistura de dNTPs com volume final de 200 microlitros.

#### 3.16.4 - Enzima Taq Polimerase

A enzima utilizada nas reações de " PCR - RAPD - Fingerprinting" foi de procedência da "Pharmacia LKB Biotechnology".

#### 3.17 - Teste de RAPD - DNA - Fingerprinting

A amplificação de DNA através da técnica de RAPD - DNA "Fingerprinting" foi realizada em tubos de Ependorf de capacidade de 0,5ml, em volume de 100 microlitros de reação. Os reagentes utilizados na reação seguiram a seguinte ordem de adição:

1 - Água Mili-Q esterilizada - volume tirado da somatória de todos os outros reagentes subtraindo-se do volume 100 microlitros de reação,

2 - Dez (10) microlitros da solução tampão de reação 10 X concentrado, próprio para reações com a enzima Taq polimerase,

3 - Dois (2) microlitros da solução estoque contendo a mistura do dNTPs (10mM de cada dNTP),

4 - Um (1) microlitro da solução de primers (1 $\mu$ g/ $\mu$ l),

5 - As linhagens foram cultivadas em meio LA a 37°C por 24 h. Destes crescimentos foi coletado um raspado com auxílio de palitos de madeira e este, dissolvido em 400 microlitros de solução tampão TE pH 8,0 (Tris 10mM e EDTA 1mM), a uma

concentração próxima a  $10^9$  células por ml. Alíquotas de 5 microlitros destas suspensões foram coletados e adicionados nos tubos de reação.

A partir deste ponto, o volume de reação foi fervido por 10 min e mantido à temperatura ambiente também por 10 min. Em seguida, (passo 6) procedeu-se a adição de 1 (um) microlitro da enzima Taq polimerase. E por último, duas gotas de óleo mineral foram adicionadas em cada tubo sobre o volume de reação, e, finalmente, levados à reação.

A máquina utilizada para reação de amplificação foi o modelo 391 DNA synthesizer PCR-MATE da Applied Biosystems.

O programa de amplificação baseou-se em 45 ciclos de  $94^{\circ}$  C, por 1 min;  $34^{\circ}$  C, por 1 min; e  $72^{\circ}$  C, por 2 min.

Alíquotas de 15 microlitros dos produtos de reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. Os géis foram corados com solução contendo 0,5 microgramas por ml de brometo de etídio por no mínimo 20 min e visualizados em transiluminador de UV.

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Teste de Adesão

As infecções bacterianas no trato urinário, sintomáticas ou assintomáticas, estão relacionados com a habilidade que as bactérias causadoras destas infecções possuem de aderir à superfície da mucosa urinária. Desta forma, a análise da virulência das bactérias uropatogênicas "in vitro" pode ser verificada, segundo o grau de intensidade de adesão à célula uroepitelial, coletada da urina de pacientes saudáveis, que não possuem histórico clínico de infecções urinárias (SVANBORG EDEN et al., 1977).

De acordo com o número de bactérias aderidas às células uroepiteliais, as diferentes linhagens foram agrupadas em 3 grupos (Tabela V), independente da sua origem pois, há uma grande variabilidade na capacidade de adesão destas linhagens. Apesar de que estudos anteriores, Johnson (1991) e Hagberg et al ., (1981) tenham indicado que as linhagens isoladas de cistite exibem uma proporção de bactérias aderidas de 10-30 bactérias por célula, não se pode desconsiderar aquelas que apresentem um grau de adesão inferior ao descrito. Assim, as linhagens 154(BSL), 7(BL) e 198(BLH) que, apesar de apresentarem um grau de adesão comparável à amostra padrão, portadora de fímbria tipo 1 (ORN115) também podem ser causadoras de cistite. Em contra partida, as linhagens DT, causadora de pielonefrite, e as císticas 46 e 168, ambas de BL exibiram altas taxas de adesão em células (30-60), distantes até do número pré-determinado pelos autores

TABELA V

Classificação em grupos baseado na capacidade de adesão das linhagens uropatogênicas

grupo	linhagem	número de bactérias/célula			média de adesão/célula
		(0-10)	(10-30)	(30-60)	
BSL	63		X		19,1
	66		X		24,9
	154	X			8,1
	177		X		23,6
	202		X		14,9
BL	7	X			35,8
	9		X		18,3
	28		X		13,4
	46			X	62,3
	168			X	44,7
	178		X		17,7
	189		X		16,6
BLH	33		X		15,8
	70		X		20,0
	81		X		19,4
	121		X		25,9
	198	X			7,7
	DT			X	63,3
	ORN115	X			2,0



#### 4.2 - Teste de Hemaglutinação

Cada cepa uropatogênica cultivada em meio CFA, tanto a 37°C como também a 16°C foram coletadas por alça de platina e transferidas em placas de vidro. As soluções de eritrócitos tanto de humano como também de cobaia foram preparados na presença ou não de D-manose. As leituras dos testes de hemaglutinação foram observadas após 3 minutos das misturas serem preparadas. A Tabela 6 resume os resultados observados.

Dentre todas as linhagens estudadas apenas as linhagens 177 (BSL) e 9 (BL) não exibiram algum tipo de fímbria hemaglutinante de eritrócitos de humanos e de cobaia, embora as mesmas mantivessem uma intensidade de bactérias aderidas em células uroepiteliais comum à maioria das linhagens (tabela VI). Desta forma, supõe-se que estas duas linhagens possuam fímbrias ou adesinas diferentes daquelas que podem ser detectadas através desta técnica.

TABELA VI Padrão de hemaglutinação das linhagens de Escherichia coli uropatogênicas

Linhagens	eritrócitos humanos com D-manose		eritrócitos sem D-manose		de cobaia com D-manose	
	37 °C	16 °C	37 °C	16 °C	37 °C	16 °C
63	+	-	-	-	-	-
66	+	-	+	+	-	-
BSL 154	-	-	+	-	-	-
177	-	-	-	-	-	-
202	+	-	+	-	-	-
7	-	-	-	+	-	-
9	-	-	-	-	-	-
28	+	-	+	-	-	-
BL 46	+	-	+	+	-	-
168	-	-	+	-	-	-
178	+	-	+	-	-	-
189	+	-	+	-	-	-
33	+	-	-	-	-	-
70	+	-	-	-	-	-
BLH 81	+	-	-	-	-	-
121	+	-	+	-	-	-
198	-	-	+	-	-	-
DT	ND	ND	-	ND	-	-

ND - não determinado

Com relação à hemaglutinação com os eritrócitos de humanos, foi possível detectar a existência de fímbrias manose resistentes (MRHA) nas linhagens 63, 66, 178, 202 (BSL), 28, 46, 189 (BL), 33, 70, 81, 121 (BLH).

Todas estas linhagens exibiram as fímbrias apenas a 37 °C e não a 16 °C, confirmando os dados de literatura que reportam a expressão destas estruturas às temperaturas dos hospedeiros (GAASTRA & GRAAF, 1982).

O uso de um Kit específico para a determinação de fímbria tipo P permitiu determinar que as linhagens 28, 33, 46, 63, 81, 121 e 178 expressam este tipo de fímbria.

Com relação aos eritrócitos de cobaia, determinou-se a presença de fímbria de caráter hemaglutinante manose sensível (MSHA), conhecida como fímbria tipo 1.

Assim as linhagens 28, 33, 46, 63, 66, 121, 178, 189 e 202 foram capazes de expressar dois tipos de fímbrias, MRHA e MSHA, sendo que naquelas em que não é expresso a fímbria tipo P, não se pode determinar se as mesmas são do tipo X ou Dr.

Duas propriedades das fímbrias tipo 1 descritas na literatura (JONHSON 1991) foram verificadas nos testes de hemaglutinação. A primeira refere-se à presença da fímbria em ambas as temperaturas de incubação (37 e 16°C) nas linhagens 66 e 46, ratificando os dados que apontam-na como uma das poucas fímbrias expressas em temperaturas abaixo de 37°C. A segunda, verificada na cepa 7, diz respeito à propriedade de alternar a capacidade de expressão desta fímbria, efeito conhecido como "variação de fase". Neste caso, a cepa produziu a fímbria apenas a 16°C.

#### **4.3 - Teste de Hemolisina**

Johnson (1991) ressaltou a existência de "alfa" e "beta" hemolisinas em Escherichia coli uropatogênicas. Foi destacado que as alfa-hemolisinas compreendiam as toxinas citolíticas secretadas pelas linhagens hemolíticas, e as beta-hemolisinas abrangiam as toxinas associadas às membranas bacterianas.

No entanto, os testes realizados em ágar sangue destacaram apenas as hemolisinas secretáveis. Assim, os resultados obtidos demonstram grande variabilidade dentro de cada grupo, conforme pode se observar na Tabela VII.

TABELA VII Demonstração dos fenótipos hemolíticos e não hemolíticos

grupo BSL		grupo BL		grupo BLH	
cepa	hemolítico	cepa	hemolítico	cepa	hemolítico
63	-	7	+	33	-
66	+	9	-	70	+
154	+	28	+	81	-
177	-	46	+	121	+
202	-	168	+	198	-
		178	-		
		189	+		
DT	+				

Da mesma forma que os resultados de adesão em células uroepiteliais, os testes de hemolisinas mostraram também uma grande variabilidade nas linhagens estudadas. Embora tenha sido relatado que a produção de hemolisinas representa um dos principais fatores de virulência de linhagens de Escherichia coli uropatogênicas, CAPRIOLI et al., (1983) e O' HANLEY et al., (1991) relataram os efeitos provocados pela ação de linhagens hemolíticas e não hemolíticas no trato urinário dos hospedeiros.

Segundo estes autores, a cepa não-hemolítica capaz de expressar fímbria colonizou o tecido renal com um grande número de bactérias e causou infecção renal com uma necrose superficial,

ao passo que, uma linhagem hemolítica fimbriada foi capaz de provocar dano muito maior ao tecido renal por destruir o tecido epitelial.

Assim, apesar de todas as linhagens terem sido isoladas a partir de casos clínicos de infecção do aparelho urinário, a capacidade de expressar ou não hemolisina não é indicativa da patogenicidade bacteriana.

#### **4.4 - Perfil Plasmidial**

Os perfis plasmidiais das linhagens uropatogênicas estão dispostos nas figuras 1 e 2. De todas as linhagens, apenas a 154 (BSL) não exibiu nenhum plasmídio, e por isso não está mostrada em nenhuma das figuras.

Como se pode ver, todas estas linhagens possuem no mínimo um plasmídio, cuja presença poderia ser a responsável pela múltipla resistência a antibacterianos apresentada pela maioria destas linhagens (dados não mostrados).

Duas linhagens, 28 e 46 (Figura 2), exibiram perfis plasmidiais muito semelhantes, além de pertencerem ao mesmo grupo sintomatológico (BLH). No entanto, mesmo sendo hemolíticas (Tabela VII) e possuindo os mesmos tipos de fímbrias, tipo 1 e MRHA (tabela VI), elas se comportaram diferentemente nos testes de adesão. A diferença observada quanto à capacidade de adesão destas linhagens (Tabela V) pode, neste caso, não ser importante na diferenciação das mesmas e sim refletir um artefato de técnica.

Contudo, as demais linhagens exibiram perfis plasmidiais diferentes, presumindo-se que todas sejam distintas umas das outras, conforme foi defendido por Pfaller & Hollins (1989) ou que plasmídios não expressem genes essenciais à patogenicidade bacteriana.

#### **4.5 - Perfil de Proteínas de Membranas**

Todas as linhagens uropatogênicas exibiram idêntico perfil de proteínas de membranas (Figura 3). Portanto, a utilização de proteínas de membranas das Escherichia coli uropatogênicas não permitiu, ao menos nestes casos, diferenciação a nível intraespecífica. Estes resultados diferem daqueles obtidos por Vaisanen-Rhen et al. (1984), os quais obtiveram diferenças nos perfis de proteínas de membranas de linhagens uropatogênicas na faixa entre 43kDa e 30kDa.

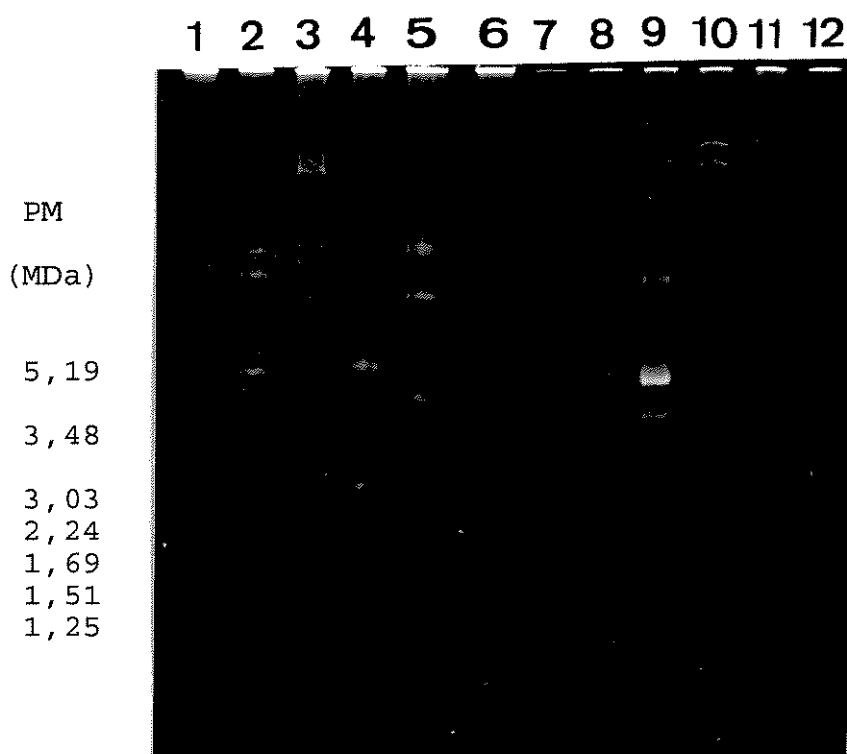


Figura 1: Gel de agarose (0,7%) de DNA plasmidial das linhagens uropatogênicas estudadas.

Os plasmídios da cepa V517 (5,19; 3.48; 3.03; 2,24; 1,69; 1,51;1,25) foram utilizados como padrões de peso molecular (Perfil 1 e 12) MDa; 2 - BSL63; 3 - BSL66; 4 - BSL177; 5 - BL178; 6 -BSL202; 7 - BLH33; 8 - BLH70; 9 - BLH81; 10 - BLH121; 11 - BLH198.

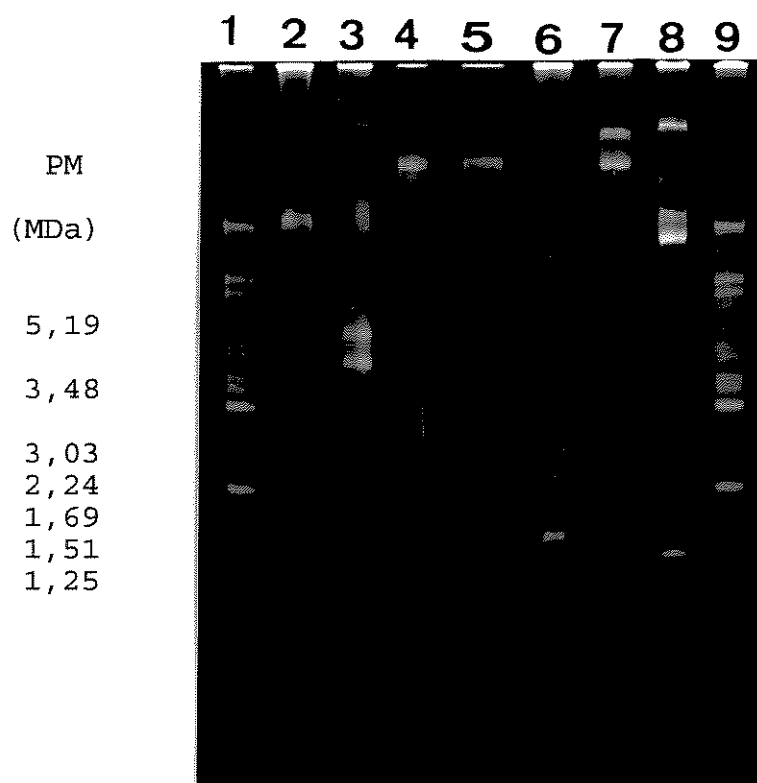


Figura 2: Gel de agarose (0,7%) de DNA plasmidial das linhagens uropatogênicas estudadas.

Os plasmídios da cepa V517 (5,19; 3,48; 3,03; 2,24; 1,69; 1,51; 1,25) foram utilizados como padrões de peso molecular (Perfil 1 e 9) MDa. Perfil 2 - BL7; 3 - BL9; 4 - BL28; 5 - BL46; 6 - BL168; 7 - BL189; 8 - DT



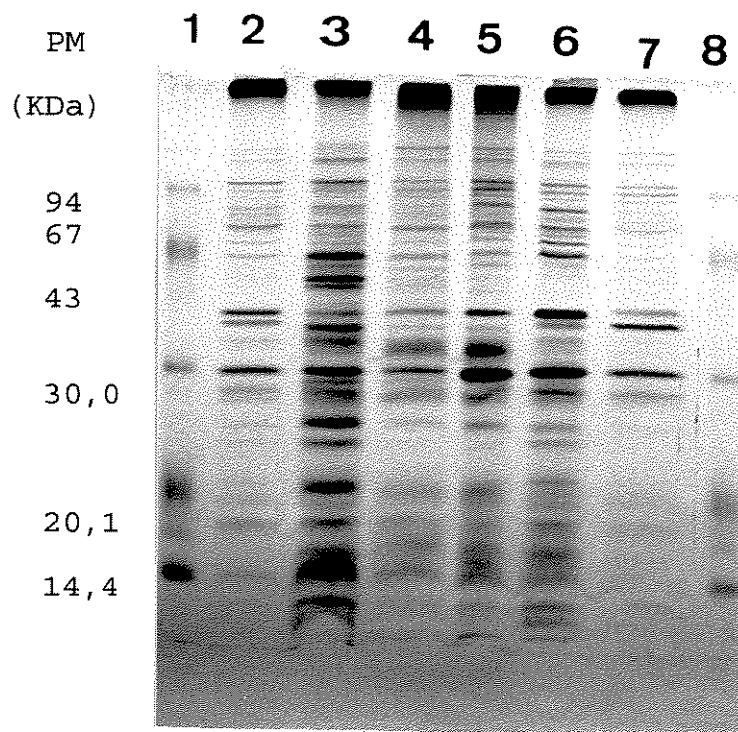


Figura 3: Gel de poliacrilamida/SDS 13% de proteínas de membrana das linhagens uropatogênicas

Padrões de pesos moleculares (Tabela 2), Perfis 1 e 8; 2 - BSL66; 3 - BSL202; 4 - BL7; 5 - BL189; 6 - BLH81; 7 - DT

#### 4.6 - Perfil de Proteínas de Superfície

Como forma de diferenciação, a utilização de proteínas que sejam expressas na superfície bacteriana torna-se um ensaio de grande valia, quando se trata de linhagens que possuem propriedades de aderência às células epiteliais de seu hospedeiro. Assim, essas análises concentram-se nos componentes estruturais daquelas proteínas que localizam-se na membrana externa ou que, a partir desta, projetem-se para o meio externo como é o caso ds fímbrias e/ou adesinas e que, possuem estruturas com massas moleculares inferiores a 20,1kDa.

Não só as massas moleculares evidenciam a presença de fímbrias através destes perfis, como também as temperaturas de cultivo bacteriano comprovam a existência das mesmas (GAASTRA & deGRAAF, 1982). Deste modo, comparando-se os perfis de proteínas de superfície obtidos com diferentes linhagens cultivadas a 16°C com aqueles obtidos com as mesmas linhagens cultivadas a 37°C, verificou-se que os primeiros não exibiam algumas bandas entre 14,4 e 20,1kDa, e que se expressavam a 37°C.

Desta forma, as análises dos perfis eletroforéticos destas proteínas que se expressam a 37°C apontaram similaridades entre determinadas linhagens, as quais foram reunidas em grupos.

A Figura 4 exhibe oito perfis eletroforéticos de proteínas de superfície correspondentes a um representante de cada um dos oito grupos determinados através de similaridades entre todos os perfis das linhagens uropatogênicas (Tabela VIII) e que representam as variações intra-específicas encontradas entre as linhagens uropatogênicas. Johnson (1991) relatou que as subunidades protéicas de algumas fímbrias, como por exemplo, P e Tipo 1, apresentavam pesos moleculares abaixo de 20kDa. Desta forma, a análise destes perfis eletroforéticos restringiu-se, principalmente, à faixa do gel que representa bandas com pesos moleculares abaixo de 20,1 kDa.

As bandas mais intensas semelhantes a de peso molecular 67 kDa no perfil 168 podem ser de alguns componentes estruturais de flagelos (Silveira, W.D., comunicação pessoal).

TABELA VIII Agrupamento das linhagens uropatogênicas através de similaridades nos perfis eletroforéticos de proteínas de superfície

grupo	cepa	grupo original
I	46 28	BL BL
II	70	BLH
III	168 154	BLH BSL
IV	66 63 81 7	BSL BSL BLH BL
V	198 189 33	BLH BL BLH
VI	121	BLH
VII	DT	Pielonefrite
VIII	202 9 177 178	BSL BL BSL BL

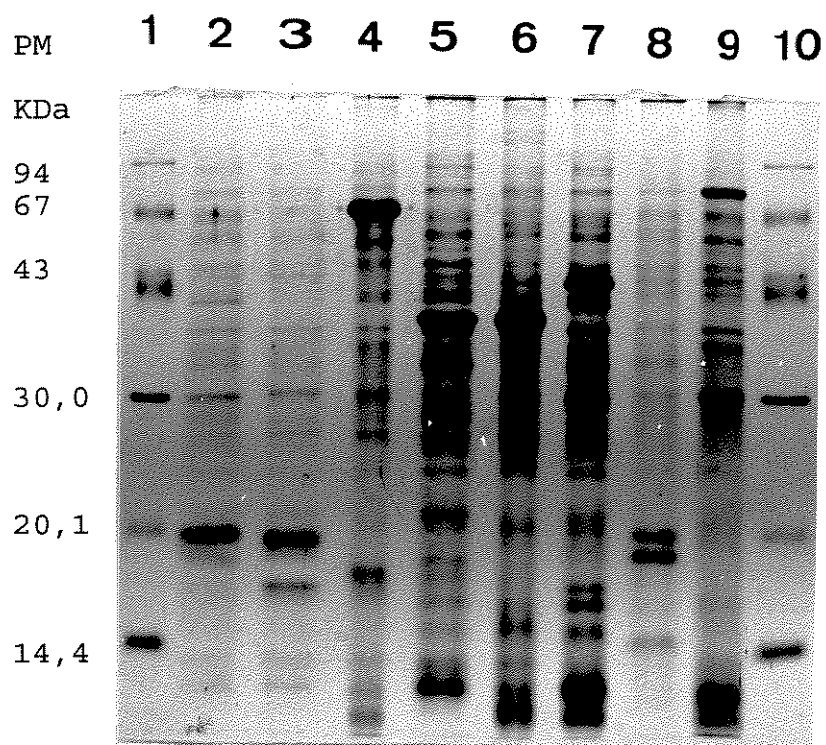


Figura 4: Gel de poliacrilamida/SDS (13%) Proteínas de Superfície dos diferentes grupos de linhagens uropatogênicas.

#### 4.7 - PCR - DNA Fingerprinting (RAPD)

Com relação aos produtos de reação de amplificação dos genomas bacterianos, as linhagens puderam ser reunidas em grupos, conforme a similaridade exibida nos perfis eletroforéticos destes produtos.

Além das 18 linhagens uropatogênicas, seis linhagens da espécie Escherichia coli foram utilizadas como controles da espécie. Foram elas: H10407, HB101, AL 055 : H6 (E.coli que mostra aderência localizada), EAEC (E. coli enteroagregativa), O157: H7, e DH5alfa.

O agrupamento segundo os resultados do "RAPD", está indicado na Tabela IX. Além dos representantes de cada um dos grupos, a Tabela IX indica, também, qual o perfil eletroforético correspondente, mostrado na figura V.

Esta metodologia foi utilizada devido aos resultados publicados por Welsh & McClelland (1990) os quais verificaram que algumas espécies de Staphylococcus spp e Streptococcus spp poderiam ser classificadas em grupos com padrões espécie específicos, segundo os produtos obtidos por RAPD.

Dessa forma, os grupos mostrados na Tabela IX demonstram que os representantes de um mesmo grupo compartilham de padrões eletroforéticos semelhantes e que, estes padrões denotam a existência de um nível sub-específico, dentro da espécie E. coli.

Todavia, para se chegar a uma "identidade individual" de cada linhagem bacteriana, seria necessária a utilização de maior número de "primers", pois apenas 4 linhagens (BLH198; AL 055:H6; O157:H7; e DH5alfa) mostraram perfis individuais, enquanto que, por outro lado, um grande grupo (A) foi formado devido à semelhança dos perfis eletroforéticos (Tabela IX).

Esses resultados não possibilita a comparação com os resultados obtidos com os perfis eletroforéticos de proteínas de superfície.

Como os resultados obtidos com RAPD foram conseguidos com o uso de apenas um "primer", acreditamos que os perfis eletroforéticos de proteínas de superfície sejam mais acurados pois estes refletem a expressão de um "conjunto gênico". A utilização de apenas um "primer" para estudos de classificação bacterianaa poderia ser melhor empregada quando este é específico para um gene, o qual sabe-se ser relacionado à patogenicidade.

TABELA IX Agrupamento das linhagens E. coli através dos produtos de reação do RAPD e os perfis correspondentes mostrados na Figura V

grupo	linhagens	perfil (Figura 5)
A	63, 202, 46, 33, 81, 70 121, 154, 177, 28, 168, 189, 9, H10407, HB101, EAEC	1 e 5
B	DT, 7	8
C	178, 66	6
D	198	7
E	AL 055 : H6	3
F	O157 : H7	4
G	DH5alfa	2



1 2 3 4 5 6 7 8

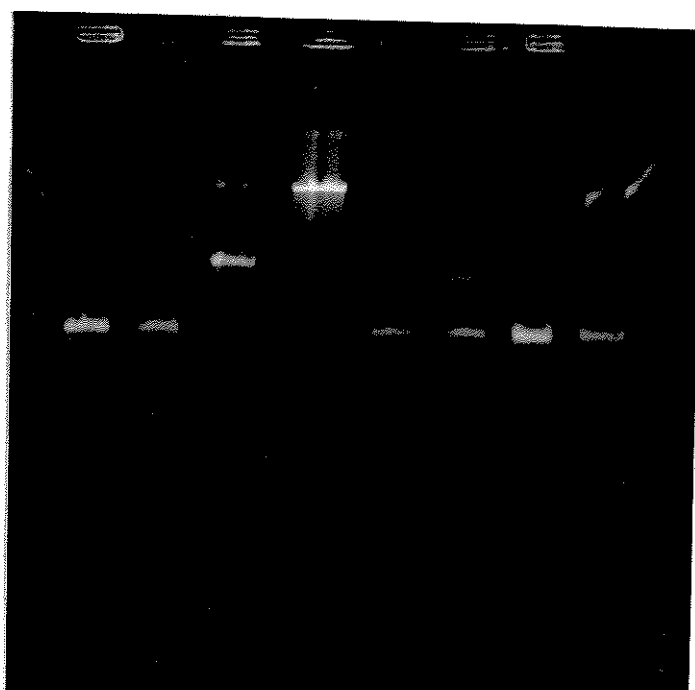


Figura 5: Gel de agarose 1% dos fragmentos obtidos por RAPD nas diferentes linhagens estudadas.

Perfil 1 - H10407; 2 - DH5alfa; 3 - AL 055:H6;  
4 - O157:H7; 5 - BSL63; 6 - BL178; 7 - BLH198;  
8 - DT

Assim, essa dissertação apresentou dois objetivos. O primeiro foi o de verificar e determinar a expressão de alguns fatores de virulência das UPEC, através de técnicas como testes de adesão, produção de hemolisinas e hemaglutinação. Esse objetivo pretendia correlacionar, de alguma forma, a presença de tais fatores com a patogenicidade demonstrada pelas diferentes linhagens uropatogênicas isoladas de pacientes do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

O segundo objetivo pretendia-se com a utilização de técnicas não convencionais, como por exemplo, presença de plasmídios, perfil eletroforético de proteínas de membrana e da superfície bacteriana e amplificação de DNA genômico, diferenciar as diversas linhagens uropatogênicas.

Dessa forma, a tabela X resume todos os resultados descritos nas tabelas anteriores, com exceção dos perfis plasmidiais, para que se possa visualizar, de maneira geral, todos os dados obtidos nos ensaios biológicos.

Com relação aos resultados envolvendo os fatores de virulência das UPEC, nenhuma correlação foi verificada entre as linhagens uropatogênicas e os grupos originais (TABELA I). Os resultados mostraram uma grande variabilidade entre as linhagens em exibir, ou não, estes fatores. No entanto, esta variabilidade fenotípica das linhagens uropatogênicas concorda com resultados anteriormente descritos por outros autores (CAPRIOLI et al., 1989; RYCKE et al., 1989).

Um dado reportado inicialmente envolvendo a intensidade de adesão de linhagens isoladas de pielonefrite foi verificado

TABELA X Reunião dos resultados obtidos nos ensaios com as cepas uropatogênicas

grupo original	lin.	adesão	hemaglutinação		hemolisina	grupo no ensaio de proteínas de superfície	grupo no ensaio "RAPD" (PCR - fingerprinting)
			MRSA	MSHA			
BSL	63	19,1	+	-	-	IV	A
	66	24,9	+	+	+	IV	C
	154	8,1	-	+	+	III	A
	177	23,6	-	-	-	III	A
	202	14,9	+	+	-	VIII	A
BL	7	35,8	-	+	+	IV	B
	9	18,3	-	-	-	VIII	A
	28	13,4	+	+	+	I	A
	46	62,3	+	+	+	I	A
	168	44,7	-	+	+	III	A
	178	17,7	+	+	-	VIII	C
	189	16,6	+	+	+	V	A
BLH	33	15,8	+	-	-	V	A
	70	20,0	+	-	+	II	A
	81	19,4	+	-	-	IV	A
	121	25,9	+	+	+	VI	A
	198	7,7	-	+	-	V	D
PIELONEFRITE	DT	63,3	ND	-	+	VII	B

nos testes de adesão com a cepa DT. A mesma aderiu a um número maior de células uroepiteliais, superando até mesmo o valor reportado por Johnson (1991). Entretanto, a cepa 46 do grupo BL exibiu um valor de adesão semelhante à DT, deixando claro que embora tenha sido isolada de cistite a mesma pode possuir capacidade de causar pielonefrite.

A detecção da expressão de fímbrias hemaglutinantes, novamente, mostrou-se uma grande variabilidade entre as linhagens, sendo que a presença de fímbrias tipo P, relacionada à patogenicidade, verificada em linhagens de diferentes grupos. A capacidade de adesão de algumas linhagens que não expressavam fímbrias hemaglutinantes indica que outros tipos de adesinas devem existir. Assim, os resultados dos perfis de proteínas de superfície indicaram a existência de bandas características de fímbrias em todas as linhagens, de modo que a não detecção de fímbrias através dos testes de hemaglutinação não descarta a possibilidade da presença de outras fímbrias, em especial, as não-hemaglutinantes.

Com relação à segunda parte dos objetivos, todas as linhagens, à exceção da 28 e 46, apresentaram características diversas em todos os testes realizados, não sendo possível qualquer relação de semelhança entre elas. Isso nos leva a propor que, apesar de existirem semelhanças com relação aos perfis eletroforéticos de proteínas de membrana e de superfície e de amplificação de DNA genômico com o uso de "primer", todas as linhagens à exceção das linhagens 28 e 46, são diferentes.

## 5 - BIBLIOGRAFIA

- ABRAHAM, J. M.; FREITAG, C. S.; GANDER, R. M.; CLEMENTS, J. R.; THOMAS, V. L. & EISENSTEIN, B. I. 1986. Fimbrial phase variation and DNA rearrangements in uropathogenic isolates of Escherichia coli. **Mol. Biol. Med.** 3: 495-508.
- AKOPYANZ, N. ; BUKANOV, N. O. ; WESTBLOM, T. U. ; KRESOVICH, S. & BERG, D. E. 1992. DNA diversity among clinical isolates of Helicobacter pylori detected by PCR-based RAPD fingerprinting. **Nuc. Ac. Res.** 20: 5137-5142.
- ARNHEIM, N. & ERLICH, H. 1992. Polymerase chain reaction strategy. **Ann. Rev. Biochem.** 61: 131-156.
- 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. Ped. Gastroenterol. Nutr.** 2: 534-538.
- BALDWIN, T. J.; KNUTTON, S.; SELLERS, L.; MANJARREZ HERNANDEZ, H. A.; AIKTEN, & WILLIAMS, P. H. 1992. Enteroadgregative E. coli strains secrete a heat-labile toxin antigenically related to E. coli hemolysin. **Infect. Imm.** 60(5): 2092-2095.

BAVOIL, P.; OHLIN, A. & SCHACHTER, J. 1984. Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in Chlamydia trachomatis. **Infect. and Imm.** **44**: 479-485.

BENEDETTI, C.E. 1991 Análise eletroforética de proteínas de membrana de Pseudomonas avenae e Pseudomonas rubrilineans patogênicas a gramíneas. Campinas, 76p. (Tese-Mestrado-Universidade Estadual de Campinas).

BLUM, H. ; BEIER, H. & GROSS, H. J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electroph.** **8**: 93-99.

BOYER, H. W. & ROULLAND-DUSSOISE, D. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli. **J. M. Biol.** **41**: 459-472.

BRAY, J. 1945. Isolation of antigenically homogeneous strains of Bact. coli neapolitanum from summer diarrhoea of infants. **J. Pathol. Bacteriol.** **57**: 239-247.

BROCHI, M. 1992. Clonagem e deleção do gene LTb de Escherichia coli de origem suína para ser utilizado como carreador de epitopos antigênicos. Campinas, 169p, (Tese-Mestrado-UNICAMP).

CAPRIOLI, A.; FALBO, V.; RODA, L. G.; RUGGERI, F. M. & ZONA, C. 1983. Partial purification and characterization of an Escherichia coli toxic factor that induces morphological cell alterations. **Infect. and Imm.** 39: 1300-1306.

CAPRIOLI, A.; FALBO, V.; RUGGERI, F. M.; MINELLI, F.; ORSKOV, I. & DONELLI, G. 1989. Relationship between cytotoxic necrotizing factor production and serotype in hemolytic Escherichia coli. **J. of Clin. Microb.** 27: 758-761.

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. Microb.** 3: 95-99.

DELMER, M.; LAROCHE, Y.; AVESANI, V. & CORNELIS, G. 1986. Comparison of serogrouping and polyacrilamide gel electrophoresis for typing Clostridium difficile. **J. of Clin. Microb.** 24: 991-994.

DeMARCHI, J. M. 1990. The polymerase Chain Reaction. **Clin. Microb. Newsletter** 12(11): 81-84.

DIJKSHOORN, L.; TJERNBERG, B.; POT, B.; MICHEL, M. F. & URSING, J & KERSTERS, K. 1990. Numerical analysis of cell envelope protein profiles of Acinetobacter strains classified by DNA-DNA hybridization. **System. Appl. Microbiol.** 13: 338-344.

- DONNENBERG, M. S. & KAPER, J. B. 1991. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic E. coli by using a positive-selection suicide vector. **Infect and Imm.** 59: 4310-4317.
- EGAVISH, A. 1993. Effects of Escherichia coli and Escherichia coli-lipopolysaccharide on function of human ureteral epithelial cells cultured in serum-free medium. **Infect. and Imm.** 61: 3304-3312.
- EHRlich, G. D. 1991. Caveats of PCR. (Editorial). **Clin. Microb. Newsletter** 13: 149-151.
- EVANS, D. G.; EVANS, D. J. Jr. & CLEGG, S. 1980. Detection of enterotoxigenic Escherichia coli colonization factor antigen I in stool specimens by an enzyme-linked immunosorbent assay. **Infect. and Imm.** 12: 738-743.
- EVANS, D. G.; SILVER, R. P.; EVANS, D. J. CHASE, D. G. & GORBACH, S. L. 1975. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in Escherichia coli enterotoxigenic for humans. **Infect. and Imm.** 12: 656-667.
- FINLAY B. B. & FALKOW S. 1989. Common themes in Microbial Pathogenicity. **Microb. Rev.** 53: 210-230.



GAASTRA W. & GRAAF, F. K. 1992. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic Escherichia coli strains. **Microb. Rev.** 46: 129-161.

HAGBERG, L.; JODAL, U.; KORHONEN, K.; LIDIN-JANSON, G.; LINDBERG, U. & SVANBORG-EDEN, C. 1981. Adhesion, Hemagglutination and Virulence of Escherichia coli causing urinary tract infection. **Infect. and Imm.** 31:564-570.

HAMES, B. D. & RICKWOOD, D. 1982. Gel electrophoresis of proteins: A practical approach. IRL Press Limited, England.

HANAHAH, D. 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. **J. Mol. Biol.** 166: 557-580.

HANSON, M. S.; HEMPEL, J. & BRINTON, C. C. 1988. Purification of the Escherichia coli type 1 pilin and minor pilus proteins and partial characterization of the adhesin protein. **J. Bacteriol.** 170: 3350-3358.

HARRIS, J. R.; WACHSMUTH, I. K.; DAVIS, B. R. & COHEN, M. L. 1982. High-molecular-weight plasmid correlates with Escherichia coli enteroinvasiveness. **Infect. and Imm.** 37: 1295-1298.

HINSON, G. & WILLIAMS, P. H. 1989. Adhesins of pathogenic Escherichia coli. In: HOPWOOD, D. A. & CHARTER, K. E. Genetics of Bacterial Diversity, chap. 14, pp. 287-307, Academic Press Limited, London, U. K.

JERSE, A. E. & KAPER, J. B. 1991. The eae gene of enteropathogenic E. coli encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EA plasmid. **Infect. Imm.** 59:4302-4309.

JOHN ALBERT, M.; QADRI, FIRDAUSI; HAQUE, AZIZUL & BHUIYAN N. A. 1993. Bacterial Clump formation at the surface of liquid culture as a rapid test for identification of enteroaggregative E. coli. **J. Clin. Microbiol.** 31(5): 1397-1399.

JOHNSON, J. R. 1991. Virulence Factors in Escherichia coli Urinary Tract Infection. **Clin. Microb. Rev.** 4: 80-128.

JOHNSON, J. R. & STAMM, W. E. 1989. Urinary tract infections in women: diagnosis and therapy. **Ann. Intern. Med.** 111: 906-917.

JUANG, R. H.; CHANG, Y. D.; SUNG, H. Y. & SU, J. C. 1984. Ovendrying method for polyacrylamide gel slab placked in cellophane sandwich. **Anal. Biochem.** 141: 348-350.

- KARCH, H.; HEESEMAN, J.; LAUFS, R.; O'BRIEN, A.D; TACKET, C. O. & LEVINE, M. M. 1987. A plasmid of enterohemorrhagic Escherichia coli 0157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. **Infect. and Imm.** 55: 455-461.
- KAUFMANN, P. E. 1947. The serology of the coli group. **J. of Immunol.** 57: 71-100.
- KLEMM, P. 1985. Fimbrial adhesions of Escherichia coli. **Rev Infect. Dis.** 7: 321-340.
- LEVINE, M. M. 1984. Escherichia coli infections. In: Bacterial Vaccines, chapter 7, 187-235, London, Academic Press.
- LEVINE, M. M. 1987. Escherichia coli that causes diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. **J. of Infect. Dis.** 155: 377-389.
- LEVINE, M. M.; BERGQUIST, E. J.; NALIN, D. R.; WATERMAN, D. H.; HORNICK, R. B.; YOUNG, C. R.; SOTMAN, S. & ROWE, B. 1978. Escherichia coli strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. **Lancet I**: 1119-1122.

- 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.; KAPER, J. B.; BLACK, R. E. & CLEMENTS, M. L. 1983. New knowledge of pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. **Microb. Rev.** 47: 510-550.
- LUND, A.; HELLEMANN, A. L. & VARTDAL, F. 1988. Rapid isolation of K88<sup>+</sup> Escherichia coli by using immunomagnetic particles. **J. Clin. Microbiol.** 26: 2572-2575.
- MANFIO, G. P. 1990. Caracterização eletroforética e expressão das fímbrias FY e 31A de amostras de Escherichia coli de origem bovina. Campinas, 235p, (Tese-Mestrado-UNICAMP).
- MAURER, L. & ORNDORFF, P. E. 1987 Identification and characterization for genes determining receptor binding and pilus length of Escherichia coli type 1 pili. **J. Bacteriol.** 169: 640-645.
- MICKLOS, P. & MEYER, T. F. 1990. Basic Tools and Techniques of DNA Science Chapter 3, 39-60. In: ----- & ----- **DNA Science** Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.

MILLER, V. L. & MEKALANOS, J. J. 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmorregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in Vibrio cholerae requires ToxR. **J. of Bacteriol.** 170: 2575-2583.

NATARO, J. P.; BADINI, M. M.; KAPER, J. B.; BLACK, R. E.; BRAVO, N. & LEVINE, M. M. 1985. Detection of an adherence factor of enteropathogenic Escherichia coli with a DNA probe. **J. of Infect. Dis.** 152: 560-565.

NEIDHARDT, F. C. 1987. Escherichia coli and Salmonella typhimurium-Cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

NOGUEIRA, P. A & COSTA, C. 1991. Diversidade Biológica da Bactéria Fitopatogênica Pseudomonas syringae pv. tabaci. Botucatu, 49p. (Monografia - Universidade Estadual Paulista).

O'BRIEN, A. D.; LIVELY, T. A.; CHEN, M. E.; ROTHMAN, S. W. & FORMAL, S. B. 1983. Escherichia coli O157:H7 strains associated with hemorrhagic colitis in the United States produced a Shigella dysenteriae 1 (Shiga) like cytotoxin. **Lancet I**: 702.

- O'BRIEN, A. D. & HOLMES, R. K. 1987. Shiga and Shiga-like toxins. **Microb. Rev.** 51: 206-220.
- O'HANLEY, P.; LALONDE, G. & JI, G. 1991. Alpha-hemolysin contributes to the pathogenicity of piliated digalactoside-binding Escherichia coli in the kidney: Efficacy of an alpha-hemolysin vaccine in preventing renal injury in the BALB/c mouse model of pyelonephritis. **Infect. and Imm.** 59(3): 1153-1161.
- ORSKOV, I.; ORSKV, F.; SOJKA, W. J. & LEACH J. M. 1961. Simultaneous occurrence of Escherichia coli B and L antigens in strains from diseased swine. **Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B.** 53: 404-422.
- OSBORN, M. J. & WU, H. P. C. 1980. Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria. **Ann. Rev. Microbiol.** 34: 369-422.
- PFALLER, M. A. & HOLLINS, R. J. 1989. Use of plasmid profiles and endonuclease analysis of plasmid DNA as epidemiologic and diagnostic tools in the clinical microbiology laboratory. **Clin. Microb. Newsletter** 11(18): 137-141.
- PODZORSKI, R. P. & PERSING, D. H. 1993. PCR: The next decade. **Clin. Microb. Newsletter** 15(18): 137-143.

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 colitis associated with rare Escherichia coli serotype. **N. Engl. J. Med.** 308: 681-685.

RYCKE, J. de; PHAN-THANH, L. & BERNARD, S. 1989. Immunochemical identification and biological characterization of cytotoxic necrotizing factor from Escherichia coli. **J. of Clin. Microb.** 27: 983-988.

SADOWSKI, P. L.; PETERSON, B. C.; GERDING, D. N. & CLEARY, P. D. 1979. Physical characterization of ten R plasmids obtained from an outbreak of nosocomial Klebsiella pneumoniae infections. **Antimicrob. Agents Chemother.** 15: 616-624.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S. FALLONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A. & ARNHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** 230: 1350-1354.

SAIKI, R. K.; GELFRAND, D. H.; STOFFEL, B.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T. & ERLICH, H. A. 1988. Primer-directed Enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** 239: 487-491.

SCHNAITMAN, C. A. 1970. Protein composition of the cell wal and  
citoplasmatic membrane of Escherichia coli. **J. of Bacteriol.**  
**104**: 890-901.

SCHNAITMAN, C. A. 1971. Solubilization of the citoplasmatic  
membrane of Escherichia coli by triton X-100. **J. of**  
**Bacteriol.** **108**: 545-552.

SMITH, H. W. & LINGOOD, M. A. 1972. Further observations on  
Escherichia coli enterotoxins with particular regard to those  
produced by atypical piglets strains and calf and lamb  
strains: the transmissible nature of these enterotoxins and  
of a K antigen possessed by calf and lamb strains. **J. Med.**  
**Microb.** **5**: 243-250.

SVANBORG-EDEN, C.; ERIKSON, B. & HANSON, L. A. 1977. Adhesion of  
Escherichia coli to human uroepithelial cells in vitro.  
**Infect. and Imm.** **18**: 767-774.

TOLEDO, M. R. F.; ALVARIZA, M. C. B.; MURAHOVSKI, J.; RAMOS, S.  
R. T. S. & TRABULSI, L. R. 1983. Enteropathogenic Escherichia  
coli serotypes and endemic diarrhea in infants. **Infect. and**  
**Imm.** **39**: 586-589.



- TRABULSI, L. R. 1989. *Microbiologia* 2<sup>a</sup>Ed. Livraria Atheneu, 386p.
- TZIPORI, S.; WACHSMUTH, I. K.; CHAPMASN, C.; BIRNER, R.; BRINTTINGHAM, J.; JACKSON, C. & HOGG, J. 1986. The pathogenesis of hemorrhagic colitis caused by Escherichia coli O157:H7 in gnotobiotic piglets. **J. of Infect. Dis.** **154**: 712-716.
- VAISANEN-RHEN, V.; ELO, J.; VAISANEN, E.; SHITONEN, A.; ORSKOV, I; ORSKOV, F; SVENSON, S. B. MAKELA, P. H. & KORHONEN, T. 1984 P-fimbriated clones among uropathogenic Escherichia coli strains. **Infect. and Imm.** **43**: 149-155.
- WALIA, S.; DUREKA, P. & MUKERJEE, S.K. 1988. Protein patterns, serotyping and plasmid DNA profiles in the epidemiologic fingerprinting of Pseudomonas aeruginosa. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** **7**: 248-255.
- WELSH, J. & McCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic. Ac. Res.** **18**: 7213-7218.
- WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic. Ac. Res.** **18** : 6531-6535.

YOUNG, R. A. & DAVIS, R. W. 1983. Efficient isolation of genes by using antibody probes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80**: 1194-1198.