

BC/19201
IB/80204

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO



VANESSA SPERANDIO

TÍTULO: ESTUDOS GENÉTICOS EM AMOSTRAS DE Escherichia coli
PORTADORAS DO FATOR DE COLONIZAÇÃO F42

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

Vanessa Sperandio

25/03/93

e aprovada pela Comissão Julgadora *[assinatura]*

Dissertação apresentada ao Departamento
de Genética e Evolução do Instituto de
Biologia, para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas na área de
Genética

Orientador: Prof. Dr. Wanderley D. da Silveira

Campinas, 1993

T/UNICAMP

Sp36_e

930697

BIOTECNICA CENTRAL

UNIDADE	IB/193
ALICATADA:	
TIPO	7/UNICAMP
SP	362
	19201
	261/93
	☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☒
PREÇO	R\$ 100.000,00
DATA	12/05/93
Nº CPD	

Cm 00045226-0

DEDICO

A, meus pais Lesi Correa e Nardir Antônio Sperandio pelo apoio, força e carinho que sempre me deram e sem os quais este trabalho não seria possível.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço ao orientador e amigo Dr. Wanderley pela excelente orientação, dedicação e por todo o conhecimento que adquiri por seu intermédio e exemplo de pesquisador batalhador e dedicado.

Agradeço a Prof. Dra. Yoko Bomura Rosato pela ajuda nos passos burocráticos dessa tese, sua amizade e sua participação na pré-banca e banca dessa tese, bem como na banca do meu exame de qualificação.

Agradeço ao Prof. Dr. Tomomasa Yano pela sua colaboração, amizade, facilidades concedidas em seu laboratório, doação das amostras e participação na pré-banca e banca dessa tese, bem como na banca do meu exame de qualificação.

Agradeço ao Prof. Dr. Benedito de Oliveira por sua participação na pré-banca dessa tese e pelas facilidades concedidas no uso de materiais do laboratório de química de proteínas do Departamento de Bioquímica.

Agradeço ao Prof. Dr. Renato Bonatelli pela sua amizade e participação na banca do meu exame de qualificação.

Aos professores do Departamento de Microbiologia: Sílvia Gatti, Domingos Leite, Prof. Dra. Marlene Serafim, Prof. Dr. Tomomasa Yano, Prof. Dra. Lucila Costallat Ricci e Prof. Dr. Pestana F. Castro pelo empréstimo de materiais, doação de amostras e antissoros e facilidades concedidas em seus laboratórios, sem as quais esta tese seria inviável.

Ao Prof. Dr. Fernando do laboratório de Genética molecular do Departamento de Hematologia FCM, pela síntese do oligonucleotídeo de F41 e utilização de seu laboratório e materiais para confecção desta sonda.

A Prof. Dra. Tânia Tardelli e sua funcionária Mônica do departamento de Microbiologia da Escola Paulista de medicina pelas facilidades e ajuda concedida na confecção da sonda molecular do gene da fímbria K99.

A Prof. Dra. Solange Farah pelas dicas e utilização de sua máquina para extração dos DNAs cromossômicos das amostras.

Ao Prof. Dr. Paulo Arruda pelas facilidades concedidas em seu laboratório para utilização de materiais e equipamentos.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia: Stelinha, Terezinha, Seu Manoel, Seu Garcia, Seu Guilherme, Isildinha, Evandro e Genessy pela amizade e inestimável ajuda.

A funcionária Edi da Genética médica pela amizade e ajuda nas extrações de DNAs cromossômicos das amostras.

Aos amigos de todas as horas do laboratório: Fabiana Fantinatti, Marcelo Brocchi, Sérgio Mendonça, Cristiana Seixas, Paulo Afonso Nogueira, Paulo Moretti, Edmir e Patrícia Orlandi pela agradável convivência e ajuda inestimáveis não só profissionalmente, mas como pessoalmente.

Aos amigos Cleide Marques Ferreira e André Catani pela força, ajuda e empréstimos de computador intermináveis, sem os quais esta tese e os relatórios doloridos não seriam possíveis.

A amiga e ex-companheira de laboratório Eneida Parizoto, pela amizade e companheirismo que sempre demonstrou.

A amiga Fabiana Fantinatti por toda a ajuda e carinho que me proporcionou nos momentos difíceis.

As amigas Mônica, Patrícia e Sílvia da Hematologia pela enorme força com a sonda F41 e pela agradável convivência.

Aos amigos Regina Baldini e Gonçalo do CEBMEG pelas dicas, convivência e amizade que sempre demonstraram.

A amiga Cristiana Seixas pela ajuda e companheirismo.

Ao amigo Marcelo Brocchi por toda ajuda e pelos eternos empréstimos de seu computador, sem os quais esta tese não seria possível.

A amiga Silvana da Botânica pelo companheirismo e apoio.

Ao Prof. Dr. Camilo do laboratório de química de proteínas do departamento de Bioquímica pela ajuda e empréstimos de materiais e equipamentos.

Aos meus pais Lesi Correa e Nardir Antônio Sperandio e ao Tio Léo pelo apoio, confiança e carinho que sempre me deram.

Ao Pazel pelas eternas vindas de Sábado e Domingo na UNICAMP e pela paciência e carinho que um dia demonstrou ter por mim.

ÍNDICE:

1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	3
2.1. <u>Escherichia coli</u> associadas com infecções extra intestinais.....	4
2.1.1. <u>Escherichia coli</u> uropatogênicas (UPEC).....	4
2.1.2. <u>Escherichia coli</u> meningíticas.....	6
2.2. <u>Escherichia coli</u> associadas com infecções intestinais....	7
2.2.1. <u>Escherichia coli</u> enteropatogênicas b ássicas (EPEC)...	7
2.2.2. <u>Escherichia coli</u> enterohemorrágicas (EHEC).....	10
2.2.3. <u>Escherichia coli</u> enteroinvasivas (EIEC).....	11
2.2.4. <u>Escherichia coli</u> enteroaderentes (EAEC).....	12
2.2.5. <u>Escherichia coli</u> enterotoxigênicas (ETEC).....	12
2.2.5.1. Enterotoxinas produzidas por ETEC.....	13
2.2.5.2. Adesinas ou atores de colonização em ETEC.....	17
3. Material e Métodos.....	25
3.1. Material.....	25
3.1.1. Meios de cultura.....	27
3.1.1.1. Meio Caye.....	27
3.1.1.2. Meio CFA.....	27
3.1.1.3. Meio LB.....	28
3.1.1.4. Meio LA.....	28
3.1.1.5. Meio ágar MacConkey.....	28
3.1.1.6. Meio mínimo.....	29
3.1.1.7. Meio BHI e BHI ágar.....	29
3.1.1.8. Meio SOC.....	29
3.1.2. Soluções e reagentes de uso geral.....	30
3.1.2.1. Solução Alsever.....	30
3.1.2.2. Tampão PBS 0,05M.....	30
3.1.2.3. Soluções para a extração de DNA plasmidial.....	30
3.1.2.4. Soluções para eletroforese de DNA em gel de agarose.....	32
3.1.2.5. Soluções para visualização de DNA em U.V.....	32
3.1.2.6. Soluções para teste de toxina STa.....	33
3.1.2.7. Soluções para visualização de fímbrias através de microscopia eletrônica.....	33
3.1.2.8. Soluções para SDS-PAGE.....	34

3.1.2.9. Soluções para western-blotting.....	37
3.1.2.10. Soluções utilizadas na marcação da sonda molecular K99 e no teste de hibridização.....	37
3.1.2.11. Tampões e soluções para biologia molecular.....	40
3.1.2.12. SSPE 20X.....	41
3.1.2.13. Tampão T4 quinase 10X.....	41
3.1.2.14. Tampão TNE.....	41
3.1.2.15. Solução de pré-hibridização da sonda F41.....	42
3.1.2.16. Solução de hibridização da sonda F41.....	42
3.1.2.17. Solução de lavagem I.....	42
3.1.2.18. Solução de lavagem II.....	42
3.2. Métodos.....	43
3.2.1. Determinação do nível de resistência a antimicrobianos.....	43
3.2.2. Detecção da fator de colonização "F42".....	43
3.2.3. Detecção de enterotoxina STa.....	44
3.2.4. Teste de produção de bacteriocina.....	44
3.2.5. Estimativas dos pesos moleculares dos plasmídios das amostras estudadas.....	45
3.2.6. Seleção da resistência ao antimicrobiano estreptomicina.....	45
3.2.7. Extração e visualização plasmidial através de eletroforese em gel de agarose.....	46
3.2.7.1. Preparo montagem e corrida do gel de agarose.....	46
3.2.8. Visualização de fímbrias através de microscopia eletrônica.....	47
3.2.8.1. Preparo das telas de microscopia eletrônica.....	47
3.2.8.2. Preparo das amostra bacterianas, coloração negativa com PTA e visualização de fímbrias através de microscopia eletrônica.....	47
3.2.9. Extração de proteínas de superfície e eletroforese em SDS-PAGE.....	48
3.2.9.1. Extração de proteínas de superfície.....	48
3.2.9.2. Eletroforese em SDS-PAGE.....	49
3.2.9.3. Coloração de prata.....	49
3.2.10. Reação das amostras com antissoros anti-F42, anti-F41, anti-K88, anti-987P, anti-K99 e anti-CS31a.....	50

3.2.11. Adsorção dos antissoros anti-F42, anti-F41 e anti-CS31a contra a amostra ORN115 (crescida a 37°C) e as amostras 567/7 3 103 (crescidas a 16°C).....	50
3.2.12. Western-blotting das proteínas de superfície das amostras 567/7 e 103 com os antissoros anti-F42 não adsorvido e adsorvido e anti-F41 adsorvido.....	51
3.2.13. Conjugação entre as amostras 103Sm ^r e HB101(pMR5)...	52
3.2.14. Eliminação plasmidial com plasmídios de incompatibilidade.....	53
3.2.15. Experimento de transformação.....	53
3.2.15.1. Extração de DNA plasmidial para a transformação..	53
3.2.15.2. Preparo de células competentes.....	54
3.2.16. Conjugação entre a amostra 103-11C e C600.....	54
3.2.17. Conjugação com amostras portadoras de plasmídios de diferentes grupos de incompatibilidade.....	55
3.2.18. Cura plasmidial com SDS.....	55
3.2.19. Conjugação entre as amostra 103Sm ^r e SM10λpir(pRT733).....	56
3.2.20. Conjugação entre as amostras 567/7 e SM10λpir(pRT733).....	57
3.2.21. Amplificação e extração em larga escala do plasmídio pFK99.....	57
3.2.22. Purificação plasmidial por gradiente de CsCl.....	57
3.2.23. Extração de brometo de etídio de preparações de DNA.	58
3.2.24. Dosagem de concentração de DNA em amostras purificadas.....	58
3.2.25. Digestão com enzimas de restrição.....	59
3.2.26. Purificação de fragmentos de DNA em agarose tipo VII ("low melting point", Sigma).....	59
3.2.27. Purificação de DNA plasmidial através de extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico.....	60
3.2.28. Desnaturação de DNA para posterior hibridização com sonda K99.....	60
3.2.29. Marcação dos fragmentos de DNA com nucleotídeos radioativos.....	60
3.2.30. Purificação das sondas.....	61
3.2.31. Hibridização do "southern-blot" com a sonda K99.....	62
3.2.32. Lavagem do gel.....	62

3.2.33. Colony-blot das amostras 103, 567/7, B41, B41M e HB101(pBR322) com a sonda molecular do gene da fímbria K99.....	62
3.2.34. Extração de DNA cromossômico das amostras 567/7, 103, B41 e B41M.....	63
3.2.35. Preparação das amostras para aplicação no dot-blotting.....	63
3.2.36. Dot-blotting dos DNAs cromossômicos das amostras 567/7, 103, B41, B41M e dos plasmídios PFK99 e PFM205.....	64
3.2.37. Síntese de oligonucleotídeo de sequência específica do gene da fímbria F41.....	64
3.2.38. Marcação do oligonucleotídeo de F41 com γP^{32} -ATP....	64
3.2.39. Purificação sonda F41.....	65
3.2.40. Hibridização do filtro de dot-blotting com a sonda F41.....	65
4. Resultados.....	66
4.1. Caracterização biológica das amostras bacterianas.....	66
4.1.1. Resistência a antimicrobianos.....	66
4.1.2. Teste de hemaglutinação.....	68
4.1.3. Produção de enterotoxina STa.....	68
4.1.4. Perfil plasmidial.....	70
4.1.5. Produção de bacteriocina.....	70
4.2. Estudos genéticos.....	73
4.2.1. Conjugação da amostra 103 com HB101(pMR5) para mutagênese com transposon Tn801.....	73
4.2.2. Conjugação da amostra 103-11C com a amostra C66.....	73
4.2.3. Transformação da linhagem DH5 α com os plasmídios da amostra 103-11C.....	73
4.2.4. Conjugação da amostra 103-11C com amostras portadoras de plasmídios de diferentes grupos de incompatibilidade.....	75
4.2.5. Eliminação plasmidial com SDS.....	75
4.2.6. Conjugação entre a amostra 103Sm ^r e a amostra SM10 λ pir(pRT733).....	75
4.2.7. Conjugação entre as amostras SM10 λ pir(pRT733) e 567/7.....	75

4.3. Verificação da presença de fímbrias nas amostras 567/7, 103 e 103-TXP6.....	76
4.3.1. Visualização de fímbrias através de microscopia eletrônica.....	76
4.3.2. Perfil de proteínas de superfície em SDS-PAGE.....	81
4.3.3. Reação com antissoros anti-F42, anti-F41, anti-K99 (produzidos pelo Depto. de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP), anti-K88, anti-987P e anti-CS13a.....	84
4.3.4. Western-blotting das proteínas de superfície das amostras 567/7 e 103 Sm ^r com o antissoro anti-F42 não adsorvido.....	86
4.3.5. Western-blotting das proteínas de superfície das amostras 567/7, B41 e 103 com os antissoros anti-F42 e anti-F41 adsorvidos.....	86
4.3.6. Hibridização com sonda molecular do gene da fímbria K99.....	91
4.3.7. Hibridização do dot-blot com a sonda molecular do gene da fímbria F41.....	91
5. Discussão.....	97
6. Resumo.....	105
7. Abstract.....	107
8. Referências bibliográficas.....	109

ÍNDICE DE TABELAS E DE FIGURAS:

-Tabela 1-Amostras utilizadas no presente trabalho.....	26
-Tabela 2-Resistência a antimicrobianos e capacidade de degradação de lactose.....	67
-Tabela 3-Padrões de hemaglutinação e produção de enterotoxina termoestável STA.....	69
-Tabela 4-Designações e estimativas dos pesos moleculares dos plasmídios visualizados nas amostras 567/7 e 103.....	71
-Tabela 5-Reações com antissoros anti-F42, anti-F41, anti-K99 e anti-CS31a.....	85
-Figura 1-Perfil plasmidial em gel de agarose das amostras de <u>Escherichia coli</u> usadas no presente trabalho.....	72
-Figura 2-Perfil plasmidial de amostras de <u>Escherichia coli</u> em gel de agarose 0,7%.....	74
-Figura 3-Fotomicrografia eletrônica da amostra 567/7 (aumento de 9640X) crescida em meio CFA a 37°C.....	77
-Figura 4-Fotomicrografia eletrônica da amostra 567/7 (aumento de 22704X) crescida em meio CFA a 16°C.....	78
-Figura 5-Fotomicrografia eletrônica da amostra 103Sm ^r (aumento de 22704X) crescida em meio CFA a 37°C.....	79
-Figura 6-Fotomicrografia eletrônica da amostra 103-TXP6 (aumento de 22704X) crescida em meio CFA a 37°C.....	80
-Figura 7-Gel SDS-PAGE 13% de proteínas de superfície das amostras 567/7, 103 e 103-TXP6.....	82
-Figura 8-Gel SDS-page 13% proteínas de superfície das amostras estudadas.....	83
-Figura 9-Filtro de western-blotting das proteínas de superfície das amostras 567/7 e 103Sm ^r com o antissoro anti-F42 não adsorvido.....	87
-Figura 10-Gel SDS-PAGE 13% das proteínas de superfície das amostras 567/7, 103 e B41 crescidas a 37°C.....	88
-Figura 11-Filtro de western-blotting das proteínas de superfície das amostras 567/7, B41 e 103, crescidas a 37°C, contra o antissoro anti-F42 adsorvido.....	89
-Figura 12-Filtro de western-blotting das proteínas de superfície das amostras 567/7, B41 e 103, crescidas a 37°C, contra o antissoro anti-F41 adsorvido.....	90

-Figura 13-Gel de agarose 0,7% usado na hibridização com a sonda K99.....	92
-Figura 14-Autorradiografia da hibridização do "southern-blot" com a sonda molecular do gene da fimbria K99.....	93
-Figura 15-Colony-blot hibridizado com a sonda molecular do gene da fimbria K99.....	94
-Figura 16-Gel de agarose 1,5% do plasmídio pFK99 não digerido, pFK99 digerido e do padrão de peso molecular.....	95
-Figura 17-Hibridização do dot-blot com a sonda molecular da fimbria F41.....	96

1. INTRODUÇÃO:

A habilidade que certas bactérias possuem de aderirem a células epiteliais de eucariotos é reconhecida como uma característica fundamental para a colonização dos tecidos hospedeiros "in vivo". Para vários organismos patogênicos, a aderência aos tecidos é de importância fundamental, uma vez que eles têm que competir com os organismos comensais normais para uma colonização eficaz das superfícies epiteliais celulares do hospedeiro. Mecanismos específicos de aderência são importantes na adesão de Escherichia coli, Neisseria e Mycoplasma a vários tecidos epiteliais (Gaastra & de Graaf, 1982).

A patogenicidade de Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC) envolve a aderência do patógeno às células do intestino do hospedeiro, onde enterotoxinas produzidas pela bactéria causam a secreção de fluídos e eletrólitos para a luz intestinal. A aderência é mediada por proteínas antigênicas denominadas fímbrias. Diversos tipos de adesinas de ETEC foram descritas, e cada uma delas, confere um certo grau de especificidade pelo hospedeiro. Muitas adesinas também conferem às células bacterianas a habilidade de aglutinar eritrócitos de várias espécies em presença do açúcar D-manose. O teste de hemaglutinação manose-resistente é um meio conveniente para investigar a presença de adesinas características (de Graaf & Roorda, 1982; Morris et alii, 1983). As adesinas descritas até hoje como importantes para ETEC humanas são: CFA/I (Evans et alii, 1975), CFA/II (Evans & Evans, 1978), CFA/III (Darfenille et alii, 1983), E8775 ou CFA/IV (Thomas et alii, 1982) e PCF0159 (Tacket et alii, 1987 *apud* Levine, 1987). Entre as espécies animais de ETEC foram descritos os antígenos K88 (Orskov et alii, 1961), 987P (Nagy et alii, 1976), K99 (Orskov et alii, 1975), F41 (de Graaf & Roorda, 1982) e CS31a (de Graaf, 1990).

Um novo fator de colonização de ETEC animal isolada de fezes diarreicas de suínos recém-nascidos, denominado F42, foi descrito por Yano et alii (1986). Esta fímbria apresentava um padrão de hemaglutinação manose-resistente diferente. Sua subunidade proteica apresentava peso molecular de 31Kda (Leite et

alii, 1988) e em fotomicrografias eletrônicas apresentava-se como uma fimbria rígida só expressa a 37°C (Yano et alii, 1986).

Este trabalho teve como objetivo inicial o estudo genético e molecular de duas amostras de Escherichia coli do grupo ETEC portadoras do fator de colonização "F42".

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

Escherichia coli é a espécie-tipo do gênero Escherichia que contém bactérias em forma de bastonetes gram-negativos, móveis, que pertencem à tribo Escherichia e à família Enterobacteriaceae (Edwards & Ewing, 1972). A espécie Escherichia coli é serotipada com base nos seus antígenos de superfície: "O"(somático), "H" (flagelar) e "K"(capsular) (Edwards & Ewing, 1972). Os 171 antígenos somáticos "O" conhecidos são lipopolissacarídeos, que formam complexos associados à membrana da bactéria, são termoestáveis e não são inativados à temperatura de 100°C ou 121°C (Gaastra & de Graaf, 1982; Levine, 1987). Os antígenos flagelares "H" são proteicos e termossensíveis, sendo inativados a 100°C (Gaastra & de Graaf, 1982). São conhecidos 56 antígenos "H" Escherichia coli (Levine, 1987). A denominação de antígeno "K" foi introduzida por Kauffman & Vahlne (1946) os quais são polissacarídeos, geralmente acídicos, que formam um envelope ou cápsula ao redor da parede celular da bactéria e podem promover a adesão às superfícies (Gaastra & de Graaf, 1982; Levine, 1987).

Os antígenos "O" e "H" constituem o sistema de classificação O:H, introduzido por Kauffman em 1947, o qual é empregado na caracterização dos sorotipos de amostras patogênicas de Escherichia coli (Levine, 1987).

A bactéria Escherichia coli é o mais comum microorganismo anaeróbio facultativo que habita o intestino do homem e de diversos animais, sendo de grande importância para a manutenção das funções fisiológicas normais dos mesmos (Levine, 1985). Mas é também um patógeno humano gram negativo comum (Levine, 1985).

As amostras de Escherichia coli que são patogênicas para o homem, animais ou aves, o são devido à capacidade que as mesmas possuem de colonizar, invadir e\ou destruir tecidos, produzir toxinas ou serem capazes de captar produtos essenciais do hospedeiro (Curtiss III et alii, 1988).

A diversidade de doenças infecciosas descritas na literatura médica e veterinária, relacionando E. coli como o

agente causal destas doenças, vem sofrendo atualizações cada vez mais frequentes com a descoberta de novos mecanismos de patogenicidade e também, com a elucidação dos processos infecciosos de doenças já descritas (Levine, 1987). Estas doenças compreendem desde diarreias e disenterias em neonatos e adultos, até infecções urinárias, meningites e septicemias (Hison & Williams, 1989; Levine, 1984, 1985, 1987).

A classificação de E. coli patogênicas, descrita a seguir, segue primeiramente o tipo de infecção causada pelo microorganismo no homem, suas características e a sintomatologia clínica (Levine, 1985, 1987).

2.1.-Escherichia coli associadas com infecções extra intestinais.

Dentre as E. coli causadoras de infecções extra intestinais estão aquelas causadoras de infecções no trato urinário, também conhecido pela sigla UTI (Urinary Tract Infection) (Jhonson, 1991) e aquelas causadoras de meningite (Levine, 1984).

2.1.1-Escherichia coli uropatogênicas (UPEC).

A bactéria E. coli é o organismo infectivo mais comum em infecções do trato urinário (Ree et alii, 1985), sendo responsável pela ocorrência de infecções urinárias, cistites e/ou pielonefrites (Levine, 1984). Um dos importantes fatores de virulência é a capacidade de adesão de E. coli uropatogênicas às células uroepiteliais, adesão esta, que é mediada por fímbrias (Svanborg-Edén et alii, 1981; Van den Bosch et alii, 1980 & Van den Bosch et alii, 1982).

Amostras de E. coli uropatogênicas podem apresentar normalmente fímbrias do tipo 1, fímbrias do tipo P (Aronson et alii, 1979; Christensen et alii, 1985; Van Die et alii, 1985; Hagbert et alii, 1983; Hagbert et alii, 1981; Leffer &

Svanborg-Eden, 1981; de Ree et alii, 1985) e fímbrias tipo X (Välsänen et alii, 1982).

Fímbrias tipo 1 reconhecem resíduos de D-manose na superfície celular do hospedeiro como receptores específicos e podem aderir a quase todos os tecidos humanos, como células sanguíneas (hemácias e leucócitos), células do epitélio bucal, enterócitos, células uroepiteliais e uromucóides (proteína de Tamm-Horsfall) (Davis et alii, 1981; Duguid & Old, 1980; Firon et alii, 1982). Fímbrias tipo 1 são tubulares, com diâmetro de 7nm, e compostas por três subunidades proteicas em menor quantidade (28, 16,5 e 14,5 Kda) associados à estrutura tubular composta por subunidade pilina de 17000Da (Hanson et alii, 1988). Hanson et alii (1988) caracterizaram a subunidade de 28Kda como sendo a subunidade da porção proteica com capacidade de ligação ao resíduo de D-manose, responsável pela capacidade de adesão. A sua regulação não é temperatura-dependente, expressa-se a 16°C e a 37°C, sendo os genes responsáveis pela sua expressão localizados no cromossomo. Apresenta a característica de variação de fase, isto é, pode apresentar perda de expressão durante várias gerações da bactéria, devido à inversão de um fragmento de 314bp contendo o promotor do gene *fimA*, codificador da subunidade da fímbria (Hinson & Williams, 1987; Maurer & Ondorff, 1987).

Por outro lado, pesquisas em modelos não humanos sugerem um papel de fímbrias tipo 1 na patogenicidade relacionada a infecções do trato urinário (Aronson et alii, 1979; Hargberg et alii, 1983).

As fímbrias tipo P apresentam capacidade de adesão a células uroepiteliais e são classificadas em pap ("pyelonephritis-associated pili") e prs ("pap-related sequence") conforme o resíduo de açúcar que reconhecem.

As fímbrias tipo pap reconhecem a alfa-D-galactose-(1,4)-beta-D-galactose como receptor específico, a qual está associada ao tipo sanguíneo P (Van Die et alii, 1988).

As fímbrias do grupo prs reconhecem o antígeno de Forssman, constituinte de enterócitos de carneiro, o qual também está presente no epitélio da pélvis renal humana, ligando-se ao resíduo de galactose-N-acetil-alfa(1-3)galactose-N-acetil (Arthur

et alii, 1989).

O grupo de fímbrias P congrega vários tipos sorológicos distintos, reconhecidos como F7 a F13 (Van Die et alii, 1988).

O mecanismo de expressão e montagem das fímbrias tipo P encontra-se descrito e compreende um operon com 9 genes associados à regulação, síntese, transporte e montagem da subunidade do pilus e à codificação da adesina específica (Arthur et alii, 1989). Estudos de transcomplementação demonstraram que a codificação das adesinas específicas é a única diferença funcional entre os operons *pap* e *prs*, sendo que o gene *papG* codifica a adesina específica para eritrócitos do tipo sanguíneo P e o gene *prsG* codifica a adesina específica para o antígeno de Forssman (Arthur et alii, 1989).

As fímbrias que apresentam hemaglutinação manose-resistente e que reconhecem receptores diferentes do antígeno P foram denominadas fímbrias X. Uma destas fímbrias X específicas interage com glicoforina A e demonstra especificidade pelo grupo sanguíneo M (Väisänen et alii, 1982). Outras fímbrias X reconhecem um receptor que contém ácido neuroamínico, o qual no caso de várias linhagens investigadas era um neuroaminil- α -(2-3) galactosídeo (Parkkinen et alii, 1983).

2.1.2-Escherichia coli meningíticas.

As amostras de E. coli causadoras de meningites afetam crianças recém-nascidas numa frequência de 1 em 2000 a 4000 nascimentos. Essas amostras invadem a circulação sistêmica até atingir as meninges, podendo levar a criança à morte. Essas linhagens geralmente pertencem aos sorotipos 01, 07, 018, 075 (Levine, 1984).

Numa estimativa geral, 80% das amostras isoladas de Escherichia coli meningíticas apresentam antígeno capsular K1 (Overall, 1970, *apud* Levine, 1984).

O antígeno K1, denominado ácido colomínico, é um polissacarídeo ácido formado por um homopolímero 2-8-alfa do ácido N-acetilneuroamínico (ácido siálico). O antígeno K de E.

coli é idêntico em estrutura química ao polissacarídeo ácido do grupo B de Neisseria meningitidis, com o qual apresenta identidade sorológica completa (Levine, 1984).

2.2-Escherichia coli associadas com infecções intestinais.

As amostras de E. coli enteropatogênicas formam um grupo heterogêneo de organismos que causam infecções intestinais e diarreias por mecanismos diversos. Muitos autores concentram esforços no sentido de classificar as diferentes classes de E. coli enteropatogênicas. Levine (1987) descreveu o sistema de classificação mais adotado no momento. Este sistema de classificação está baseado nas diferentes propriedades de virulência, diferentes interações com a mucosa intestinal, diferentes sinais clínicos, diferenças em epidemiologia e distintos sorotipos O:H apresentados por este grupo de E. coli. Desta forma as E. coli enteropatogênicas são classificadas em 4 grandes grupos: Escherichia coli enteropatogênica clássica (EPEC), Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC), Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) e Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC). O sistema de classificação descrito por Levine (1987) também inclui um quinto grupo, as Escherichia coli enteroadesivas (EAEC) (Mathewson et alii, 1985; Mathewson et alii, 1986), embora tal grupo necessite de maiores dados para ser definitivamente aceito como tal.

2.2.1-Escherichia coli enteropatogênicas clássicas (EPEC).

E. coli enteropatogênicas (EPEC) são causadoras de síndrome de diarreia aquosa, vômitos e febre em neonatos e crianças; é altamente enteroadesiva e causa lesões histopatológicas em modelos animais (Polotsky et alii, 1977; Moom et alii, 1983b), bem como no intestino humano (Ulshen & Rollo, 1980; Rothbaum et alii, 1982). Estas amostras não apresentam

produção de toxinas termoestáveis (ST) ou termossensíveis (LT) (Levine, 1987). Nos estudos de microscopia eletrônica em intestino de coelho, as amostras de EPEC produzem uma lesão característica, aderindo fortemente às células epiteliais com destruição da bordadura em escova, mas sem invasão das células ou do tecido (Moon et alii, 1983). A destruição das microvilosidades intestinais impede a absorção normal de fluídos da luz intestinal, ocasionando uma diarreia não absorptiva, independente da atividade de enterotoxinas (Levine & Edelman, 1984; Uldhen & Rollo, 1980; Rothbaum et alii, 1982).

Muitas características das lesões causadas por EPEC se assemelham com os efeitos de certos hormônios sobre as células da mucosa intestinal (Matsudaira & Burgess, 1982). A atividade desses hormônios, em última instância, leva ao acúmulo de cálcio intracelular e a ativação da proteína fosfolipídica quinase C dependente de cálcio (PKC) que por sua vez atua sobre o citoesqueleto celular, alterando sua estrutura. Tais alterações foram implicadas com o efluxo de íons intestinais (Fondacaro & Henderson, 1985; Fondacaro, 1986). Com base nestas observações, Badwin et alii (1990) propuseram que EPEC exerceria sua atividade patogênica alterando, de alguma maneira, a quantidade de cálcio intracelular, ativando PKC e proteínas relacionadas.

Característica marcante das linhagens de EPEC é a capacidade de adesão em células "Hep 2", uma característica não exibida por ETEC, EHEC, EIEC ou linhagens da flora normal (Cravioto et alii, 1979). Entre as linhagens de EPEC os sorogrupos 055, 086, 0111ab, 0119, 0125, 0128ab e 0142 possuem adesão localizada, e, os sorogrupos 055, 0111 e 0119 possuem aderência localizada e difusa na mesma preparação (Scaletsky et alii, 1984). Esta propriedade de adesão em células "Hep 2" foi mais tarde ligada à presença de um plasmídio de 60MDa (Baldini et alii, 1983) e a esse plasmídio foi atribuído o nome de EAF (EPEC adherence factor).

Levine et alii (1985) correlacionaram a presença deste plasmídio com a codificação de uma proteína de 94Kda que estaria associada à patogenicidade de EPEC e consequentemente com a adesão em células "Hep 2". Anticorpos dirigidos contra esta proteína não impediram a adesão de linhagens de EPEC em células

"Hep 2" (Chart et alii, 1988), o que levou a pesquisa de outros componentes da superfície bacteriana, que poderiam também estar associados com a adesão a células "Hep 2" e à patogenicidade.

Um fragmento correspondente a 1Kb do plasmídio EAF foi clonado para ser usado como sonda para identificar EPEC (Nataro et alii, 1985), e quando utilizado como sonda, este fragmento hibridizou com 75% das amostras suspeitas de serem EPEC (Levine, 1987).

Estudos conduzidos no Chile demonstraram que o sorotipo da bactéria era muito importante na determinação de patogenicidade de EPEC (Levine, 1987). Assim, na grande maioria, E. coli EAF⁺ não pertencentes a sorotipo de EPEC, não eram patogênicas, o que demonstra a existência de outros fatores de virulência, possivelmente ligados ao sorotipo.

Através de mutagênese com o transposon TnphoA identificou-se um gene cromossômico (*eae*) que é necessário para a adesão de EPEC ao intestino. A sonda derivada desse gene hibridizou com 100% de amostras de EPEC (Jerse et alii, 1990).

Os mecanismos moleculares através dos quais EPEC causa diarreia ainda não se encontram claramente elucidados. Algumas amostras de EPEC apresentam produção de uma toxina semelhante à toxina de Shigella dysenteriae tipo I (SLT-1), a qual é altamente potente contra células Vero e HeLa em cultura (revisão em O'Brien & Holmes, 1987). A produção de outra classe de citotoxinas, SLT-2, também foi relatada em amostras de EPEC humanas e isoladas de suínos (O'Brien & Holmes, 1987).

O grupo das EPEC é subdividido em duas classes: EPEC que possuem o plasmídio EAF e apresentam aderência localizada em células "Hep 2" pertencem à classe I e, os sorotipos de EPEC que não apresentam o plasmídio EAF, não apresentam aderência localizada em células "Hep 2" mas são causadoras de diarreia pertencem à classe II (Nataro et alii, 1985).

2.2.2-Escherichia coli enterohemorrágicas (EHEC).

As amostras de E. coli enterohemorrágicas causam um quadro de colite hemorrágica severo (Riley et alii, 1982), caracterizado pela ocorrência de diarreia afebril intensa, sanguinolenta, mas sem leucócitos (Levine, 1987). Outra entidade clínica ocasionada por EHEC é a síndrome urêmica hemolítica (HUS) (Karmali et alii, 1983; Gransden et alii, 1986 & Remis et alii, 1984). Os estudos iniciais identificaram o sorotipo 0157:H7 como o agente causador. Hoje são conhecidos outros sorotipos patogênicos: 0157:NM, 0111:H8, 0111:NM, 04:NM, 05:NM, 045:H2, 091:H21, 091:NM, 0103:H2, 0113:H2, 0121:H19, 0125:NM, 0145:NM, 0C):H8 e 0C):NM (Levine et alii, 1987; Bopp et alii, 1987; Karmali et alii, 1985; Smith et alii, 1987).

As linhagens de EHEC possuem um plasmídio de 60MDa e produzem altos níveis de citotoxinas para células HeLa e Vero (O'Brien et alii, 1983; Johnson et alii, 1983).

Tzipori et alii (1986) demonstraram que amostras do tipo EHEC ligam-se a enterócitos e destroem as microvilosidades em porcos gnobióticos, uma lesão semelhante à causada por EPEC, mas diversa desta por proliferarem na lâmina própria e nas criptas glandulares.

O plasmídio de 60MDa parece estar associado à produção de uma fímbria não hemaglutinante que permite a adesão da bactéria a células intestinais Henle 407 e que parece estar associada à patogenicidade (Karch et alii, 1987). A partir deste plasmídio construiu-se uma sonda molecular que demonstrou ser altamente específica para EHEC (Levine, 1987).

O'Brien et alii (1983) mostraram que o soro antitoxina produzida por Shigella dysenteriae I neutralizava a atividade citotóxica de EHEC, sendo proposta por estes autores a designação "Shiga-like toxin" para tal toxina, embora muitos prefiram chamá-la de verotoxina. "Shiga-toxin" e "Shiga-like toxin" agem igualmente inativando a subunidade ribossomal 60S (O'Brien & Holmes, 1987). A toxina é composta por 5 subunidades B ligadas a uma subunidade A (O'Brien & Holmes, 1987).

Em amostras de E. coli do tipo EHEC os genes que

codificam a toxina estão localizados em um bacteriófago no cromossomo desta (Scotland et alii, 1983; Smith et alii, 1983; O'Brien et alii, 1984) e em Shigella dysenteriae estão no cromossomo. Os genes para as subunidades A e B estão em uma unidade transcricional simples (O'Brien & Holmes, 1987). O sequenciamento e a posterior comparação dos genes codificadores de "Shiga-toxin" e "Shiga-like toxin" demonstrou que ambos diferem em poucos nucleotídeos. As subunidades B maduras de ambas as toxinas não diferem em sequência de aminoácidos, enquanto que as subunidades A diferem em apenas 1 dos 293 resíduos. (Jackson et alii, 1987).

Algumas linhagens de EHEC produzem uma toxina que não é reconhecida pelo soro anti-"Shiga-toxin", mas é tóxica para células Vero e HeLa, designada SLT-II (Strockbine et alii, 1986) ou verotoxina II (Scotland et alii, 1985) embora as subunidades dessas toxinas sejam idênticas em tamanho e apresentem estruturas secundárias similares. Outra variante desta toxina foi observada em linhagens de Escherichia coli isoladas de porcos com doença do edema (Marques et alii, 1987; Gannon & Gyles, 1987), esta toxina é reconhecida pelo antissoro contra SLT-II mas, esta não é tóxica contra células HeLa, sendo tóxica somente contra células Vero (O'Brien & Holmes, 1987).

2.2.3-Escherichia coli enteroinvasivas (EIEC).

E. coli enteroinvasivas (EIEC) apresentam capacidade de invasão das células do cólon e de causar diarreia e disenteria, semelhante à promovida por Shigella (Du Pont et alii, 1971; Formal & Hernick, 1978 & Wanger et alii, 1988). A capacidade de EIEC foi associada à presença de um plasmídio de alto peso molecular (aproximadamente 140Mda), que codifica várias proteínas de membrana externa relacionadas a este processo (Hale et alii, 1983), embora outros fatores de virulência sejam codificados no DNA cromossômico (Maurelli & Sansonetti, 1988).

A identificação de EIEC pode ser feita através da sorotipagem das amostras de E. coli envolvidas em diarreia

(Toledi & Trabulsi, 1983), através do teste de invasibilidade em olho de cobaia, conhecido como teste de Serény (Serény, 1955; Toledo & Trabulsi, 1983), ou através da utilização de sondas moleculares construídas a partir do plasmídeo de virulência de Shigella flexneri (Wanger et alii, 1988).

2.2.4-Escherichia coli enteroaderentes (EAEC).

E. coli enteroaderentes (EAEC) compreendem amostras de origem humana, EAF negativas, de sorogrupos não clássicos, identificadas apenas pela adesão característica a células Hep-2, conforme descrito por Mathewson et alii (1985) e Mathewson et alii (1986). Estas amostras estão associadas com diarreia não hemorrágica e sem leucócitos fecais. EAEC apresenta um padrão de adesão a células Hep-2 do tipo agregativo, distinto das adesões localizadas e difusas descritas para EPEC. Não produzem toxinas dos tipos ST, LT ou SLT, e não invadem células epiteliais intestinais (Levine, 1987).

2.2.5-Escherichia coli enterotoxigênicas (ETEC).

Entre a espécie E. coli, as do tipo enterotoxigênicas (ETEC) são as maiores causadoras de diarreia em crianças, com até cinco anos de idade principalmente em países subdesenvolvidos, em pessoas de países desenvolvidos que viajam para áreas subdesenvolvidas ("travelers diarrhea"), e em animais recém-nascidos incluindo suínos, ovinos e bovinos. A principal característica da infecção por ETEC é a diarreia aquosa, que é comumente acompanhada de febre, cólicas abdominais, moleza e vômitos. E. coli enterotoxigênicas produzem enterotoxinas características e possuem fatores de colonização específicos (Orskov & Orskov, 1977; Orskov et alii, 1976 & Merson et alii, 1979) as quais permitem que as mesmas colonizem o trato intestinal e, evitem, também desta maneira, a ação de limpeza do

movimento peristáltico intestinal (Christensen et alii, 1985).

2.2.5.1-Enterotoxinas produzidas por ETEC.

E. coli enterotoxigênicas são caracterizadas pela capacidade de sintetizar toxinas termolábeis (LT) e\ou toxinas termoestáveis (ST) (Black et alii, 1982).

As toxinas termoestáveis (ST) de E. coli são heterogêneas, apresentando-se em duas classes: ST-I (ou STa) e ST-II (ou STb). A toxina ST-I é um pequeno polipeptídeo não imunogênico a não ser que esteja acoplado a uma proteína carreadora (Klepstein et alii, 1982), é solúvel em metanol e detectável através do teste com camundongos recém-nascidos (Dean et alii, 1973). Sua ação baseia-se na estimulação da atividade da enzima guanilato ciclase presente nas células com consequente elevação nos níveis de GMPc no jejuno e íleo (Greenberg & Guerrant, 1980; Hughes et alii, 1978), resultando na secreção de líquido para a luz intestinal, o que, em última análise, caracteriza a diarreia. A toxina ST-II é insolúvel em metanol e detectável através do teste de alças intestinais ligadas de leitão de 6 a 8 semanas (Gyles, 1979), mas não no teste do camundongo recém-nascido (Dean et alii, 1973). ST-II parece não estar relacionada com a patogenicidade das amostras de ETEC em humano (Echeverria et alii, 1984). A toxina ST-II estimula a secreção intestinal por mecanismos ainda desconhecidos, que não envolvem nucleotídeos cíclicos (Kennedy et alii, 1984; Wikel et alii, 1986). Com relação à sequência de nucleotídeos e aminoácidos, ST-I e ST-II não exibem homologia (Lee et alii, 1983).

A enterotoxina ST-I apresenta, ainda, variantes encontradas em amostras bacterianas isoladas de porcos (STp ou ST-Ia), de humanos (STh ou ST-Ib) (Gyles, 1979), um terceiro tipo foi descrito e designado ST-Ic (Maas et alii, 1985).

Após o sequenciamento e a comparação das sequências dos genes codificadores das toxinas STh (*esth*) e STp (*estp*) detectou-se divergência a nível de aminoácidos de 31% (Moseley et

alii, 1983; So & McCarthy, 1980). Ambos os genes codificam polipeptídeos constituídos por 72 resíduos de aminoácidos que apresentam sequências sinais hidrofóbicas. Uma vez no espaço periplasmático estes polipeptídeos sofrem processamento e atingem a forma ativa da toxina. ST-I é uma proteína extracelular, mas seu mecanismo de secreção através da membrana externa é desconhecido (Betley et alii, 1986).

As toxinas STp e STh são constituídas por 18 e 19 resíduos de aminoácidos, respectivamente (Field et alii, 1978; Frantz et alii, 1984; Gariepy & Schoolnik, 1986). Esses polipeptídeos exibem grande homologia entre si e as sequências de aminoácidos de ambos podem ser sobrepostas a partir da região carboxi-terminal, o que revela, além da presença de um resíduo de aminoácido a mais em STh, diferença em quatro outros resíduos. Essas diferenças concentram-se na região amino-terminal (três resíduos) contra apenas uma na região carboxi-terminal.

A porção carboxi-terminal além de ser mais conservada está também implicada com a atividade biológica dessas toxinas. A enterotoxigenicidade e a capacidade de ligação a receptores foi mapeada nos últimos 13 aminoácidos dessa região (Gariepy et alii, 1986; Shimonishi et alii, 1987; Thompson & Gianella, 1985).

Uma característica marcante de ST-I é a presença de seis resíduos de cisteína que formam três pontes dissulfeto intracadeia, as quais são importantes na formação da estrutura secundária da toxina ativa (Gariepy et alii, 1987). Estas três pontes são importantes para a atividade total da toxina.

A enterotoxina ST é codificada geralmente por genes localizados em plasmídios conjugativos. Plasmídios que codificam ambas as toxinas são relacionados entre si e com os plasmídios F, enquanto plasmídios que codificam apenas ST são heterogêneos (Betley et alii, 1986).

As toxinas termolábeis (LT) de E. coli também apresentam heterogeneidade, sendo possível determinar duas classes: LT-I e LT-II. A classe LT-I engloba as toxinas semelhantes à toxina colérica (CT), apresentando identidade sorológica e neutralização pelo anti-soro anti-CT. Nesta classe encontram-se as toxinas LTh (ou LT humana) e LTp (ou LT porcina), que diferem em apenas um resíduo de aminoácido (Dykes et alii,

1985 & Yamamoto et alii, 1987). O modo de ação de LT-I e LT-II é semelhante e se dá através da ativação da enzima adenilato ciclase e do aumento do nível de AMPc, o qual resulta na secreção de líquido para a luz intestinal, promovendo, assim, diarreia (Chang et alii, 1987). LT-II é sorologicamente distinta de LT-I, não sendo neutralizada pelo anti-soro anti-LT-I ou anti-CT (Green et alii, 1983).

A enterotoxina LT-I é uma proteína de alto peso molecular (75 a 90 Kda) composta por dois tipos de subunidades. Uma subunidade A (LT_A) que está ligada a cinco subunidades B (LT_B) (Levine, 1984).

A subunidade A é responsável pelo estímulo da adenil ciclase através de sua atividade enzimática ADP-ribosilante (Gill & Richardson, 1980). A subunidade B é responsável pela ligação da holoenzima à membrana dos enterócitos intestinais, através da interação com gangliosídeo GM1 de superfície celular e glicoproteínas (Holmgren, 1973; Holmgren et alii, 1982). Uma vez ligada à holoenzima, a subunidade A é interiorizada, sofre quebra enzimática em dois peptídeos, A1 e A2, sendo que a atividade enzimática é conferida pelo peptídeo A1 (Spicer & Noble, 1982).

A enterotoxina LT-I é muito similar à toxina colérica (CT) em estrutura, atividade e determinantes antigênicos e os genes codificantes das duas toxinas mostram grande homologia (Dallas & Falkow, 1980; Clements et alii, 1980; Smith & Sach, 1973; Betley et alii, 1986; Yamamoto et alii, 1987). Comparando-se as sequências dos genes que codificam a toxina colérica (*ctxAB*) e a toxina LT (*eltAB*) observa-se que os cistrons A e B são 75% e 77% homólogos, respectivamente (Betley et alii, 1986). Os genes *eltA* (LT_A) e *eltB* (LT_B) formam uma unidade transcricional, estando o promotor próximo ("upstream") ao gene *eltA*. Os códons finais do gene *eltA* estão sobrepostos aos iniciais do gene *eltB* em quatro pares de base (Yamamoto et alii, 1987). A subunidade B é produzida a uma taxa molar cinco vezes maior do que a subunidade A (Dallas et alii, 1986). Como tais genes estão sobre o controle de um único promotor, a diferença observada na expressão dessas duas proteínas parece estar ligada a uma regulação traducional (Spicer & Noble, 1982; Dallas et alii, 1979).

Os primeiros 21 resíduos de aminoácidos da porção aminoterminal da proteína correspondente à subunidade A e os primeiros 18 da proteína correspondente à subunidade B são peptídios sinais, importantes para a localização desses polipeptídios no espaço periplasmático (Dallas & Falkow, 1979; Dallas & Falkow, 1980; Spicer & Noble, 1982; Yamamoto et alii, 1987). Após seu transporte até o espaço periplasmático, as subunidades A e B são processadas e se ligam para formar a holotoxina (Hirst et alii, 1984).

As subunidades B das toxinas LTh e LTp diferem em apenas quatro dos 103 resíduos de aminoácidos enquanto que as subunidades A1 diferem em apenas um dos 194 resíduos (Dykes et alii, 1985; Yamamoto et alii, 1987). Estas observações explicam as reações cruzadas de anticorpos entre as toxinas LTh e LTp.

A variante LT-II foi isolada de fezes diarreicas de búfalos na Tailândia (Green et alii, 1983) e é composta por dois tipos de polipeptídios A e B com pesos moleculares próximos às subunidades de LT-I (Holmes et alii, 1986). A subunidade A desta toxina tem a propriedade de ativar a adenil ciclase (Chang et alii, 1987) mas a subunidade B não tem a capacidade de ligar-se ao gangliosídeo GM1 (Holmes et alii, 1986). Em LT-II os genes A e B estão sobrepostos em 11 pares de bases. Análises de sequências de nucleotídios revelou homologia entre as subunidades A de LT-II, LT-I e CT (Pickett et alii, 1986, 1987) enquanto nenhuma ou pouca homologia foi encontrada com relação às subunidades B. Diferente dos genes codificadores para LT-I que estão localizados em plasmídios, os genes para LT-II estão localizados no cromossomo de E. coli (Green et alii, 1983).

Recentemente, uma toxina termolábil (LT) denominada LTc de amostras de E. coli enterotoxigênicas de aves, foi descrita e comparada com a LTp e a LTh. A subunidade "A" da LTc é idêntica à subunidade "A" da LTp e a subunidade "B" da LTc é idêntica à subunidade "B" da LTh, mas não é idêntica à subunidade "B" da LTp. Isto foi observado por diferenças de migração em eletroforeses em géis de SDS-poliacrilamida e reação com antissoros específicos. Outros testes demonstraram que LTc é antigenicamente idêntica à LTh, mas não à LTp. O ponto pI (ponto isoelétrico) e a composição de aminoácidos da LTc foram também

estudados e os resultados sugerem que estas amostras de ETEC de aves produzem uma LT semelhante à LTh (Tsuji et alii, 1988).

2.2.5.2-Adesinas ou fatores de colonização em ETEC.

A produção de enterotoxinas per se não é suficiente para a enteropatogenicidade das amostras de ETEC de E. coli, sendo necessária a adesão à mucosa do intestino delgado e a posterior colonização. Fímbrias e adesinas não fimbriais têm sido associadas à diferentes sorotipos de ETEC patogênicas, sendo este grande número de variantes e tipos geralmente associados a um hospedeiro específico ou a um grupo restrito de hospedeiros (Castro et alii, 1984).

As fímbrias comumente associadas à ETEC de origem humana são CFA\I e CFA\III que são antígenos fimbriais únicos (com 6 a 7 nm de diâmetro), enquanto CFA\II e CFA\IV (também designada PCF8775) são complexos antigênicos. CFA\II possui três fímbrias antigênicas diferentes (CS), dos quais CS1 e CS2 são estruturas fimbriais rígidas como CFA\I enquanto CS3 é uma fímbria fina e flexível. Todas as E. coli CFA\II produzem CS3, entretanto a expressão de CS1 ou CS2 depende do biotipo da amostra. CFA\IV caracteriza-se pela presença do antígeno CS6 que pode ser produzido sozinho ou em conjunção com CS4 ou CS5 (Willshaw et alii, 1988), CS4 e CS5 são estruturas fimbriais rígidas com 6 a 7 nm de diâmetro e CS6 é não fimbrial, porém fibrilar como CS3 (Thomas et alii, 1985; McConnell et alii, 1986). Recentemente, um novo fator de colonização em amostras de ETEC de origem humana, PCF0159, o qual não apresenta capacidade hemaglutinante foi descrito por Tacket et alii (1987, apud Levine, 1987). O antígeno CFA/I apresenta hemaglutinação manose-resistente (MHMR) com eritrócitos humano, bovino e de galinha; CFA/II com eritrócitos bovino e de galinha (Gaastra & de Graaf, 1982) e CFA/IV com eritrócitos bovino (Thomas et alii, 1981; McConnell et alii, 1986).

Os antígenos de origem animal associados à ETEC compreendem várias fímbrias com diferentes características

hemaglutinantes: K88, K99, F41, tipo I (Gaastra & de Graaf, 1982), F42 (Yano et alii, 1986) e uma fimbria não hemaglutinante: 987P (Gaastra & de Graaf, 1982).

O antígeno K88 foi, em 1961, a primeira fimbria a ser descrita como um fator de virulência por Orskov et alii. Ocorre em amostras de origem suína e caracteriza-se por filamentos com 2.1nm de diâmetro, subunidades proteicas com 27,54Kda e apresenta hemaglutinação manose-resistente com eritrócitos de cobaia e de galinha (Gaastra & De Graaf, 1982). A codificação é plasmidial (Strim et alii, 1966) e a fimbria pode apresentar variantes antigênicas denominadas K88ab, K88ac e K88ad, com o antígeno comum K88a (Hinson & Williams, 1989). Em amostras de origem suína, a ocorrência de K88⁺ pode estar associada com maior frequência à produção de LT que à produção de LT⁺ST⁺ ou de STa e STb isoladamente (Castro et alii, 1984; Guineé & Jansen, 1979).

O antígeno K99 foi primeiramente descrito em 1972 por Smith & Linggood como um antígeno K comum, codificado por genes plasmidiais e encontrado em várias amostras de ETEC de bovinos, suínos e ovinos (Orskov et alii, 1975). A estrutura da fimbria é um filamento helicoidal com 4.8nm de diâmetro, composta por subunidades proteicas de 18,5Kda apresentando hemaglutinação manose-resistente com eritrócitos de cavalo e de carneiro (Gaastra & De Graaf, 1982). Em amostras de origem bovina e suína, a ocorrência de STa está sempre relacionada à presença de K99 (Guineé & Jansen, 1979).

O antígeno fimbrial F41 é encontrado em amostras de Escherichia coli de origem bovina e suína, de estrutura filamentar com o diâmetro de 3.2nm, composta por subunidades proteicas de 29500Da e que apresenta hemaglutinação manose-resistente com eritrócitos humano, de cobaia, de cavalo e de carneiro (De Graaf & Roorda, 1982). A fimbria F41 encontra-se associada frequentemente à produção de K99. A codificação genética para a produção da fimbria é cromossômica e apresenta regulação temperatura-dependente (Anderson & Mosely, 1988; Christensen et alii, 1985; Gaastra & De Graaf, 1982). Está relacionado com a produção de STa (Gaastra & de Graaf, 1982).

A fimbria tipo 1 apresenta diâmetro de 7nm (Klemm et alii, 1982; Eshdat et alii, 1981 & Salit et alii, 1983) e

apresenta hemaglutinação manose-sensível (Duguid et alii, 1979; Ofek & Beachey, 1980; Salit & Gotschlich, 1977). O envolvimento de fímbrias tipo 1 como fator de patogenicidade em amostras de ETEC é controverso, sendo descrito por Jayappa et alii (1985) em suínos, porém não confirmado em trabalhos posteriores (A. F. Pestana de Castro, comunicação Pessoal, 1990), (Ferreira, 1992).

O antígeno fimbrial F42 descrito por Yano et alii em 1986, e que parece ser importante na etiologia de colibacilose suína no Brasil, apresentando frequência de ocorrência de 9.6% em amostras de ETEC (STa) de origem suína. Apresenta hemaglutinação manose-resistente com eritrócitos de carneiro, de cobaia, de galinha, de cavalo e humanos, é temperatura sensível, expressa-se em meio CFA e em meio mínimo e é composta de subunidades proteicas de 31000Da (Leite, 1986).

O antígeno 987P apresenta-se como uma fímbria rígida com diâmetro de 7nm, não apresenta hemaglutinação manose-resistente e é constituído por subunidades de 20Kda (Gaastra & De Graaf, 1982). Sua codificação é cromossômica e apresenta variação de fase, semelhante à regulação das fímbrias tipo 1 (De Graaf & Klaassen, 1986). Sua ocorrência está relacionada com amostras de E. coli de origem suína, encontrando-a sempre associada à produção de ST (Guineé & Jansen, 1979; Moon et alii, 1980).

O antígeno CS31a foi isolado de bovinos, apresenta expressão temperatura-dependente, apresenta-se como um filamento de 6 a 7 nm e possui subunidades proteicas de 29Kda, não se sabe se sua codificação é cromossômica ou plasmidial (de Graaf, 1990).

As fímbrias são compostas por várias subunidades proteicas que, uma vez sintetizadas, são transportadas através da membrana interna e da membrana externa de bactérias gram-negativas e são montadas em estruturas filamentosas na superfície celular. Geralmente cinco a oito polipeptídios estão envolvidos na expressão fenotípica das fímbrias de E. coli (Mooi et alii, 1982; Norgren et alii, 1984; Van Die et alii, 1984; de Graaf et alii, 1984; Mooi & de Graaf, 1985). Além das subunidades polipeptídicas estruturais das fímbrias, esses operons codificam polipeptídios localizados no espaço periplasmático que se

associam às subunidades estruturais, participando do processamento e transporte dessas subunidades a sítios da membrana externa, onde são exportadas. Outros genes codificam proteínas ligadas à ancoragem da estrutura da fímbria na superfície bacteriana.

Algumas evidências sugerem que as subunidades estruturais das fímbrias, uma vez associadas à proteínas específicas presentes no espaço periplasmático, adquirem uma conformação estrutural apropriada para o transporte através da membrana externa. Essas alterações também parecem associadas com a resistência à digestão proteolítica apresentada por essas subunidades (Mooi & de Graaf, 1985). A maioria desses estudos foram realizados com fímbrias K88 e tipo 1.

Fímbrias rígidas e fibrilares podem ocorrer dentro de uma mesma linhagem bacteriana e estarem presentes simultaneamente em uma mesma célula bacteriana (Levine, 1984).

A estrutura primária das subunidades estruturais de algumas fímbrias foram parcialmente ou completamente resolvidas. Muitas delas apresentam grande conservação na sequência de aminoácidos da região carboxi-terminal e, em menor extensão, na região aminoterminal. Estas regiões estão provavelmente envolvidas com funções comuns a este grupo de proteínas tais como: transporte através da membrana externa, ancoragem, ligação entre as subunidades e manutenção da estrutura. As porções centrais são mais variáveis e provavelmente estão associadas ao reconhecimento de diferentes receptores ou podem ter, simplesmente, divergido em resposta à pressões imunológicas, por causa da menor importância funcional e estrutural atribuída a estas regiões. A presença de porções hidrofóbicas nas regiões C-terminais, constitui um forte indício da participação destas regiões nas ligações entre as subunidades estruturais (Mooi & de Graaf, 1985).

Os genes codificadores da fímbria K99 estão localizados em plasmídios conjugativos de aproximadamente 75Kb (Orskov et alii, 1975). Esses genes foram clonados verificando-se que o operon continha 8 genes estruturais, 7 dos quais pareciam envolvidos na biossíntese da fímbria. Todos esses genes apresentam peptídio sinal na extremidade N-terminal (Van Embden

et alii, 1980). de Graaf et alii (1984) clonaram o operon da fímbria k99 no vetor pBR322 originando o plasmídeo pFK99, o qual após ser digerido com as endonucleases de restrição XbaI e PvuII, apresentou um fragmento menor o qual foi usado como sonda molecular específica para K99.

O operon K99 contém uma pequena região intracistrônica, que apresenta díade de simetria entre o gene estrutural da subunidade da fímbria e o gene codificador da proteína de 76KDa (p76). A qual provavelmente está ligada ao transporte da subunidade para o meio externo (Roosendaal et alii, 1984). Uma estrutura em grampo pode ser formada nesta região do mRNA, o que poderia desempenhar função de terminador rho dependente, introduzindo polaridade no operon K99. Esta região também parece estar envolvida na regulação temperatura-dependente de crescimento, já que o códon de iniciação do gene para p76 está localizado dentro do grampo. A explicação para o efeito é que a baixas temperaturas o grampo estaria estabilizado e desta forma inibiria o início da tradução do mRNA para p76. O contrário é observado a temperaturas próximas a 37°C.

Os genes codificadores da fímbria K88 residem em plasmídios que frequentemente também codificam para a utilização de rafinose (Mooi et alii, 1979). Os determinantes genéticos de K88ab e k88ac foram clonados e a diferença maior entre esses dois determinantes está no gene codificador da subunidade polipeptídica estrutural da fímbria (Mooi et alii, 1979; Shipley et alii, 1981). Seis genes estruturais foram localizados na sequência de DNA K88ab clonada no plasmídeo pFM205, cinco das quais estão localizadas dentro de uma simples unidade transcricional (Mooi et alii, 1981). Dois genes diferentes estruturais para subunidades da fímbria foram encontrados no operon de K88ab (Mooi et alii, 1982; Mooi et alii, 1984). A subunidade maior com 26KDa constitui o componente principal, enquanto que a subunidade da fímbria com peso molecular de 17,6KDa representa o componente menor da subunidade que é produzido em pequena quantidade.

Técnicas de ácido nucleico recombinante foram utilizadas para inserir um fragmento HindIII de 8,2 megadaltons, o qual continha os genes K88ac provenientes do plasmídeo

pPS100(K88/Raf), no vetor pBR322. Pelo menos 6 polipeptídios codificados por este fragmento foram expressos em minicélulas. Esses polipeptídios variavam de tamanho entre 18Kda a 70Kda. A subunidade antigênica de K88ac, a qual tem um peso molecular de aproximadamente 23,5Kda, foi identificada por imunoprecipitação com proteína A de staphilococos como coprecipitante (Shipley et alii, 1981).

O operon da fímbria F41 foi clonado no plasmídio recombinante pSLM204 (Moseley et alii, 1986). A análise em maxicélulas demonstrou que o plasmídio recombinante produz quatro polipeptídios de 29, 30, 32 e 86KDa, sendo o de 29KDa identificado como o antígeno F41, e a sequência nucleotídica do gene foi determinada. Observou-se extensa homologia entre a região codificadora de sequências sinais dos antígenos F41 e K88 e na região imediatamente superior aos genes dos antígenos. A sonda molecular do antígeno K88 hibridizou em condições de alta estringência com fragmentos essenciais para a produção de F41. Exceto com fragmentos internos ao gene codificador do antígeno F41. Utilizando-se um fragmento HincII-PstI de 617bp construiu-se uma sonda interna à subunidade de F41 que não hibridiza com o determinante K88 e é específica para F41 (Anderson & Moseley, 1988).

A primeira fímbria de amostras humanas de ETEC a ser clonada foi CFA/I. Os genes codificadores de CFA/I estão localizados em dois segmentos de DNA de 8Kb e 2Kb separados por uma sequência de 40Kb (Wilshaw et alii, 1983). Os genes estruturais estão localizados na sequência de 8Kb que codifica outros 5 polipeptídios (Wilshaw et alii, 1985a). A região de 2Kb codifica outros três polipeptídios essenciais para a maturação da fímbria. Nenhuma função específica foi, entretanto, atribuída a esses polipeptídios.

Smith et alii (1983) demonstraram que os três antígenos (CS1, CS2 e CS3) do fator de colonização CFA/II são codificados pelo mesmo plasmídio. Os antígenos fimbriais CS1 e CS2 foram clonados no vetor plasmidial pBR322, obtendo-se um plasmídio quimérico pCS200 que expressou os antígenos CS1 e CS2, causando hemaglutinação manose-resistente em hemácias de bovinos (Bovian, 1988). Os genes codificadores de CS3 foram clonados e ligados a

uma região de 4Kb (Maning et alii, 1985; Boylan et alii, 1987; Wilshaw et alii, 1987) e a esse pequeno fragmento foi atribuída a síntese de 4 polipeptídios de 94, 26, 24 e 15 Kb (Boylan et alii, 1987). O peptídeo de 15Kb parece ser a subunidade estrutural de CS3 enquanto que o de 94Kb pareça ter função de plataforma de montagem e transporte.

Sequências codificadoras do antígeno CS6 do fator de colonização CFA/VI foram clonados em um fragmento ClaI de 3Kb. O plasmídeo recombinante pDEP5 codificou a expressão de CS6, que foi ensaiada pelo teste ELISA e a produção de polipeptídeos do CS6 foi detectada em minicélulas de E. coli. Os genes responsáveis pela produção dos antígenos CS1, CS2 e CS3, componentes do fator de colonização CFA/III, foram clonados juntos num segmento de DNA de cerca de 17Kb. CS3 foi sempre expresso, porém a expressão de CS1 ou CS2 dependeu do sorotipo e do biotipo da amostra hospedeira (Willshaw et alii, 1988).

Os genes responsáveis pela expressão de fímbria tipo 1, produzida pela maioria das amostras de E. coli, foram clonados a partir de uma amostra K12 de E. coli. O DNA responsável pela produção da fímbria foi clonado inicialmente em um cosmídeo, que teve seu tamanho reduzido e foi subclonado nos vetores pACYC184 e pBR322. Um fragmento de DNA de cerca de 8Kb foi necessário para a biossíntese da fímbria tipo I (Klemm et alii, 1985).

Fímbrias são bons agentes imunogênicos e não exibem toxicidade. Está bem demonstrada a capacidade de fímbrias purificadas de várias amostras de E. coli de induzir proteção imune contra diarreia em animais domésticos. O uso de fímbrias como constituintes de uma vacina contra infecções no trato urinário humano têm sido documentado (Roberts et alii, 1982).

A primeira fímbria usada com propósitos de vacinação foi a K88 (Rutter & Jones, 1973). Proteção passiva em animais recém-nascidos por anticorpos contra fímbrias K99 foi obtida em bovinos, ovinos e suínos (Acres et alii, 1979; Morgan et alii, 1978 & Sojka et alii, 1978) e com o antígeno 987P em suínos (Morgan et alii, 1978). Vacinas baseadas nas adesinas K88, 987P e K99 têm sido produzidas comercialmente mostrando-se eficientes para a proteção de animais domésticos "jovens" contra diarreia causada por E. coli. Tais vacinas mostraram-se eficientes,

diminuindo drasticamente os níveis de mortalidade de animais recém nascidos (Schuuring, 1982).

Atualmente, vacinas contendo fímbrias K88 e K99, produzidas através de técnicas de biologia molecular, são produzidas comercialmente, demonstrando que: (1) a tecnologia usada é de fácil acesso, (2) ocorre uma maior produção de fímbrias por peso seco da bactéria que a expressa, (3) o aumento na capacidade de expressão leve a um aumento na capacidade de purificação e produção, e (4) ocorre diminuição nos custos por unidade produzida (Schuuring, 1982).

3. MATERIAL E MÉTODOS:

3.1. MATERIAL:

As amostras de E. coli enterotoxigênicas 567/7 e 103 (STa) são provenientes de fezes diarreicas de leitões e foram descritas como sendo produtoras de um novo fator de colonização denominado "F42". Estas amostras foram isoladas por Yano et. al (1986) e pertencem à coleção de culturas do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP.

TABELA 1-Amostras utilizadas no presente trabalho:

Linhagens PM(Md)		Fenótipo	GI	Origem
567/7		"F42 ⁺ ",STa ⁺ ,Lac ⁺		DMI
108		"F42 ⁺ ",STa ⁺ ,Lac ⁺		DMI
ORN115		fímbria tipo 1		(Ondorff, 1985)
B41		F41 ⁺ ,K99 ⁺		(Morris et alii, 1980)
B41M		F41 ⁺		(Morris et alii, 1982)
31A		CS31a ⁺		(Girardeau et alii,1988)
C600		An ^r ,lacY1,tonA21,thr thi1,sup,E44,Leu-G		CVD
C600(pFK99)		K99 ⁺		(de Graaf et alii, 1984)
C600(pFM205)		K88ab ⁺		(Mool et alii, 1979)
HB101(pMR5)		Sm ^r ,Ap ^r ,Km ^r ,Tc ^r lac ⁺ ,Prot		CVD
SM10λpir(pRT733)		Ap ^r ,Km ^r ,thi,thr,leu lacY,supE,tonA recA::RP4-2-Tc::Mu::		CVD
J53(pR702)	46	Tc ^r ,Km ^r ,Sm ^r ,Su ^r ,Hg ^r lac ⁺ ,Pro,Met	P	CVD
J53-1(pN3)	33	Tc ^r ,Sm ^r ,Su ^r ,lac ⁺ ,Pro Met,F ⁻	N	CVD
J53(pRA1)	86	Tc ^r ,Lac ⁺ ,Pro,Met	A	CVD
J53-1(pR40a)	96	Km ^r ,Ap ^r ,Lac ⁺ ,Pro,Met	C	CVD
J53(pR1)	62	Km ^r ,Sm ^r ,Cm ^r ,Ap ^r ,Su ^r ,F ⁻ Pro,Met,Lac ⁺	FII	CVD
J53(pR478)	166	Tc ^r ,Km ^r ,Cm ^r ,lac ⁺ ,F ⁻ Pro,Met	S	CVD
J53-r1(pSa)	23	Tc ^r ,Km ^r ,Sm ^r ,Cm ^r ,lac ⁺ Pro,Met	W	CVD

DMI=Depto.de Microbiologia e Imunologia UNICAMP,GI=grupo incomp.
CVD=Center of vaccine development (Maryland) ,PM=peso molecular

3.1.1-MEIOS DE CULTURA:

Na formulação dos meios de cultura e soluções adicionais utilizadas para a manutenção, cultivo e ensaio das amostras bacterianas, foram empregados reagentes de grau P.A. e água destilada ou deionizada (Mili-Q), conforme a necessidade. Os meios de cultura foram sempre autoclavados, a menos que de outra maneira especificado.

3.1.1.1-Meio CAYE (Casaminoacids-Yeast Extract)(Evans et alii, 1973).

a)Meio de CAYE base:

Extrato de levedura	6,00 g
Casaminoácidos	20,00 g
NaCl	2,50 g
K_2HPO_4	8,75 g
H ₂ O destilada q.s.p.	100,00 ml
pH final 8,2	

Acrescenta-se a este meio base 1ml de sais de Evans por litro.

b)Sais de Evans:

Mg SO ₄	5,0 g
FeCL ₃	0,5 g
H ₂ SO ₄ 1mM q.s.p.	100,0 ml

3.1.1.2-Meio CFA (Colonization Factor Agar) (Evans et alii, 1980).

a)Meio CFA base:

Extrato de levedura	1,50 g
Casaminoácidos	10,00 g
ágar bacteriológico	20,00 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,00 ml
pH final 7,4	

Adiciona-se ao meio base, depois de autoclavado,

1ml das soluções A e B cada uma para 100ml de meio.

b) Solução A:

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p.	50,00 ml

c) Solução B:

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,39 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p.	50,00 ml

3.1.1.3-Meio LB (Luria-Bertani Medium) (Miller, 1972).

Triptona	10,00 g
Extrato de levedura	5,00 g
NaCl	10,00 g
H_2O destilada q.s.p.	1000,00 ml
pH final 7,2	

3.1.1.4-Meio LA (Luria-Bertani ágar) (Miller, 1972)

Ágar bacteriológico	15,0 g
Meio LB pH 7.2	1000,0 ml

3.1.1.5-Ágar MacConkey.

O meio ágar MacConkey (Difco Lab) é reconstituído dissolvendo-se 50g do preparado em 1000ml de água destilada sob agitação suave, com aquecimento até completa dissolução do ágar.

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

a) Solução Estoque M.M. 20X:

K_2HPO_4	140 g
KH_2PO_4	60 g
Citrato de sódio	10 g
$(NH_4)_2SO_4$	20 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2 g
água destilada q.s.p.	1000 ml

Adicionam-se 10ml dessa solução estoque M.M. 20X para 200ml de ágar 2% e acrescenta-se glicose para concentração final de 0.5%.

3.1.1.7-Meio BHI e BHI-ágar (Brain heart infusion)

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

3.1.1.8-Meio SOC.

Bacto-triptona	20,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
NaCl	0,5 g
KCl (250mM)	10,0 ml
H_2O destilada q.s.p.	1000,0ml
	pH 7,0

Após autoclavagem do meio, foram adicionados 20ml de uma solução de glicose 1M, esterilizada por filtração.

3.1.2-Soluções e Reagentes de uso geral:

3.1.2.1-Solução Alsever:

Glicose	20,50 g
Citrato de sódio	8,00 g
NaCl	4,20 g
H ₂ O destilada q.s.p	1000,00 ml

O pH da solução deve ser ajustado para 6,5 com ácido cítrico, e a solução deve ser esterilizada por filtração.

3.1.2.2-Tampão PBS 0,05M:

a) Tampão fosfato pH 7,4:

K ₂ HPO ₄ 1M	preparar 500ml
KH ₂ PO ₄ 1M	preparar 300ml

Ajusta-se o pH misturando-se as duas soluções.

b) NaCl 3M:

Para o preparo de 1000ml de tampão PBS, adicionaram-se 50ml da solução "a" a 50ml da solução "b" e completa-se o volume para 1000ml com água destilada.

3.1.2.3-Soluções para extração de DNA plasmidial:

3.1.2.3.1-Solução I (Tris-Cl 25mM pH 8.0; glicose 50mM; EDTA 10mM).

Tris	0,3028 g
Glicose anidra	0,9008 g
Solução estoque EDTA 0.5M	2,0000 ml
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	100,0000 ml

3.1.2.3.2-Solução II (NaOH 0.2N; SDS 1%)

Solução NaOH 10N	200,0 μ l
Solução SDS 10%	100,0 μ l
H ₂ O Mili-Q esteril.q.s.p.	9,7 ml

3.1.2.3.3-Solução Acetato de sódio 3M:

Acetato de sódio . 3H ₂ O	27,21 g
H ₂ O Mili-Q esteril.q.s.p.	200,00 ml

3.1.2.3.4-Solução III (Acetato de sódio)

Solução de Acetato de sódio 3M	60,0 ml
Ácido acético glacial	11,5 ml
H ₂ O Mili-Q esteril q.s.p.	28,5 ml
	pH 4,8

3.1.2.3.5-Solução IV:

Acetato de sódio	0,1M
Tris-HCl 0.005M	pH8,0

3.1.2.3.6-Solução azul de ressuspensão 6X
(Ficoll 400 15%; azul de bromofenol 0.25%; xileno cianol FF 0.25%; RNase A 0.1mg\ml).

Ficoll 400	7,500 g
Azul de bromofenol	0.125 g
Xileno cianol FF	0,125 g
Solução estoque RNase	500,000 μ l
H ₂ O Mili-Q esteril.q.s.p.	50,000 ml

3.1.2.4-Soluções para eletroforese de DNA em gel de agarose.

3.1.2.4.1-Tampão TEB 5X:

Tris	54,0 g
Ácido bórico	27,5 g
Solução de EDTA 0.5M	20,0 ml
H ₂ O Mili-Q esteril.q.s.p.	1000,0 ml

3.1.2.4.2-Tampão TEB 1X (Tris-borato 0.09M pH 8,0; EDTA 2mM).

Tampão TEB 5X	200 ml
H ₂ O destil. q.s.p.	1000 ml
	pH 8,0

3.1.2.5-Soluções para visualização de DNA em U.V.:

3.1.2.5.1-Solução Estoque de Brometo de Etídio 1%.

Brometo de etídio	1 g
H ₂ O Mili-Q esteril q.s.p.	100 ml

3.1.2.5.2-Solução Corante de Brometo de Etídio (0.5µg\ml).

Solução estoque de	
Brometo de etídio 1%	50 µl
H ₂ O dest q.s.p.	100 ml

3.1.2.6-Soluções para teste de toxina STa:

3.1.2.6.1-Solução Azul de Evans 2%:

Azul de Evans	2 g
Solução salina 0.85% esterilizada q.s.p.	100 ml

3.1.2.7-Soluções para visualização de fímbrias através de microscopia eletrônica:

3.1.2.7.1-Solução de parlódio 0.5%:

Parlódio	0,250 g
Acetato de Amila q.s.p.	50,000 ml

O parlódio (Sigma) foi dissolvido no acetato de amila em um frasco escuro e mantido a 4°C.

3.1.2.7.2-Solução de PTA 1%(Ácido fosfotúngstico):

Ácido fosfotúngstico	0,5 g
H ₂ O Mili Q esterilizada q.s.p.	50,0 ml

O ácido fosfotúngstico (Sigma) foi dissolvido em 40ml de H₂O Mili Q esterilizada e o pH da solução foi ajustado para pH7.2 com KOH 10N sendo, a seguir, o volume completado para 50ml. A solução foi filtrada em membrana Millipore 0.22µm (Swinex 13mm) diretamente em frascos esterilizados e armazenada a 4°C.

3.1.2.7.3-Tampão PBS pH7.2:

O Tampão PBS pH7.2 é o mesmo descrito no item 3.1.2.2.

3.1.2.8-Soluções para SDS-PAGE:

As soluções e tampões utilizados no preparo dos géis de poliacrilamida-SDS, seguiram as especificações do "Hoefer Electrophoresis Catalog and exercises (1990-1991)".

3.1.2.8.1-Marcadores de peso molecular:

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

Proteínas	PM(Kd)
Alfa-lactalbumina	14.4
Inibidor de tripsina	20.1
Anidrase carbônica	30.0
Ovalbumina	43.0
Albumina	67.0
Fosforilase b	94.0

O "pool" de proteínas foi dissolvido em 100 μ l de tampão de eletroforese, contendo 2.5% de SDS e 5% de beta-mercaptoetanol. A mistura foi fervida a 100°C em banho maria por 5 min.

A solução de proteínas foi armazenada a -20°C. Para a aplicação em géis e serem corados com prata, a solução foi diluída 20 vezes.

3.1.2.8.2-Soluções para coloração de prata:

3.1.2.8.2.1-Fixador (Etanol 50%; ácido acético 12%; 0.5ml/l de formaldeído 37%).

Etanol	500,0 ml
Acido acético glacial	120,0 ml
Formaldeído 37%	0,5 ml
H ₂ O Mili Q q.s.p.	380,0 ml

3.1.2.8.2.2-Solução de etanol 50%

Etanol	500 ml
H ₂ O destilada	500 ml

3.1.2.8.2.3-Solução de pré-tratamento (Tiossulfato de sódio 0.02%)

Na ₂ S ₂ O ₃	0,06 g
H ₂ O destilada q.s.p.	300,00 ml

3.1.2.8.2.4-Solução de impregnação (Nitrato de prata 0.2%; 0.75 ml/l de formaldeído 37%)

AgNO ₃	0,6 g
Formaldeído 37%	225,0 µl
H ₂ O destilada q.s.p.	300,0 ml

3.1.2.8.2.5-Solução reveladora (Carbonato de sódio 6%; tiosulfato de sódio 0.4 mg%; 0.5 ml/l de formaldeído 37%)

Na_2CO_3	18 g
Solução de pré-tratamento	8 ml
Formaldeído 37%	150 μl
H_2O destilada q.s.p.	300 ml

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

Metanol	500 ml
Ácido acético glacial	120 ml
H_2O destilada q.s.p.	380 ml

3.1.2.8.2.7-Solução de metanol 50%

Metanol	500 ml
H_2O destilada q.s.p.	500 ml

3.1.2.8.2.8-Solução de preservação I (Metanol 30%)

Metanol	300 ml
H_2O destilada q.s.p.	700 ml

3.1.2.8.2.9-Solução de preservação II (Glicerol 3%)

Glicerol	30 ml
H_2O destilada q.s.p.	1000 ml

3.1.2.9-Soluções para western-blotting:

3.1.2.9.2-Solução transferência:

Glicina	5,80 g
Tris	11,60 g
SDS	0,74 g
Metanol	400 ml
H ₂ O Mili Q ccompleta para 2l. pH8,3	

3.1.2.9.3-Solução bloqueio:

Leite desnatado	5 g
PBS q.s.p.	100 ml
Tween 20	50 µl

3.1.2.10-Soluções utilizadas na marcação da sonda molecular K99 e no teste de hibridização:

3.1.2.10.1-Tampão de "nick translation" (10X)

Trizma base	500 mM
MgCl ₂	50 mM
2-β-mercaptoetanol	100 mM
BSA	0,5mg/ml
pH 8,0	

3.1.2.10.2-Tampão de ressuspensão de nucleotídeos:

Trizma base	5 mM
Na ₂ EDTA	1 mM
2-β-mercaptoetanol	2 mM
Etanol p.a.	50%
pH 7,5	

3.1.2.10.3-Tampão para a diluição da DNA Polimerase I:

NaCl	100 mM
Tris HCl pH7.4	10 mM
MgCl ₂	7 mM
DTT	1 mM

3.1.2.10.4-Solução de desoxinucleotídeos trifosfatados 10mM:

Foram preparadas soluções de desoxiguanosina, desoxitimidina e desoxicitosina trifosfatadas (P-L-Biochemical) em tampão de ressuspensão de nucleotídeos (3.1.2.10.2). Estas soluções foram estocadas a -20°C e no momento do uso, diluídas em água Mili Q esterilizada (concentração final de 1mM para cada nucleotídeo).

3.1.2.10.5-Solução de desoxinucleotídeo radioativo:

A solução de (α -³²P) desoxiadenina trifosfatada ($[\alpha$ -³²P] dATP), na concentração de 100 μ Ci/ml em tampão TE. Essa solução foi conservada a -20°C, em um recipiente de chumbo, e renovada mensalmente. ~

3.1.2.10.6-Solução de DNA Polimerase I:

A solução foi preparada no momento do uso, diluindo-se a solução estoque de DNA polimerase I a 10U/ μ l (Biolabs) na proporção de 1:4 (V/V) no tampão descrito no item 3.1.2.10.3.

3.1.2.10.7-Solução de DNase tipo I:

No momento do uso, a solução de DNase foi preparada a partir de uma solução estoque de DNase tipo I a 1mg/ml (Sigma D4763) diluindo-se 1 μ l, 500 vezes em água Mili Q esterilizada.

3.1.2.10.8-Solução de Na₂EDTA a 0,5M pH8.0:

Após dissolução a quente do Na₂EDTA, ajustou-se o pH com NaOH a 10N e completou-se o volume com água Mili Q e a solução foi, então, autoclavada.

3.1.2.10.9-Solução de DNA carreador:

Foi preparada uma solução de DNA de esperma de salmão em tampão TE; numa concentração de 10ng/ml. Essa solução foi submetida a 5 passagens sucessivas por uma agulha 38mmX12mm e, a seguir, a mais 5 passagens por uma agulha 25mmX7mm, para que o DNA carreador fosse reduzido a fragmentos de aproximadamente 10⁵ daltons. Após o preparo, essa solução foi estocada a -20°C.

3.1.2.10.10-Solução salina padrão com citrato
(SSC): pH7,0 (20X)

NaCl	3 M
Citrato de sódio	0,3 M

3.1.2.10.11-Solução de Denhardt (50X):

Ficoll 400000	5 g
Polivinil pirrolidona	5 g
Soroalbumina bovina	5 g
H ₂ O Milli Q	500 ml

3.1.2.10.12-Solução de hibridização:

Formamida (Riedel-de-Haën) pH7.5	50%
SSC	5%
SDS para volume final de 0,1%	
Na ₂ EDTA	1mM
Solução de Denhardt	1X

3.1.2.11-Tampões e soluções para biologia
molecular:

3.1.2.11.1-Tampão E8 para a digestão
enzimática

Tris.HCl	100mM
NaCl	600mM
Beta mercapto etanol	70mM
MgCl ₂	70mM
O pH foi ajustado para 7.5 com HCl(1:10)	

3.1.2.11.2-Tampão para reações enzimáticas
"One Phor All Buffer Plus" de procedência da "Pharmacia LKB Reagentes e Diagnósticos".

3.1.2.11.3-Enzimas:

Todas as enzimas utilizadas foram de procedência da "Pharmacia LKB Reagentes e Diagnósticos".

3.1.2.12-SSPE 20X:

NaCl	174 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	27,6 g
EDTA	7,4 g

3.1.2.13-Tampão T4 quinase 10X:

Tris-HCl	0,5 M
MgCl_2	0,1 M
DTT	50 mM
Espermidina	1 mM
EDTA	1 mM

3.1.2.14-Tampão TNE:

Tris-HCl	10 mM
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM

3.1.2.15-Solução de pré-hibridização da sonda F41:

SSPE 20X	25 ml
Denhardt's 100X	5 ml
SDS 10%	5 ml
H ₂ O mili Q esteril.	65 ml

3.1.2.16-Solução de hibridização da sonda F41:

Solução de pré-hibridização (3.1.2.15)
com a adição de 150 μ l da sonda F41.

3.1.2.17-Solução de lavagem I:

SSPE 20X	40 ml
SDS 10%	4 ml
H ₂ O mili Q para volume final de 400ml	

3.1.2.18-Solução de lavagem II:

SSPE 20X	75 ml
SDS 10%	3 ml
H ₂ O mili Q para volume final de 300ml	

3.2. MÉTODOS:

3.2.1-Determinação do nível de resistência a antimicrobianos:

Os níveis de resistências a antimicrobianos das amostras foram ensaiados em concentrações crescentes dos mesmos (0; 1.0; 2.0; 5.0; 10; 20; 50; 100; 200; 500; 1000 μ g\ml) em placas contendo meio LA. As amostras foram crescidas em meio LB por 18 horas a 37°C e, a seguir, inoculadas com o auxílio de multi-alça, em placas contendo meio LA. Estas placas foram incubadas por 18 a 20 horas a 37°C. Os antibióticos, de marca Sigma, que foram utilizados são: Canamicina (Km), estreptomicina (Sm), clorafenicol (Cm), ampicilina (Amp), tetraciclina (Tc) e ácido nalidíxico (An).

3.2.2-Deteccção do fator de colonização "F42":

A presença da fímbria "F42" na superfície de bactérias foi detectada através de reação de aglutinação em lâmina de vidro entre hemácias de determinados animais e as amostras bacterianas portadoras destas estruturas.

Foram utilizadas hemácias de cobaia, de cavalo, de carneiro, de galinha e humanas. Os sangues de carneiro, de cobaia e de cavalo foi colhido em tubo esterilizado contendo solução Alsever, cujo volume foi aproximadamente igual ao do sangue colhido, e o sangue de galinha foi colhido em tubo com citrato de sódio 3,8% com volume aproximadamente igual ao do sangue colhido. Após homogeinização, as hemácias de carneiro foram centrifugadas por 5 minutos a 2000rpm para se retirar a solução de Alsever, e, a seguir, ambas as hemácias (carneiro e galinha) foram centrifugadas por 5 minutos a 2000rpm após acréscimo de solução salina 0,15M (volume 1:1). O sobrenadante foi retirado, e tampão PES pH 7,2 (volume 1:1) adicionado ao sedimento de hemácias. Após este procedimento a suspensão de hemácias foi centrifugada novamente por 5 minutos a 2000rpm, o sobrenadante

descartado e o mesmo procedimento repetido mais uma vez com tampão PBS pH 7,2 + 0,5% D-manose. Uma solução de hemácias de 1% foi preparada em tampão PBS pH 7,2 + 0,5% D-manose.

As bactérias foram crescidas por 18 horas a 37°C e por 48 horas a 16°C em meio LB e posteriormente semeadas em placas contendo meio mínimo ou meio CFA e, a seguir, incubadas por 18 horas a 37°C e por 48 horas a 16°C. As culturas foram raspadas com palito de madeira achatado esterilizado e homogeneizadas sobre uma lâmina de vidro em presença de 50µl de suspensão de hemácias geladas.

3.2.3-Deteccção de enterotoxina STa(Dean et alii, 1973):

Para deteção da produção de enterotoxina STa pelas amostras bacterianas, estas foram cultivadas sob agitação (150rpm a 37°C) por 18 horas em meio CAYE e centrifugadas (3000rpm por 30 minutos). 1ml do sobrenadante obtido foi misturado com azul de Evans 2% e 0,1ml deste foram inoculados via intra-gástrica em camundongos de aproximadamente dois dias de idade (para cada amostra foi utilizado um lote de 4 a 5 camundongos). Após um período de 3 a 4 horas à temperatura ambiente, os camundongos foram sacrificados e estabelecida uma relação entre o peso do intestino e da carcaça. Sempre que esta relação foi igual ou superior a 0,09 (devido à liberação de líquidos na luz intestinal) a bactéria foi considerada produtora de enterotoxina. Em todos os testes sempre foram incluídas duas amostras controle: uma positiva (567/7) e outra negativa (DH5α) para produção de STa.

3.2.4-Teste de produção de bacteriocina:

As amostras bacterianas foram crescidas em meio BHI por 18 horas a 37°C, e uma gota dessas amostras foi inoculada em placa contendo meio BHI-ágar e crescida por 18 horas a 37°C. A seguir, colocaram-se 3ml de clorofórmio nas tampas das placas invertidas das amostras a serem testadas, para matar as

bactérias, por 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período de tempo, as placas foram secas semi-abertas à temperatura ambiente por 0,5h e, a 37°C por mais 0,5h.

Foram inoculados 100µl da bactéria indicadora 22R80 (crescida em meio LB por 18 horas) em 4ml de meio BHI-ágar semi-sólido fundido a 50°C, e este vertido sobre a placa das amostras a serem testadas e, os mesmos, incubados por 18h a 37°C. O resultado foi considerado positivo quando houve a formação de placa de lise, e negativo quando não houve a formação da placa.

3.2.5-Estimativa dos pesos moleculares dos plasmídios das amostras estudadas:

Os pesos moleculares dos plasmídios encontrados nas amostras foram estimados com base na mobilidade eletroforética, em comparação com a migração de plasmídios com pesos moleculares conhecidos. O método de Meyers et alii (1976), baseado na relação inversa entre a migração e o peso molecular de um determinado plasmídio, foi usado como referência nesta análise, determinando-se o logarítmo do peso molecular dos plasmídios com peso molecular conhecido, contra a migração em centímetros.

3.2.6-Seleção da resistência ao antimicrobiano estreptomicina:

A bactéria foi crescida em meio LB por 18 horas a 37°C e, a seguir, 100µl foram transferidos para meio LB contendo antibiótico estreptomicina na concentração de 1µg/ml, e crescida por 18 horas a 37°C. 100µl desta amostra foram, então transferidos para meio LB contendo estreptomicina na concentração de 2µg/ml, e o mesmo procedimento repetido com concentrações crescentes de estreptomicina (4µg/ml, 8µg/ml, 16µg/ml, 32µg/ml, 64µg/ml, 128µg/ml, 256µg/ml).

3.2.7- Extração e visualização de DNA plasmidial através de eletroforese em gel de agarose:

Para a extração e visualização dos plasmídios existentes nas amostras foi utilizado o método descrito por Birnboim & Doly (1979) modificado.

As diferentes amostras foram crescidas em meio LB por 18 horas a 37°C e deste, 1,4ml foram transferidos para tubos Eppendorff, os quais foram centrifugados a 12000g por 1 minuto e o sobrenadante desprezado. Os sedimentos, assim obtidos, foram ressuspensos com o auxílio de uma micropipeta em 100µl da solução I e mantidos no gelo por 1 minuto. A seguir, foram adicionados 200µl da solução II sobre esta solução, e as mesmas misturadas através de inversão lenta dos tubos e estes colocados no gelo por 3 minutos. Após este período de tempo, foram adicionados 150µl da solução III nestes mesmos tubos, os quais foram, novamente, agitados por inversão e, a seguir, colocados no gelo por 15 minutos. A seguir, os tubos foram centrifugados (12000g- 5 minutos) e 400µl do sobrenadante transferidos para outro tubo. A estes tubos foi adicionado 1ml de etanol (-20°C), e os mesmos homogeneizados por inversão suave e mantidos a -20°C por 1 hora. Após este período, os tubos Eppendorff foram centrifugados (12000g- 6 minutos), os sobrenadantes desprezados e os sedimentos, após serem secos, ressuspensos em 50µl da solução I. 15µl desta solução foram passados para outro tubo, ao qual foram adicionados 5µl de solução azul de ressuspensão e aplicados nas canaletas do gel de agarose para a corrida.

3.2.7.1-Preparo, montagem e corrida do gel de agarose:

Para o preparo da gel de agarose, foi utilizada agarose (Pharmacia, NA) em diferentes concentrações em tampão TEB. A agarose foi fundida em forno de microondas, resfriada a aproximadamente 60°C e vertida cuidadosamente sobre uma placa de vidro mantida em posição horizontal. Em uma das extremidades

(cerca de 2.0 cm da borda) foi colocado um pente de acrílico contendo doze dentes, medindo 6.0 X 15 X 2.5 mm a uma distância de 1.5 mm acima da placa de vidro.

Após a polimerização do gel, o pente foi cuidadosamente removido e o conjunto placa-gel submerso em tampão TEB em cuba de acrílico para eletroforese horizontal. Foi aplicada uma corrente de 15mA por cerca de 15 minutos (até as amostras entrarem no gel). Em seguida foi aplicada uma tensão de $5V/cm^2$ até o final da corrida.

3.2.8-Visualização de fímbrias através de microscopia eletrônica:

3.2.8.1-Preparo das telas de microscopia eletrônica

As telas de cobre de diâmetro de 400 "Mesh" utilizadas em microscopia eletrônica foram preparadas através da deposição de uma película de parlódio e, a seguir, metalizadas com carbono, segundo as especificações do Centro de Microscopia Eletrônica da UNICAMP.

3.2.8.2-Preparo das amostras bacterianas, coloração negativa com PTA e visualização de fímbrias através de microscopia eletrônica:

As amostras bacterianas (crescidas a 37°C ou a 16°C) foram semeadas em placas contendo os meios CFA e meio mínimo a partir de um pré-inóculo em 3ml de meio LB, o qual foi incubado por 18 horas a 37°C e 48 horas a 16°C. As placas foram invertidas e incubadas por 18 horas a 37°C e a 48 horas a 16°C.

Com o auxílio de palitos achatados de madeira, um raspado do crescimento bacteriano foi delicadamente ressuspenso em 100µl de PTA 1% e imediatamente transferidos para uma tela de cobre utilizada em microscopia eletrônica. Após 2 minutos o

excesso foi removido com papel absorvente e a tela recolocada em um porta telas para secagem.

As telas secas foram visualizadas em um microscópio eletrônico de transmissão modelo EM-9, sob aumentos de 9.604X e 27.777X. As fotomicrografias eletrônicas foram feitas em filme Kodalite (Kodak) e ampliadas em papel fotográfico Kodak F3.

3.2.9-Extração de proteínas de superfície e eletroforese em SDS-PAGE:

3.2.9.1-Extração de proteínas de superfície:

As amostras 567/7, 103 Sm^r, 103-TXP6, foram crescidas a 16°C (48 horas) e 37°C (18 horas) em meio de expressão CFA. Foram ressuspendidas em tampão PBS (+ ou - 3.0ml volume final), foi feito "shearing" (10X) através de seringa e agulha de bisel 30-18, e foram vortexados por mais ou menos 5 segundos, centrifugados a 12000g por 2 minutos. Os sobrenadantes foram coletados, e a estes, adicionou-se TCA para uma concentração final de 10%, e, a seguir, foram colocados em gelo por mais ou menos 30 minutos. A seguir, centrifugou-se esta suspensão por 5 minutos a 12000g, desprezando-se o sobrenadante, 1ml de etanol-éter (1:1) foi adicionado ao sedimento e este homogeneizado em vórtex e mantido no gelo por 30 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez. Então, centrifugou-se o material a 12000g por 5 minutos, retirou-se todo o sobrenadante, secou-se o tubo à temperatura ambiente, e ressuspendeu-se em 200µl de tampão de ressuspensão da amostra. As amostras foram fervidas por 5 minutos na autoclave, centrifugadas, novamente, a 12000g por 5 minutos, e o sobrenadante coletado. 20µl deste sobrenadante foram aplicados em SDS-PAGE.

3.2.9.2-Eletroforese em SDS-PAGE:

A eletroforese das proteínas de superfície foi realizada no sistema descontínuo dissociante de Laemmli (1970) (SDS-PAGE), em equipamento Pharmacia Sistema 2001. A montagem dos géis seguiu a metodologia descrita no Hoefer Electrophoresis Catalog and Exercises (1990-1991).

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

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

3.2.9.3-Coloração de prata:

A coloração das proteínas seguiu a metodologia descrita por Blum et alii (1987), com modificações. A sequência de coloração encontra-se na tabela abaixo.

Soluções	tempo de tratamento
Fixador	> 1h
Etanol 50%	3 X 20'
Solução de pré-tratamento	1'
Água destilada	3 X 20"
Solução de impregnação	20'
Água destilada	2 x 20"
Solução reveladora	10'
Água destilada	2 X 2'
Solução de bloqueio	10'
Metanol 50%	> 20'

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

preservação II por mais 30'.

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

3.2.10-Reação das amostras com antissoros anti-F42, anti-F41, anti-K88, anti-987P, anti-K99 e anti-CS31A.

As amostras 103 Sm^r, 103-11C, 103-TXP6, 567/7, B41 (produtora das fímbrias F41 e K99), B41M (produtora da fímbria F41), 31A (produtora da fímbria CS31A) e ORN115 (produtora de fímbria tipo 1) foram crescidas em meio LB por 18 horas a 37°C. Posteriormente, estas amostras foram inoculadas em meio CFA (meio de Expressão de fímbrias) e crescidas por 18 horas a 37°C.

As culturas foram raspadas com palito de madeira achatado esterilizado e homogeneizadas sobre uma lâmina de vidro em presença de 50µl de antissoro.

Os antissoros testados foram: anti-F42, anti-F41, anti-K99 e anti-CS31A (produzidos pelo Depto. de microbiologia e Imunologia da UNICAMP; e os antissoros anti-K99, anti-K88 e anti-987P (comerciais).

3.2.11-Adsorção dos antissoros anti-F42, anti-F41, e anti-CS31A contra a amostra ORN115 (crescida a 37°C) e as amostras 567/7 e 103 (crescidas a 16°C).

A amostra ORN115 é produtora de fímbria tipo 1. Esta amostra foi crescida em 50ml de meio LB por 48 horas a 37°C.

Foi centrifugado 1ml da amostra ORN115 a 12000g por 30 segundos, o sobrenadante desprezado e ao sedimento adicionou-se 1ml do antissoro a ser adsorvido (anti-F42, anti-F41, anti-CS31A). O sedimento foi homogeneizado delicadamente no antissoro com um palito de madeira achatado esterilizado, e o tubo eppendorf colocado sob agitação suave por 20 minutos à temperatura ambiente. Após este período, a suspensão de antissoro em adsorção foi centrifugada a 12000g por 30 segundos, para a eliminação da bactéria, e o sobrenadante recuperado. Este

procedimento foi realizado com os diferentes antissoros, até que estes deixaram de reconhecer a amostra ORN115.

Estes mesmos antissoros (anti "F42", anti-F41 e anti-CS31a) foram adsorvidos contra as amostras 567/7 e 103. Para isto, as amostras 567/7 e 103 foram crescidas em meio LB por 48 horas a 16°C e posteriormente cultivadas em meio CFA por 48 horas a 16°C. Essas amostras foram raspadas com palito de madeira esterilizado e homogeneizadas em tubos eppendorf com os soros a serem adsorvidos, os tubos foram colocados sob agitação suave à temperatura ambiente por 20 minutos, centrifugados por 1 minuto a 12000g e o sobrenadante recolhido. Este procedimento foi repetido até os antissoros deixarem de reconhecer as amostra 567/7 e 103 crescidas a 16°C.

3.2.12-Western blotting das proteínas de superfície das amostras 567/7 e 103 Sm^r com os antissoros anti-F42 não adsorvido e adsorvido e anti-F41 adsorvido.

Foi realizada a extração de proteínas de superfície das amostras 567/7, 103 Sm^r e B41 (crescidas a 37°C) conforme descrito no item 3.2.9.1 e procedida a eletroforese em gel denaturante de poliacrilamida-SDS 12.5%.

Foram cortadas duas folhas de papel Whatman 3mm e uma folha de filtro de nitrocelulose no tamanho exato do gel, e um dos cantos do filtro foi marcado com lápis próprio. O filtro foi transferido para superfície de água deionizada, para umedecê-lo por capilaridade, e então, mergulhado por no mínimo 5'. Os papéis Whatman foram transferidos para um recipiente com tampão de transferência.

Depois de montado o aparato de transferência, aplicou-se a este, uma corrente de 0.65mA/cm² por 1.5-2.0 horas. O filtro foi transferido para um saco plástico contendo solução bloqueadora (0.1ml/cm²) e incubado por 18 a 20 horas sob agitação gentil à temperatura ambiente. A solução bloqueadora foi descartada e um volume igual de solução bloqueadora com anticorpo primário (antissoros) (1:500) foi adicionada ao saco plástico contendo o filtro de nitrocelulose. Este foi incubado à

temperatura ambiente por 2 horas. O filtro foi lavado 3 vezes por 10 minutos com tampão PBS e imediatamente incubado com o reagente imunológico secundário (antissoro anti-F42) (1:3000) por 2 horas à temperatura ambiente. O filtro, depois de uma lavagem final com tampão PBS, foi transferido para um recipiente contendo solução NaCl 150mM e Tris Cl 50mM (pH7.5) e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Este, foi, então, incubado por 1 hora à temperatura ambiente em solução bloqueadora livre de azida sódica e fosfato com antissoro secundário, foi transferido para recipiente contendo NaCl 50mM e Tris Cl 50mM (pH7.5) e incubado sob gentil agitação por 10 minutos. Esse passo foi repetido mais 3 vezes. Transferiu-se o filtro para um recipiente com diaminobenzidina (6mg/10ml de 10mM Tris Cl pH7.6) (0.1ml de solução para cada cm² de filtro). Adicionaram-se 10µl de H₂O₂ e a reação foi monitorada cuidadosamente. Quando as bandas estavam com a intensidade desejada, o filtro foi lavado brevemente em água e transferido para um recipiente com PBS.

3.2.13-Conjugação entre as amostras 103 Sm^r e HB101(pMR5):

A amostra HB101(pMR5) possui o plasmídio pMR5 que apresenta marcas de resistência aos antibióticos Km e Tc. Este plasmídio possui o transposon Tn801 que apresenta marca de resistência para Amp. O plasmídio pMR5 é termossensível e não se replica a 42°C.

A amostra doadora HB101(pMR5) foi conjugada com a amostra receptora 103 Sm^r. A amostra HB101(pMR5) foi crescida em meio LB+Ap+Km a 30°C por 18 horas e a amostra 103 foi crescida em meio LB a 37°C por 18 horas. Diluiu-se a amostra HB101(pMR5) de 1:20 em meio LB, e, esta foi incubada em meio LB+Ap+Km a 30°C por mais ou menos 2 a 3 horas, até entrar em fase exponencial. Centrifugaram-se 3ml desta cultura a 12000g por 30 segundos, descartou-se o sobrenadante, acrescentou-se 1ml de LB ao sedimento, transferindo-se tudo para um único tubo eppendorf, e, repetiu-se a centrifugação a 12000g por 30 segundos, descartando-se novamente o sobrenadante.

Centrifugou-se 1ml da amostra 103, crescida em meio LB a 37°C por 18 horas, a 12000g por 30 segundos, descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 1ml de meio LB e repetiu-se o procedimento.

Ambas as amostras (HB101 e 103) foram ressuspendidas conjuntamente em 100µl de meio LB, inoculadas em 5ml de meio LB e crescidas por 18 horas a 30°C. A cultura foi, então, plaqueada em meio MacConkey+Ap em diferentes diluições seriadas (1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵ e 1:10⁶) e crescida por 18 horas a 37°C. Selecionaram-se colônias Lac⁺ e estas foram crescidas em meio LB+Ap a 42°C por 18 horas. As amostras foram selecionadas em meio LA+Ap e LA+Ap+Km.

3.2.14-Eliminação plasmidial com plasmídios de incompatibilidade.

Posteriormente, cresceu-se a amostra 103-C, proveniente da conjugação acima, que possui o plasmídio pMR5 e não possui seus plasmídios originais marcados pelo transposon tn801, por 9 repiques de 18 horas a 42°C em meio LB+Ap, visando a eliminação do plasmídio pMR5. As amostras foram testadas em meio LA+Ap e LA+Ap+Km.

3.2.15-Experimento de transformação:

3.2.15.1-Extração de DNA plasmidial para a transformação:

A extração dos plasmídios da amostra 103-11C foi realizada conforme descrito no item 3.2.7 até a solução IV.

3.2.15.2-Preparo de células competentes:

A amostra DH5α foi crescida em meio LB por 18 horas a 37°C. Diluiu-se esta amostra de 1:20 em meio LB e esta foi incubada no shaker por 1 a 1.5 horas a 37°C a 150 rpm (até atingir fase exponencial). A cultura foi transferida para tubo de centrifuga (25ml por tubo) e colocada no gelo por 10 minutos, foi então centrifugada por 10 minutos a 5000rpm a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido em 20ml de CaCl₂. A cultura foi novamente colocada por 10 minutos no gelo e centrifugada por 10 minutos a 5000rpm a 4°C. Os sedimentos dos dois tubos foram ressuspendidos em 2ml de CaCl₂ e 200μl foram transferidos para tubos de ensaio pequenos, que foram colocados no gelo por 3 a 4 horas. Adicionaram-se aproximadamente 100μg da solução de plasmídio (103-11C) e a suspensão (bactéria-DNA) deixada por 45 minutos no gelo. Esta suspensão foi colocada por 2 minutos no banho a 37°C e, a seguir, no gelo por 2 minutos. Após este período de tempo, foram adicionados 800μl de meio SOC, e a suspensão colocada para crescer por 45 minutos a 1 hora a 37°C. Transferiu-se o material para um eppendorf, centrifugou-se por 2 minutos a 12000g e o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 100μl de meio LB. As amostras foram plaqueadas em meio LA+Ap. Como controle positivo da transformação, utilizou-se o pBR322 que é Ap^r e para testar a viabilidade das células, plaquearam-se as células DH5α competentes em meio LA e meio LA+Ap.

3.2.16-Conjugação entre a amostra 103-11C e C600:

A amostra C600 é resistente ao antimicrobiano ácido nalidíxico. A amostra C600 foi crescida em meio LB+An por 18 horas a 37°C, e foi a receptora. A amostra 103-11C foi crescida em meio LB+Ap por 18 horas a 37°C e foi a doadora. A conjugação foi realizada conforme descrito no item 3.2.13 e as transconjugantes foram selecionadas em meio LA+Ap+An.

3.2.17-Conjugação com amostras portadoras de plasmídios de diferentes grupos de incompatibilidade:

A amostra 103-11C foi conjugada, sendo a receptora, com diferentes amostras portadoras de plasmídios de diferentes grupos de incompatibilidade (tabela 1). A conjugação foi realizada conforme descrito no item 3.2.13. As transconjugantes provenientes das conjugações entre as amostras 103-11C e J53-1(pN3) e 103-11C e J53(pRA1) foram selecionadas em meio LA+Ap+Tc. As transconjugantes provenientes da conjugação entre as amostras 103-11C e J53-1(pR40a) foram selecionadas em meio LA+Sm+Km. As transconjugantes resultantes da conjugação entre as amostras 103-11C e J53(pR1) foram selecionadas em M.M.+Km. As colônias transconjugantes resultantes das conjugações entre as amostras 103-11C e J53(pR478), 103-11C e J53(pR702) e 103-11C e J53-r1(pSa) foram selecionadas em meio LA+Ap+Km.

Para termos certeza que o plasmídio de incompatibilidade passou para a 103-11C e não ocorreu o contrário, cresceram-se as bactérias obtidas acima em meio mínimo, pois as linhagens J53, J53-1 e J53-r1 são auxotróficas.

Cresceram-se as transconjugantes de 6 a 7 repiques em meio LB+ o antibiótico do plasmídio de incompatibilidade a 37°C, para tentar eliminar os plasmídios da amostra 103-11C. As transconjugantes resultantes das conjugações entre as amostras 103-11C e J53-1(pN3) e 103-11C e J53(pRA1) foram crescidas em meio LB+Tc. As transconjugantes provenientes das conjugações entre a amostra 103-11 e as amostras J53-1(pR40a), J53(R1), J53(pR478), J53(pR702) e J53-r1(pSa) foram crescidas em meio LB+Km. E foi feita a seleção visando achar amostras que tivessem perdido o plasmídio pWSA da amostra 103-11C.

3.2.18-Cura plasmidial com SDS:

A amostra 103-11C foi crescida em meio LB por 18 horas a 37°C. A seguir, 100µl dessa amostra foram inoculados em tubos contendo LB+SDS para concentrações finais de 1%, 2%, 3%, 5% e 10%. Estes tubos foram incubados por 48 horas a 42°C, esse

procedimento foi repetido 4 vezes. As amostras foram selecionadas em meio LA e meio LA+Ap.

3.2.19-Conjugação entre as amostras 103 Sm^r e SM10 λ pir(pRT733):

A amostra SM10 λ pir(pRT733) possui o plasmídio pRT733 (Km^r e Ap^r) que possui o transposon $TnphoA$ (Km^r). Este transposon, possui o gene para a fosfatase alcalina fusionado ao gene de resistência a canamicina, quando há a inserção deste transposon no gene de uma proteína do espaço periplasmático ou da membrana externa, de forma que o gene para a fosfatase alcalina se insira "in frame", a fosfatase alcalina é expressa formando uma proteína híbrida com a proteína do espaço periplasmático ou da membrana externa e reage com o substrato BCIP (5-bromo-4cloro-3indolil-fosfato), também denominado XP, quando este está presente no meio de cultura com canamicina, originando colônias azuis.

O plasmídio pRT733 necessita do profago λ pir, presente no cromossomo da amostra SM10, para se replicar. Logo, quando ele é transferido para outra amostra que não possui este profago, ele não consegue se replicar.

A amostra 103 Sm^r foi crescida em meio LB por 18 horas a 37°C e a amostra SM10 λ pir(pRT733) foi crescida em meio LB+Ap+Km por 18 horas a 37°C. A conjugação foi realizada como anteriormente descrito no item 3.2.13, porém, após a ressuspensão de ambas as amostras em 100 μ l de meio LB, as amostras foram inoculadas em um filtro de conjugação em uma placa contendo meio LA e incubadas por 18 horas a 37°C. As bactérias foram retiradas do filtro mergulhando-o em um tubo de ensaio contendo 1ml de LB por agitação suave do mesmo.

As transconjugantes foram selecionadas em meio LA+Km+XP(40 μ g/ml), e as colônias azuis isoladas.

3.2.20-Conjugação entre as amostras 567/7 e SM10λpir(pRT733):

A amostra 567/7 (receptora) foi crescida em meio LB por 18 horas a 37°C e a amostra SM10λpir(pRT733) foi crescida em meio LB+Ap+Km nas mesmas condições. A conjugação foi realizada conforme descrito no item 3.2.16, e as transconjugantes foram selecionadas em M.M. +Km +XPC(40µg/ml).

3.2.21-Amplificação e extração em larga escala do plasmídeo pFK99:

A amostra contendo o plasmídeo pFK99 foi crescida em 50ml de meio LB a 105rpm por 18 horas a 37°C, esses 50ml foram inoculados em 250ml de meio LB e crescidos a 150 rpm a 37°C até atingir uma O.D. 0,6 (fase exponencial), então, acrescentou-se 2,4µl/ml de cloranfenicol para uma concentração final de 170µg/ml e creceu-se por mais 18 horas a 150rpm a 37°C.

A cultura foi centrifugada por 10 minutos a 5000rpm, o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspensionado em 5ml de solução I (3.1.2.3.1) com lisozima e glicose para concentração final de 20%. Deixou-se no gelo por 30 minutos, adicionaram-se 10ml de solução II (3.1.2.3.2), misturou-se por inversão suave do tubo 4 vezes, deixou-se no gelo por 5 minutos, foram adicionados 7,5ml de solução III (3.1.2.3.3), deixou-se por mais 30 minutos no gelo, o sobrenadante foi coletado e o DNA precipitado com isopropanol 0,6V a -20°C por uma hora. Este tubo foi centrifugado por 20 minutos a 12000rpm, o sobrenadante descartado e o sedimento seco em centrífuga a vácuo. O sedimento foi ressuspensionado em 4,5ml de tampão T.E.

3.2.22-Purificação de DNA plasmidiano por gradiente de Cloreto de Césio:

Após o sedimento ter sido ressuspensionado em T.E. (4,5ml), acrescentou-se 1g de Cloreto de Césio para cada 1ml de solução e

misturou-se. A seguir, acrescentou-se Brometo de etídio (10mg/ml) na concentração de 0,8ml para cada 10ml de solução, acertou-se o índice de refração para 1,368 pela adição de CsCl ou de tampão TE. A preparação foi centrifugada a 60000rpm por 20 horas a 20°C. Após a corrida, a banda correspondente ao DNA plasmidiano foi visualizada em UV longo e coletado com seringa. O brometo de etídio foi extraído com solução de butanol saturada com água (3.2.21) e a preparação foi dializada contra água mili-Q por 36 horas.

3.2.23-Extração do brometo de etídio das preparações de DNA:

À preparação de DNA contaminada com brometo de etídio adicionou-se igual volume de solução de butanol saturado com água, misturado por inversão várias vezes e centrifugada por 2 minutos a 12000g. A fase superior contendo o butanol e o brometo de etídio diluído foi retirada com micropipeta. Repetiu-se tal procedimento até que a solução de DNA estivesse límpida.

3.2.24-Dosagem de concentração de DNA em amostras purificadas:

Diluições de 100 e 500 vezes foram preparadas e analisadas quanto à absorbância em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280nm. Cada 1 unidade de absorbância a 260nm é equivalente a 50µg/ml de DNA fita dupla. A relação 260/280, em amostras puras deverá apresentar valores entre 1.8-2.0.

3.2.25-Digestão de DNA plasmidiano com enzimas de restrição para obtenção de fragmentos a serem usados como sonda molecular do gene da fímbria K99:

A 5ng de DNA plasmidial foram adicionados 1,8µl de tampão apropriado para atividade enzimática e 1,0µl da endonuclease de restrição XbaI. Após misturado, o conteúdo do tubo foi centrifugado momentaneamente e incubado a 37°C por 5 horas. Após esse período, adicionou-se NaCl 0,5M para concentração final de 50mM e 1,0µl da endonuclease de restrição PvuII, a mistura foi, então, incubada por 18 horas a 37°C.

3.2.26-Purificação de fragmentos de DNA em agarose tipo VII ("low melting point", Sigma):

Agarose "Low melting point" na concentração de 1,5%, para purificação de um fragmento de DNA de **500** pb, foi dissolvida em tampão TEB e uma vez preparado, o gel foi gelificado em refrigerador (4°C).

A eletroforese foi conduzida a 4°C a 100 volts, sendo feita pré-corrida a 15mA para entrada da amostra no gel. Após a corrida o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5µg/ml) e visualizado em luz ultravioleta de comprimento longo. A banda menor correspondente ao fragmento **500** pb (de Graaf et alii, 1984) foi cortada e transferida para tubo eppendorf onde adicionaram-se cinco volumes de tampão TE ao pedaço de agarose. A mistura foi incubada a 65°C por 5 minutos para derreter a agarose e submetida à extração uma vez com fenol, uma vez com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e uma vez com clorofórmio:álcool isoamílico conforme item 3.2.25.

A fase aquosa foi então submetida à precipitação de DNA com etanol na presença de 0,25 volumes de 10M de acetato de amônio.

3.2.27-Purificação de DNA plasmidial através de extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (Sambrook et alii, 1989):

A banda de agarose contendo o fragmento a ser purificado e correspondente a um volume de 400 μ l de fragmento foi transferida para tubos eppendorf e o mesmo volume da mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico foi adicionado e agitado até a formação de uma emulsão. A mistura foi centrifugada a 12000g por 30 segundos à temperatura ambiente. A fase superior, que é a fase aquosa, onde está o DNA, foi transferida para novo tubo, descartando-se a fase fenólica e a interface. A extração foi repetida até que nenhuma proteína fosse visível na interface. Adicionou-se então igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e após agitação, centrifugação e recuperação da fase superior, o DNA foi precipitado com 2,5V de etanol após a correção da concentração de NaCl.

3.2.28-Desnaturação de DNA em gel para posterior hibridização com sonda K99:

O gel foi colocado em uma solução desnaturante (NaOH 1N, NaCl 0,6M) durante 40 a 45 minutos à temperatura ambiente, foi lavado com água algumas vezes para tirar o excesso de solução desnaturante. O gel foi colocado novamente em solução desnaturante (NaCl 1,5M, Tris 0,5M pH7.5) à temperatura ambiente por mais 40 a 45 minutos, foi então transferido para uma folha de papel de filtro 541 ou 3M molhada em solução neutra ou água, foi feito um "sanduíche" com outra folha de papel de filtro molhada e foi colocado no gel dryer por no mínimo 20 minutos a 80°C.

3.2.29-Marcação dos fragmentos de DNA com nucleotídeo radioativo:

A marcação dos fragmentos de DNA com (1 α -³²P)-dATP foi realizada através da técnica de "Nick translation".

Em um tubo eppendorf foram adicionados os seguintes componentes: 5 μ l de DNA (40 μ g/ml)(Framento K99), 2,5 μ l de tampão de "nick translation", 1,0 μ l de sorcoalbumina bovina (1,5 μ g/ μ l), 2,0 μ l de mistura de nucleotídeos (1mM), 2,0 μ l de solução de DNase (2ng/ μ l), 1,0 μ l de solução de DNA polimerase I (2,5U/ μ l), 1.0 μ l de solução de (1 α -³²P) dATP (100 μ Ci/ml) e 25 μ l de água mili-G q.s.p. esterilizada.

Os componentes foram adicionados na ordem descrita, enquanto o tubo permaneceu em banho de gelo. Após incubação a 14°C por 90 minutos, a reação foi interrompida adicionando-se 5 μ l de EDTA a 0,5M e incubando-se a mistura a 65°C durante 5 minutos. Foram, então, adicionados 70 μ l de tampão TE.

3.2.30-Purificação da sonda molecular do gene da fímbria K99:

A purificação da sonda molecular foi realizada através de passagem da reação em uma coluna de Sephadex G50. Essa coluna foi construída adicionando-se a suspensão de Sephadex G50 a uma seringa plástica, contendo lâ de vidro siliconizada na extremidade.

Após o empacotamento da suspensão, a seringa foi centrifugada a 3000rpm por 4 minutos em uma centrífuga de mesa (Celm), obtendo-se assim, um volume de 0,5ml de resina. A coluna foi então, lavada duas vezes com 100 μ l de tampão TE, tomando-se o cuidado de medir o volume de tampão liberado após a centrifugação. Em seguida, a preparação resultante da marcação com dATP³², foi adicionada à seringa e submetida a uma centrifugação de 3000rpm por 4 minutos. O material foi coletado e adicionaram-se 900 μ l de tampão TE ao mesmo. Uma alíquota de 5 μ l foi retirada do volume total e diluída em 1ml de água destilada para a medida da atividade específica em um cintilador Beckman (Modelo LS-100C), no canal de ³²P.

3.2.31-Hibridização do "Southern-blot" com a sonda molecular K99:

Inicialmente o gel foi imerso em solução de hibridização na proporção de 5ml de solução para cada gel. Após incubação por no mínimo 1 hora, sob agitação lenta a 37°C (período de pré-hibridização), o gel foi transferido para saco plástico contendo nova solução de hibridização acrescida de DNA carreador (100µg/ml) e DNA sonda (cerca de 10⁵cpm/ml) desnaturadas. Os sacos plásticos foram selados com uma seladora (Lorenzetti) e incubados a 37°C durante 18 a 24 horas, sob agitação lenta.

3.2.32-Lavagem do gel:

A sonda radioativa não hibridizada ou hibridizada inespecificamente foi retirada, mergulhando-se o gel em uma solução de SSC (2X); a seguir, essa solução foi desprezada e processou-se 3 lavagens com solução de SSC (2X) (cerca de 100ml por filtro) a 37°C durante 30 minutos sob agitação lenta.

Depois de seco a 37°C, o gel foi aderido a uma folha de papel espessa e colocado em cassete juntamente com um par de telas intensificadoras (Perlux) e um filme de raios X (X-Omat-R, Eastman Kodak, Rochester, N.Y.); onde permaneceram a -70°C, durante 18 a 24 horas. A revelação das autorradiografias foi realizada de acordo com as especificações do fabricante.

3.2.33-Colony-blot das amostras 103, 567/7, B41, B41M e HB101(pBR322) com a sonda molecular para o gene da fímbria K99:

Cresceu-se as bactérias por 18 horas a 37°C em meio CFA, colocou-se um disco de um filtro Whatman 541 na superfície da placa, aplicou-se uma pressão gentil sobre este com um bastão de vidro para a retirada de bolhas de ar e marcou-se o filtro com lápis apropriado para saber-se a orientação das amostras. O filtro foi colocado, com as colônias viradas para cima, sobre um

papel Whatman nº3 saturado em uma solução 0,5N NaOH - 1,5M NaCl sobre uma placa de petri. O disco foi deixado em solução por 3 minutos, retirou-se o filtro Whatman 541 e este foi imerso em uma solução 1M Tris-hidroclorito (pH7,0) - 2M NaCl por 4 minutos. O excesso foi retirado com toalha de papel e os filtros estocados em sacolas de plástico à temperatura ambiente. A hibridização foi realizada conforme descrito no item 3.2.31.

3.2.34-Extração de DNA cromossômico das amostras 103, 567/7, B41 e B41M:

A extração de DNA cromossômico das amostras 567/7, 103 B41 e B41M foi realizada a partir do inóculo destas amostras em 5ml de meio LB e seu crescimento por 18 horas a 37°C. A extração foi realizada em uma máquina Nucleic Acid Extractor 340A da Applied Biosystems, conforme as especificações do fabricante.

3.2.35-Preparação das amostras para aplicação no dot-blotting:

O DNA cromossômico das amostras 567/7, 103, B41 e B41M extraído conforme descrito no item 3.2.34 e os plasmídios purificados pFK99 (K99⁺) e PFM205 (K88ab⁺) foram utilizados no dot-blotting. Aplicou-se 10µg destes DNAs em uma solução 0,4M NaOH - 25mM EDTA, esta solução foi homogeneizada por vortex e deixada em repouso por 10 minutos, e a seguir, foi aquecida a 95°C em um termocycler por 5 minutos para denaturar o DNA. Aplicou-se 200µl desta solução, contendo o DNA na membrana de nylon, esta foi deixada no vácuo por 5 minutos, aplicou-se nesta 400µl de SSPE 2X, deixou-se no vácuo por mais 5 minutos e a membrana foi seca a 80°C por duas horas.

3.2.36-Dot-blotting dos DNAs cromossômicos das amostras 567/7, 103, B41, B41M e dos plasmídios pFK99 e pFM205:

Cortou-se o filtro de nylon Nytran do tamanho adequado, marcou-se no mapa do dot-blotting a posição das amostras a serem aplicadas, umedeceu-se o filtro por 10 minutos em água Milli Q e por mais 10 minutos em uma solução de SSPE 2X, colocou-se a membrana no aparelho de dot-blotting, aplicou-se vácuo por 5 minutos e aplicou-se as amostras.

3.2.37-Síntese de oligonucleotídeo de sequência específica do gene da fímbria F41 para ser usado como sonda molecular para F41:

Procurou-se dentro da sequência da sonda específica para F41 descrita por Anderson & Moseley (1988) uma região rica em GC e que não contivesse nenhum sítio de restrição e sintetizou-se um oligonucleotídeo entre os pares de base 368 e 387 com a sequência: 5'-TCGTAGGGAATACACTCATT-3'.

O oligonucleotídeo foi sintetizado em uma máquina 391 DNA synthesizer PCR-MATE (Applied Biosystems), este foi eluído em uma coluna de hidróxido de amônia 3 vezes, de 30 minutos cada uma, colocado no banho a 55°C por 18 horas, seco no speed-vac, ressuspendido em 300µl de água mili Q esterilizada, precipitado com 30µl de acetato de sódio 3M (pH5,4) e 900µl de etanol 100% gelado por 2 horas a -70°C, centrifugado a 12000g por 20 minutos, o etanol foi seco e o sedimento ressuspendido em 300µl de água Milli Q.

3.2.38-Marcação do oligonucleotídeo F41 com γP^{32} -ATP para uso como sonda molecular:

Em um tubo eppendorf colocou-se 3,2µg de DNA (oligonucleotídeo), 5µl de tampão da enzima T4-quinase, 28µl de água Milli Q esterilizada, 8µl de γP^{32} -ATP e 5µl da enzima T4 quinase diluída de 1:9 em Tris-HCl 50mM (pH8,0), incubou-se a

reação por 2 horas a 37°C e parou-se a reação adicionando-se 100µl de tampão TNE.

3.2.39-Purificação da sonda F41:

Após ter-se parado a reação de marcação com tampão TNE, a sonda foi purificada. Realizou-se a extração desta uma vez com 96% etanol, uma vez com fenol:clorofórmio (1:1) e uma vez com clorofórmio. A solução foi passada em uma coluna Sephadex G50, esta foi centrifugada a 1500rpm por 3 minutos e a sonda purificada coletada em um tubo eppendorf.

3.2.30-Hibridização do filtro de dot-blotting com a sonda F41:

O filtro foi colocado na solução de pré-hibridização por 2 horas a 37°C, a sonda foi denaturada por aquecimento em um bico de Bunsen por três minutos, colocada na solução de pré-hibridização (solução de hibridização) e hibridizou-se o filtro por 18 horas a 37°C. Lavou-se o filtro por 3 minutos à temperatura ambiente com a solução de lavagem I para retirar as sondas que não foram hibridizadas e por 2 minutos a 37°C com a solução de lavagem II para retirar as sondas que se ligaram inespecificamente. O filtro foi, então, exposto com um filme de raio-X por 48 horas.

4. RESULTADOS:

O trabalho foi realizado com duas amostras de Escherichia coli isoladas no Departamento de Microbiologia e Imunologia na UNICAMP. A amostra 567/7 foi descrita por Yano et alii (1986) como produtora do fator de colonização "F42". A amostra 103 (tabela 1), isolada juntamente com esta, possui padrão de hemaglutinação idêntico ao da amostra 567/7, sendo por isto, classificada como produtora deste fator de colonização ("F42").

4.1- Caracterização biológica das amostras bacterianas:

4.1.1- Resistência a antimicrobianos:

O teste para a determinação da resistência a antibióticos demonstrou que a amostra 567/7 possui resistência aos antibióticos tetraciclina, kanamicina e estreptomicina. A amostra 103 mostrou-se sensível a todos os antibióticos testados.

Para a obtenção de uma marca selecionável, que possa ser utilizada em estudos genéticos futuros, induziu-se a resistência à estreptomicina na amostra 103. (tabela 2)

TABELA 2-Resistência a antimicrobianos e capacidade de degradação de lactose:

Amostra	Níveis de resistência ($\mu\text{g/ml}$)						Lac	Prot
	Tc	Km	Sm	Cm	Amp	An		
567/7	500	1000	1000	2	2	s	+	+
103selv.	2	2	s	s	5	s	+	+
103Sm ⁺	2	2	1000	s	5	s	+	+
103-C	r	r	r	s	r	s	+	+
103-11C	s	s	r	s	r	s	+	+
103-TXP6	s	r	r	s	s	s	+	-
103-4SA	s	s	r	s	s	s	+	-

Tc=tetraciclina, Km=kanamicina, Sm=estreptomicina,
 Cm=cloranfenicol, Amp=ampicilina, An=ácido nalidíxico,
 s=sensível, Lac=degradação de lactose, (+)=resposta positiva,
 (-)=resposta negativa, Prot=prototrofia.

4.1.2-Teste de hemaglutinação:

A realização de hemaglutinação com eritrócitos de diferentes espécies (item 3.4) demonstrou que ambas as amostras (567/7 e 103) possuem padrão idêntico de hemaglutinação.

As amostras apresentaram hemaglutinação manose-resistente com eritrócitos humanos, de cavalo, de carneiro, de cobaia e de galinha somente a 37°C, e, hemaglutinação manose-sensível com eritrócitos de cobaia a 37°C e a 16°C (tabela 3).

A hemaglutinação manose-sensível com eritrócitos de cobaia a 37°C e a 16°C indicou que estas amostras possuem fímbria tipo 1. (tabela 3)

4.1.3-Produção de enterotoxina STa:

O teste em camundongos recém-nascidos para a determinação da produção de enterotoxina termoestável STa, indicou que as amostras 103 e 567/7 são produtoras desta toxina. A produção da enterotoxina STa, juntamente com o fator de colonização "F42", foi anteriormente descrita para a amostra 567/7 por Yano et alii (1986) (tabela 3).

TABELA 3-Padrões de hemaglutinação e produção de enterotoxina termoestável STa.

	Padrão hemaglutinação											STa	
	temperatura 37°C						temperatura 16°C						
	Hu	Cav	Car	Co	Gal		Hu	Cav	Car	Co	Gal		
	D	D	D	D S	D		D	D	D	D S	D		
567/7	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
103Sm ⁺	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
103-C	n	n	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
103-11C	n	n	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
103-TXP6	n	n	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
103-4SA	n	n	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
DH5α	n	n	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
B41	+	+	+	+	n	+	-	-	-	-	n	-	+
B41M	+	+	+	+	n	+	-	-	-	-	n	-	+

Hu=eritrócitos humanos, Cav=eritrócitos de cavalo, Car=eritrócitos de carneiro, Co=eritrócitos de cobaia, Gal=eritrócitos de galinha, D=com D-manose, S= sem D-manose, STa=produção de enterotoxina sta, (+)=resposta positiva, (-)=resposta negativa, n=não testado.

4.1.4-Perfil plasmidial:

Após a extração de plasmídios e sua visualização através de eletroforese em gel de agarose, verificou-se a presença de quatro plasmídios na amostra 567/7 e de três plasmídios na amostra 103.

Os plasmídios da amostra 567/7 possuem os seguintes pesos moleculares: 65.1Md (pWS1), 48.9Md (pWS2), 2.6Md (pWS6), e 2.3Md (pWS7) (figura 1).

Os plasmídios da amostra 103 foram : 123Md (pWSA), 66Md (pWSB), e 1.8Md (pWSC). (ver tabela 4 e figura 1)

4.1.5-Produção de bacteriocina:

O teste para detecção de bacteriocina, confirmou os resultados anteriores, isto é, a amostra 567/7 é produtora de bacteriocina, enquanto que a amostra 103 não o é.

TABELA 4-Designações e estimativas dos pesos moleculares dos plasmídios visualizados nas amostras 567/7 e 103Sm⁺.
(figura 1)

Plasmídios/designação	PM(Md)	Amostra portadora
pWS1	65.1	567/7
pWS2	48.9	567/7
pWS6	2.6	567/7
pWS7	2.3	567/7
pWSA	123	103
pWSB	66	103
pWSC	1.8	103

PM=Peso molecular

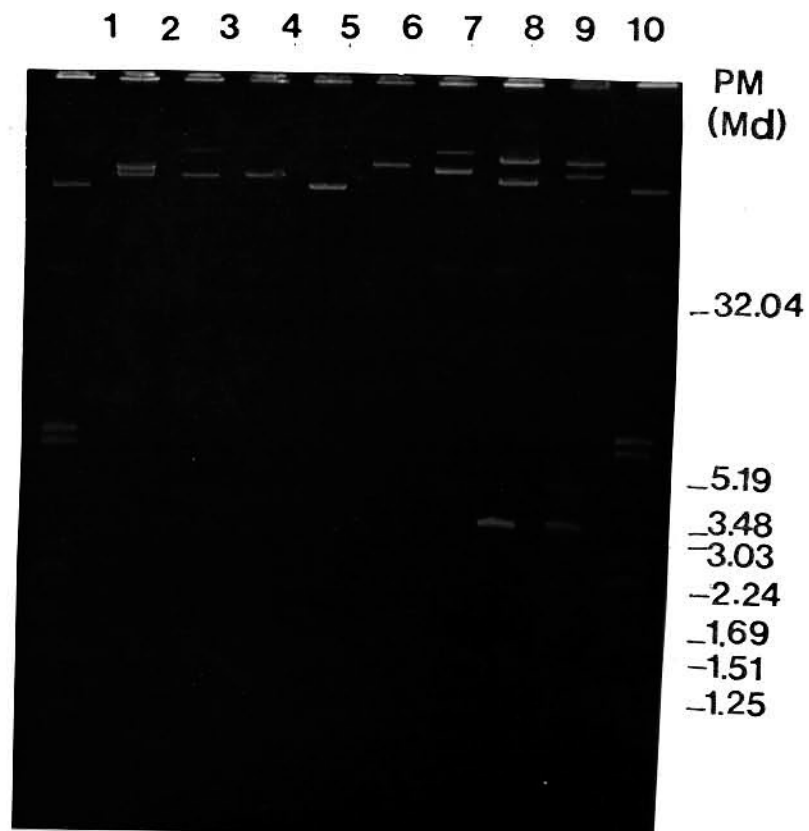


FIGURA 1-Perfil plasmidial em gel de agarose das amostras de Escherichia coli usadas no presente trabalho.

- 1.amostra VS17
- 2.amostra J53 (pR1)
- 3.amostra J53 (pRA1)
- 4.amostra J53-1 (pN3)
- 5.amostra HB101 (pRP4)
- 6.amostra HB101 (p307)
- 7.amostra J53-1 (pR40a)
- 8.amostra 103Sm⁺
- 9.amostra 567/7
- 10.amostra VS17

4.2-Estudos genéticos:

4.2.1-Conjugação da amostra 103 com HB101(pMR5) para mutagênese com transposon Tn801:

Através da conjugação da amostra 103 Sm^r com a amostra HB101(pMR5)(Km^r , Tc^r , Ap^r), obteve-se o transconjugante 103-C que não possui os plasmídios pWSA, pWSB e pWSC marcados com o transposon Tn801 (Ap^r), e possui o plasmídio pMR5 (figura 2). Após a eliminação do plasmídio pMR5 através do crescimento deste transconjugante por 9 repiques a $42^{\circ}C$, obteve-se o transconjugante 103-11C o qual não possui o plasmídio pWSB e possui o plasmídio pWSA marcado com o transposon Tn801 (Ap^r) (figura 2) e ainda expressa a fímbria F42, conforme determinado por hemaglutinação em lâmina, e produção de toxina STa, conforme teste em camundongo recém-nascido (tabela 3)

4.2.2-Conjugação da amostra 103-11C com a amostra C600:

Não se obteve transconjugantes através da conjugação entre as amostras 103-11C e C600.

4.2.3-Transformação da linhagem DH5 α com os plasmídios da amostra 103-11C:

Não foi possível obter transformantes do plasmídio pWSA (Ap^r) da amostra 103-11C, purificado por lise alcalina, na amostra DH5 α .

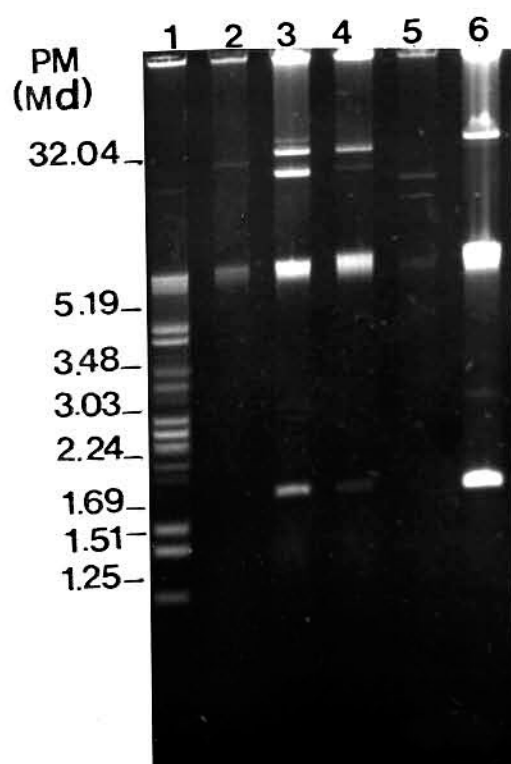


FIGURA 2-Perfil plasmidial de amostras de Escherichia coli em gel de agarose 0.7%:

1. amostra VS17
2. amostra pR40a
3. amostra 103 Sm^r
4. amostra 103-C
5. amostra HB101(pMRS)
6. amostra 103-11C

4.2.4-Conjugação da amostra 103-11C com amostras portadoras de plasmídios de diferentes grupos de incompatibilidade:

A amostra 103-11C foi conjugada com amostras portadoras de plasmídios de sete grupos diferentes de incompatibilidade (tabela 1), visando a eliminação dos plasmídios pWSA e PWSC. Nestas conjugações, não conseguimos nenhum transconjugante que tivesse perdido um dos dois plasmídios acima mencionados (dados não mostrados).

4.2.5-Eliminação plasmidial com SDS.

Através da eliminação plasmidial com SDS, conseguiu-se uma amostra (103-4SA) entre 1500 colônias testadas, a qual perdeu o plasmídio pWSC (dados não mostrados), e que continua a expressar fímbria (tabela 3).

4.2.6-Conjugação entre a amostra 103 Sm^r e a amostra SM10 λ pir(pRT733):

Objetivando-se, ainda, a localização dos genes responsáveis pela expressão da fímbria F42, através desta conjugação, obtivemos 63 colônias azuis, das quais uma (103-TXP6) manteve a expressão de fímbria (tabela 3, figura 7).

4.2.7-Conjugação entre as amostras SM10 λ pir(pRT733) e 567/7:

Devido às características das amostras envolvidas na conjugação (tabelas 1 e 2) acima não foi possível isolarem-se amostras recombinantes.

4.3-Verificação da presença de fímbrias nas amostras 567/7, 103 e 103-TXP6:

4.3.1-Visualização de fímbria através de microscopia eletrônica:

A visualização de fímbrias através de microscopia eletrônica demonstrou que a amostra 567/7 possui fímbrias rígidas de cerca de 7nm que se expressam tanto a 37°C quanto a 16°C (figuras 3 e 4, respectivamente). A amostra 103 Sm^r possui fímbrias fibrilares que só se expressam a 37°C (figura 5). A amostra 103-TXP6 também possui fímbrias fibrilares que se expressam somente a 37°C (figura 6).

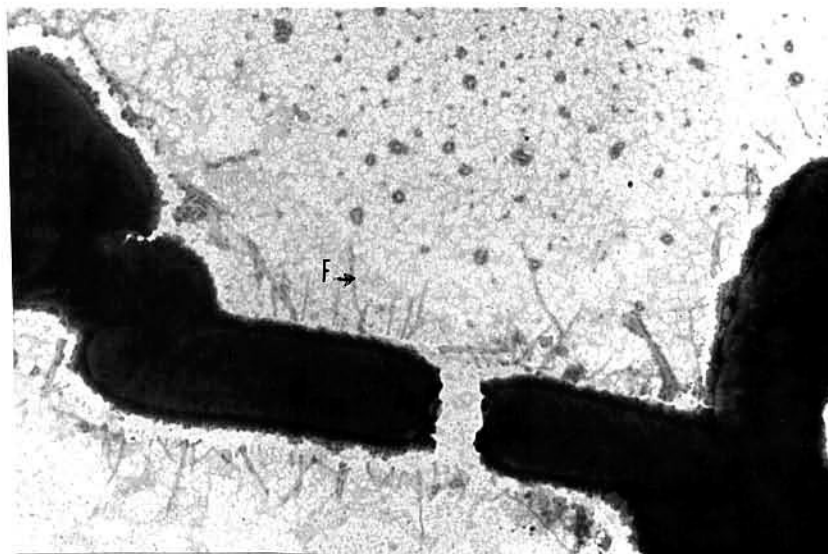


FIGURA 3-Fotomicrografia eletrônica da amostra 567/7 (aumento de 9640X) crescida em meio CFA a 37°C. f=fímbria

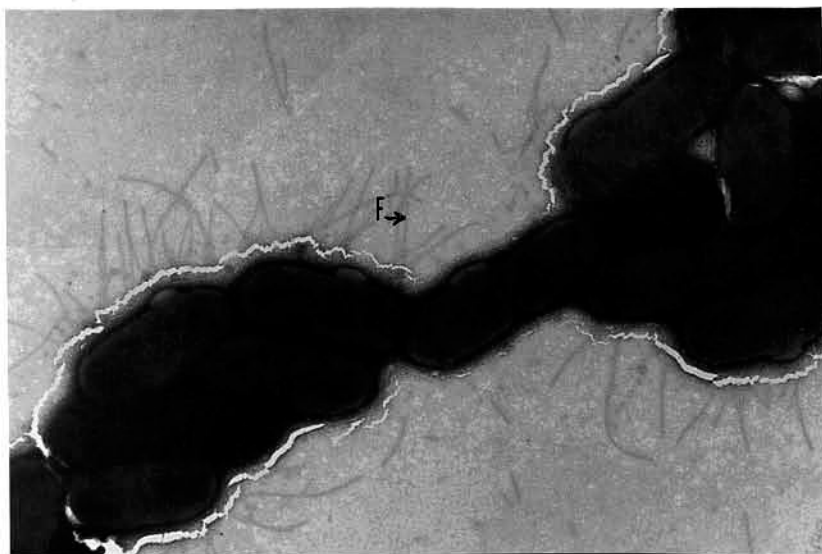


FIGURA 4-Fotomicrografia eletrônica da amostra 567/7 (aumento de 22704X) crescida em meio CFA a 18°C. f=fimbria

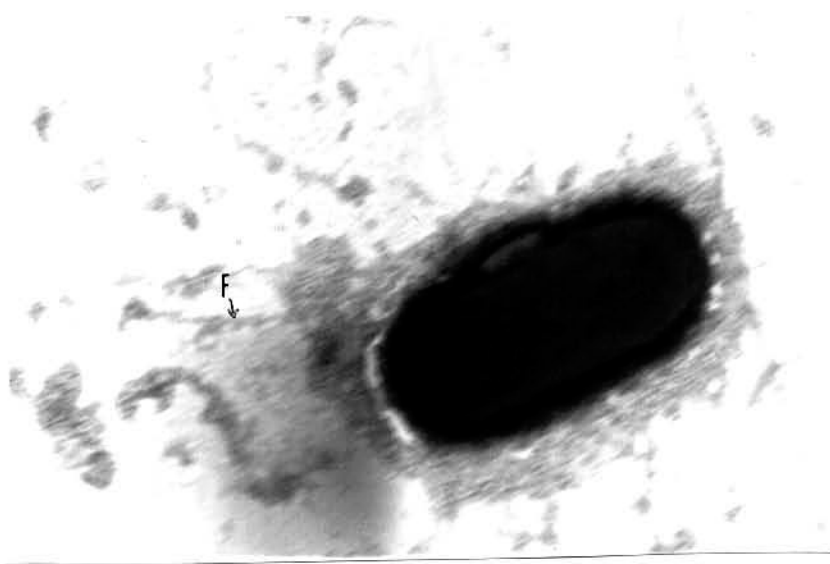


FIGURA 5-Fotomicrografia eletrônica da amostra 103 Sm^r (aumento de 22704X) crescida em meio CFA a 37°C. f=fimbria

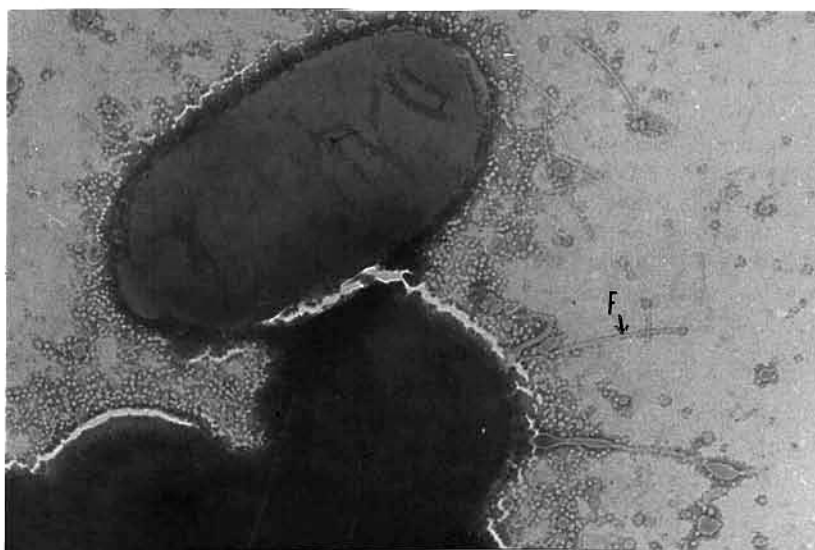


FIGURA 6-Fotomicrografia eletrônica da amostra 103-TXP6 (aumento de 22704X) crescida em meio CFA a 37°C. f=fímbria

4.3.2-Perfil de proteínas de superfície em SDS-PAGE:

O perfil eletroforético de proteínas de superfície em SDS-PAGE demonstrou que a amostra 567/7 apresentou uma subunidade proteica de 29.294 Kda (figura 7) que se expressa a 37°C mas não se expressa a 16°C, a qual foi descrita como sendo a subunidade da fímbria F42 por Leite et alii (1988). A amostra 103 Sm^r apresenta duas subunidades proteicas que se expressam somente a 37°C e não a 16°C, as quais apresentaram pesos moleculares de 29.294 Kda e 18.63 Kda, respectivamente. A amostra 103-TXP6 expressou a subunidade proteica de 29.294 Kda de maneira inalterada, e não mais expressou a subunidade de 18.63 Kda. Esta amostra, entretanto, expressou uma subunidade de 48,1 Kd que se expressa a 37°C e a 16°C e que não está presente na amostra 103 original.

A figura 8 mostra que a amostra B41(F41⁺K99⁺) apresenta duas subunidades proteicas (29,294 e 18,63Kd) que não se expressam a 16°C, sendo provavelmente as subunidades das fímbrias F41 (29,294Kd) e K99 (18,63Kd). A amostra B41M (F41⁺) apresenta apenas uma subunidade proteica (29,294Kd) que só se expressa a 37°C, sendo esta, provavelmente a subunidade da fímbria F41.

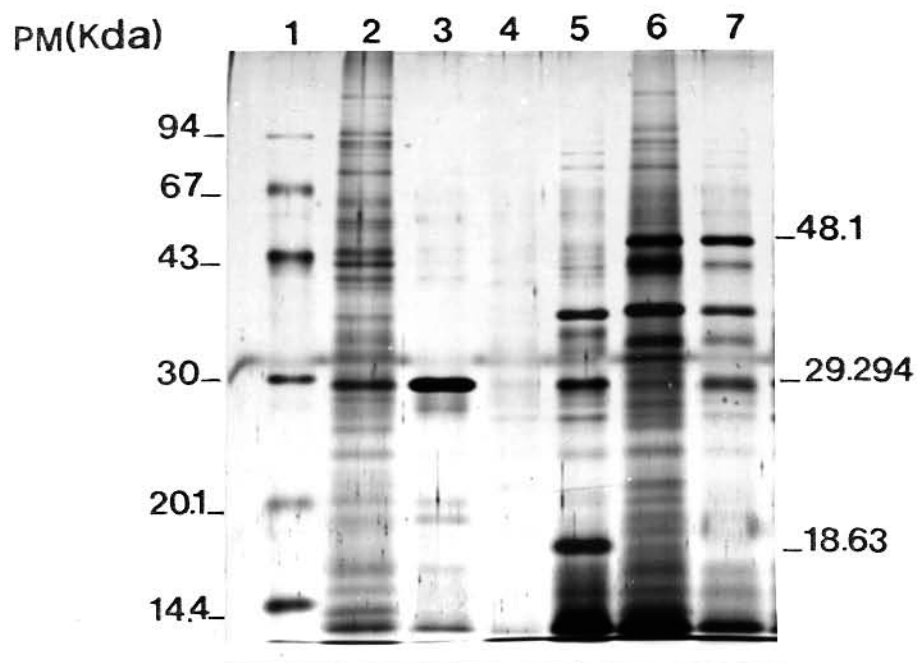


FIGURA 7-Gel SDS-page 13% de proteínas de superfície das amostras 567/7, 103 e 103-TXP6.

1. Padrão de peso molecular
2. amostra 567/7 crescida a 16°C
3. amostra 567/7 crescida a 37°C
4. amostra 103 crescida a 16°C
5. amostra 103 crescida a 37°C
6. amostra 103-TXP6 crescida a 16°C
7. amostra 103-TXP6 crescida a 37°C

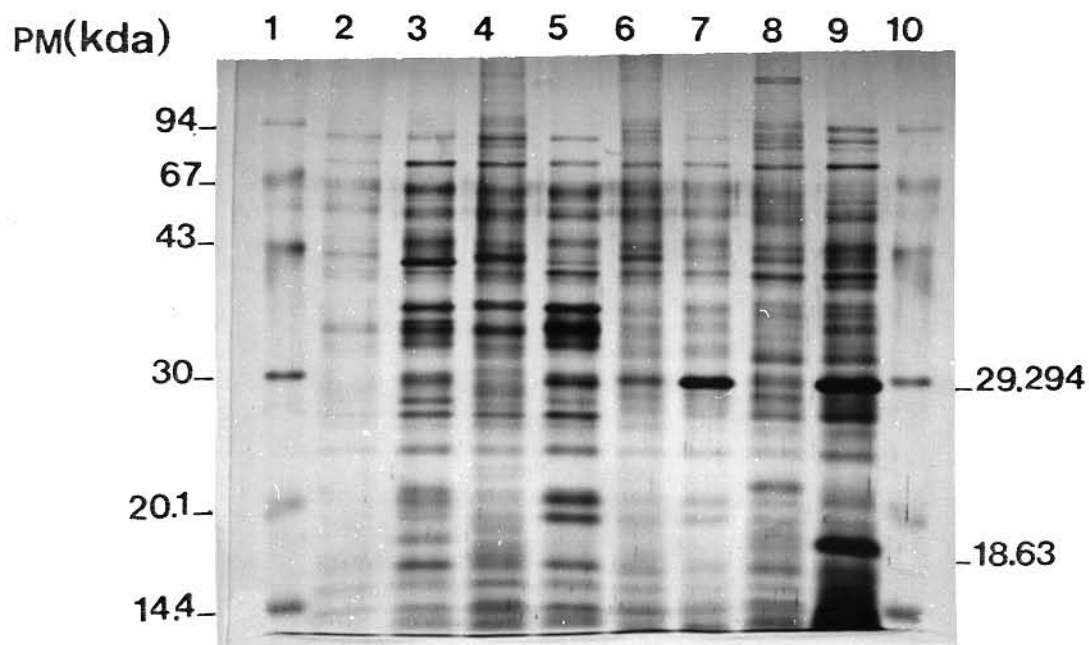


FIGURA 8-Gel SDS-page 13% proteínas de superfície das amostras estudadas:

1. Padrão de peso molecular
2. amostra B41 (F41⁺K99⁺) crescida a 16°C
3. amostra B41 (F41⁺K99⁺) crescida a 37°C
4. amostra B41M (F41⁺) crescida a 16°C
5. amostra B41M (F41⁺) crescida a 37°C
6. amostra 567/7 crescida a 16°C
7. amostra 567/7 crescida a 37°C
8. amostra 103Sm^r crescida a 16°C
9. amostra 103Sm^r crescida a 37°C
10. Padrão de peso molecular

4.3.3-Reação com antissoros anti-F42, anti-F41, anti-K99(produzidos pelo Depto. de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP e comercial), anti-K-88, anti-987P e anti-CS31A:

Através da reação com os antissoros obtiveram-se os resultados mostrados na tabela 5. Assim a amostra 567/7 reagiu com os antissoros anti-"F42" e anti-F41, adsorvidos e não adsorvidos. As amostras 103 Sm^r, 103-11C e 103-TXP6 reagiram com os antissoros anti-"F42" (adsorvido e não adsorvido), anti-F41 (adsorvido e não adsorvido) e anti-K99(DMI e comercial). A amostra ORN115 (padrão de fímbria tipo 1), reagiu com os antissoros anti-"F42", anti-F41 e anti-CS31a. Os antissoros anti-"F42", anti-CS31a e anti-F41 após serem adsorvidos contra as amostras ORN115 (crescida a 37°C), 103 e 567/7 (crescidas a 16°C), deixaram de reconhecer a amostra ORN115. O antissoro anti-CS31a, antes de ser adsorvido contra a amostra ORN115, reconhecia a amostra 567/7, mas depois de adsorvido contra fímbria tipo 1, deixou de reconhecer esta amostra. Os antissoros anti-"F42" e anti-F41 adsorvidos continuaram a reconhecer as amostras 567/7 e 103. Os antissoros anti-K88 e anti-987P não reconheceram as amostra 567/7, 103, 103-TXP6 e 103-11C. As amostras B41 e B41M foram reconhecidas pelo antissoro anti-"F42" (adsorvido e não adsorvido).

TABELA 5-Reações com antissoros anti-F42, anti-F41, anti-K99 e anti-CS31a.

amostras	Antissoros									
	K99		F41(DMI)		F42(DMI)		CS31a(DMI)		K88(C)	987P(C)
	DMI	C	NA	A	NA	A	NA	A		
567/7	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
103 Sm ^r	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
103-11C	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
103-TXP6	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
ORN115	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
B41	+	+	+	+	+	+	nt	nt	-	-
B41M	-	-	+	+	+	+	nt	nt	nt	nt
31A	nt	nt	nt	nt	nt	nt	+	+	nt	nt

NA=não adsorvido contra a bactéria ORN115; A=adsorvido contra a bactéria ORN115 (fímbria tipo 1) (crescida a 37°C) e amostras 103 e 567/7 (crescidas a 16°C); DMI=produzido no Depto de Microbiologia e Imunologia; C=comercial; nt=não testado.

Obs: A amostra ORN115 é produtora de fímbria tipo 1; a amostra B41 é produtora de fímbria K99 e F41; a amostra B41 é produtora de fímbria F41 e possui o gene para a fímbria K99 mutado e a amostra 31A é produtora da fímbria CS31A.

4.3.4-Western blotting das proteínas de superfície das amostras 567/7, 103 Sm^r com o antissoro anti-F42 não adsorvido:

No Western blotting das proteínas de superfície das amostras 567/7, 103 Sm^r, 103-TXP6 realizado com o antissoro anti-F42 não adsorvido, este reconheceu diversas bandas, demonstrando, novamente que o antissoro anti-F42 não é específico (figura 9)

4.3.5-Western-blotting das proteínas de superfície das amostras 567/7, B41 e 103 com os antissoros anti-F42 e anti-F41 adsorvidos:

Após a adsorção dos antissoros anti-F41 e anti-F42, conforme descrito no item 3.2.11, os western-blottings das proteínas de superfície das amostras 103, 567/7 e B41 contra estes dois antissoros, demonstraram que ambos os antissoros reconheceram somente a subunidade de 29,294Kda nas três amostras (567/7, 103 e B41) (figuras 10,11 e 12).

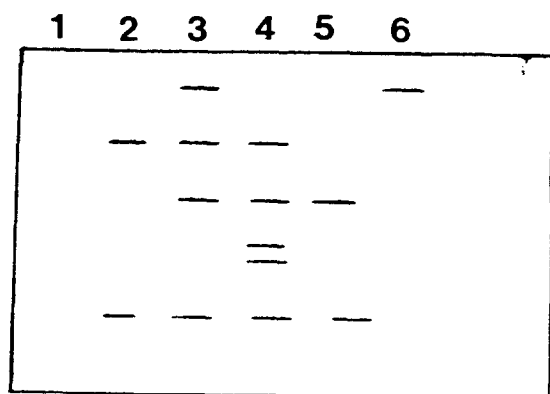


FIGURA 9-Filtro de Western blotting das proteínas de superfície das amostras 567/7 e 103 Sm^r com antissoro anti-F42 não adsorvido.

1. padrão de pesos moleculares
2. amostra 103 Sm^r crescida a $16^{\circ}C$
3. amostra 103 Sm^r crescida a $37^{\circ}C$
4. amostra 567/7 crescida a $16^{\circ}C$
5. amostra 567/7 crescida a $37^{\circ}C$
6. padrão de pesos moleculares

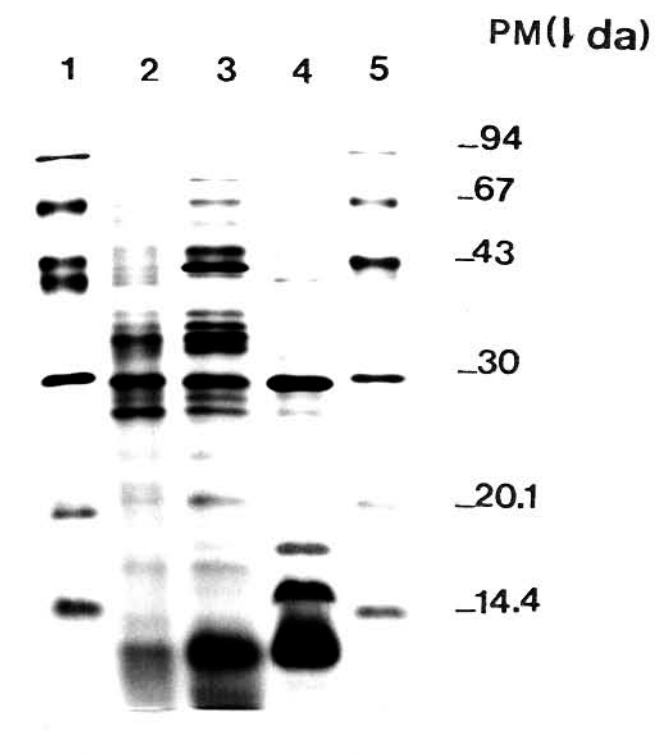


FIGURA 10-Gel SDS-page 13% das proteínas de superfície das amostras 567/7, 103 e B41 crescidas a 37°C.

1. Padrão de pesos moleculares
2. amostra 567/7 crescida a 37°C
3. amostra B41 (F41⁺K99⁺) crescida a 37°C
4. amostra 103 crescida a 37°C
5. Padrão de pesos moleculares

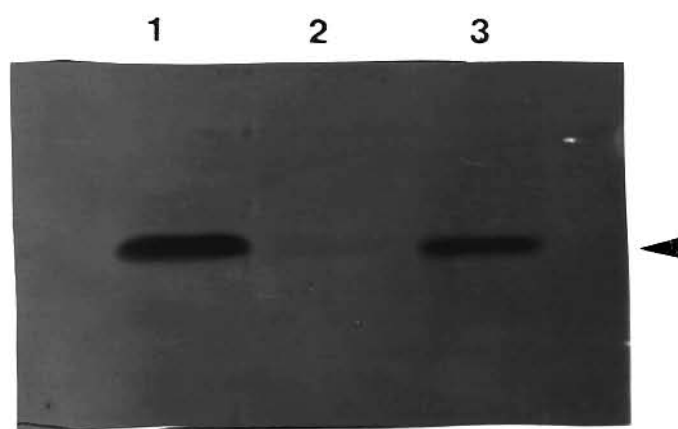


FIGURA 11-Filtro de western-blotting das proteínas de superfície das amostras 567/7, B41 e 103, crescidas a 37°C, contra antissoro anti-F42 adsorvido

- 1. amostra 567/7
- 2. amostra B41 (F41⁺K99⁺)
- 3. amostra 103

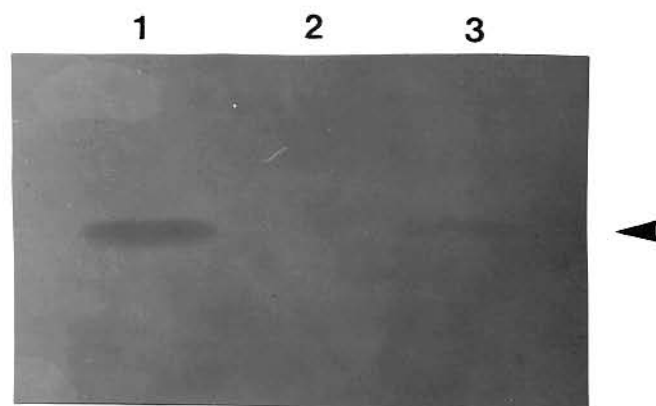


FIGURA 12-Filtro de western-blotting das proteínas de superfície das amostra 567/7, B41 e 103, crescidas a 37°C, contra o antissoro anti-f41 adsorvido.

- 1. amostra 567/7
- 2. amostra B41 (F41⁺K99⁺)
- 3. amostra 103

4.3.6-Hibridização com sonda molecular do gene da fímbria K99:

A hibridização do "Southern-blot" (figuras 13 e 14) e do colony-blot (figura 15) com a sonda molecular para o gene de K99 (figura 16) foi realizada sob condições de alta estringência. Nestas condições a sonda reconheceu no "Southern-blot" a amostra B41; o plasmídeo pFK99; o plasmídeo pWSA das amostra 103, 103-TXP6 e 103-11C e o plasmídeo pWS1 da amostra 567/7, em todas as amostras houve reconhecimento da banda cromossômica. No colony-blot (figura 14) a sonda reconheceu as amostras 567/7, 103, 103-TXP6, 103-11C e B41. Não foram reconhecidas as amostras V517 e pRB322.

4.3.7-Hibridização do dot-blot com a sonda molecular do gene da fímbria F41:

A hibridização do dot-blot contendo os DNAs cromossômicos das amostras 567/7, 103, B41 (F41⁺K99⁺) e B41M (F41⁺) e os plasmídios pFK99 (K99⁺) e pFM205 (K88ab⁺) foi realizada sob condições de alta estringência. Nestas condições, a sonda molecular F41 reconheceu as amostras B41, B41M, 567/7 e 103. (figura 17).

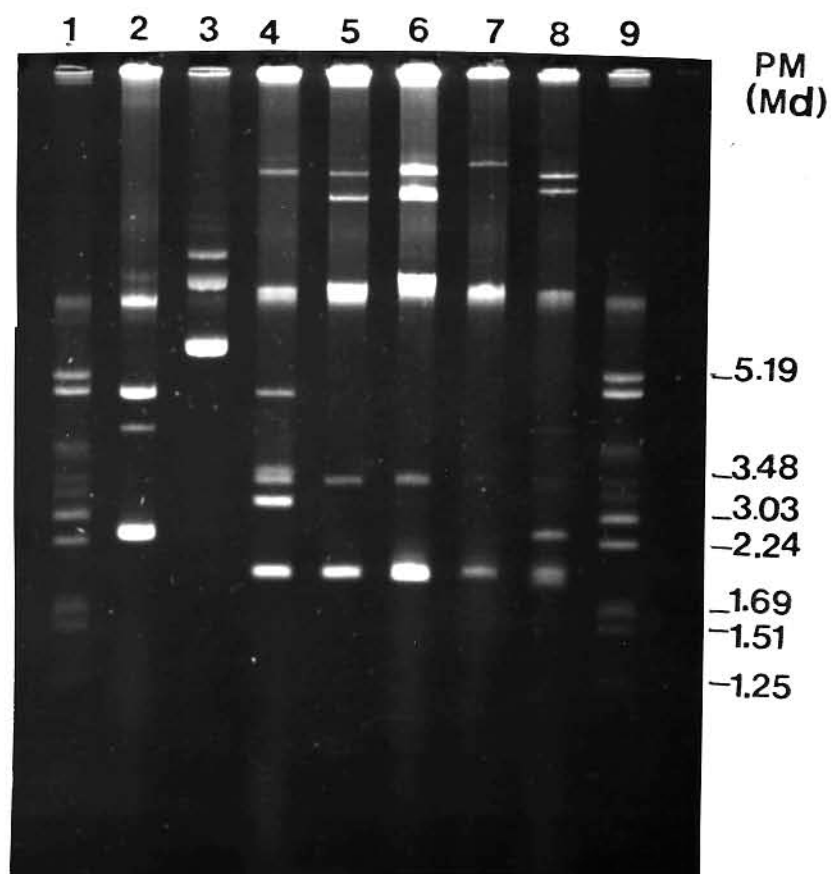


FIGURA 13-Gel de agarose 0,7% usado na hibridização com a sonda K99.

1. amostra V517
2. plasmídeo pBR322
3. plasmídeo pFK99
4. amostra B41
5. amostra 103
6. amostra 103-TXP6
7. amostra 103-11C
8. amostra 567/7
9. amostra V517

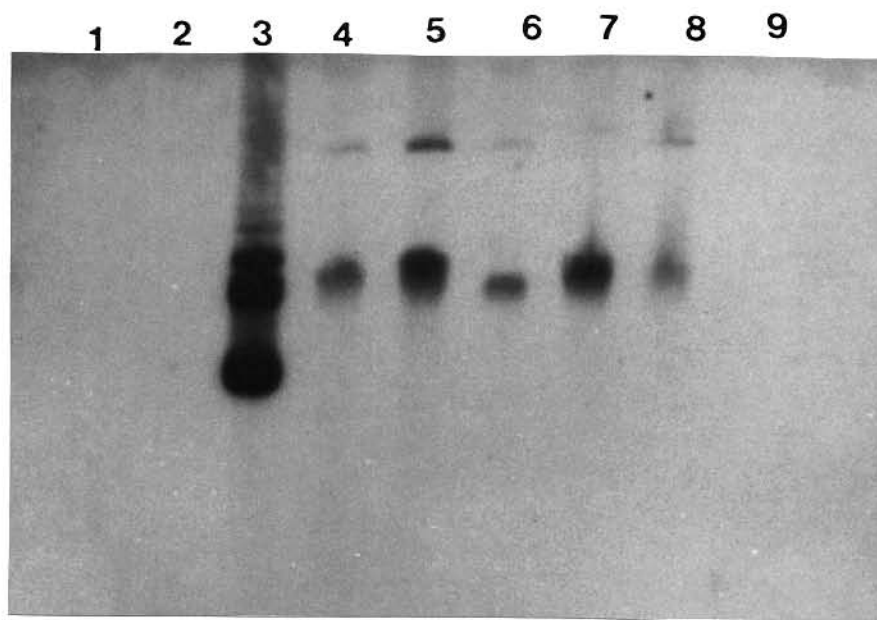


FIGURA 14-Autoradiografia da hibridização do "southern-blot" com a sonda molecular do gene da fímbria K99.

1. amostra V517
2. plasmídeo pBR322
3. plasmídeo pFK99
4. amostra B41
5. amostra 103
6. amostra 103-TXP6
7. amostra 103-11C
8. amostra 567/7
9. amostra V517

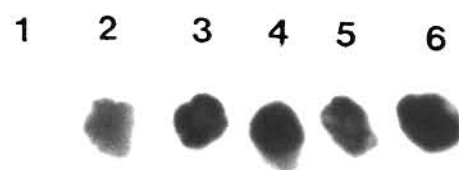


FIGURA 15-Colony-blot Hibridização de colônias com a sonda molecular do gene da fímbria K99

1. pBR322
2. 567/7
3. 103-11C
4. 103-TXP6
5. 103 Sm^r
6. B41

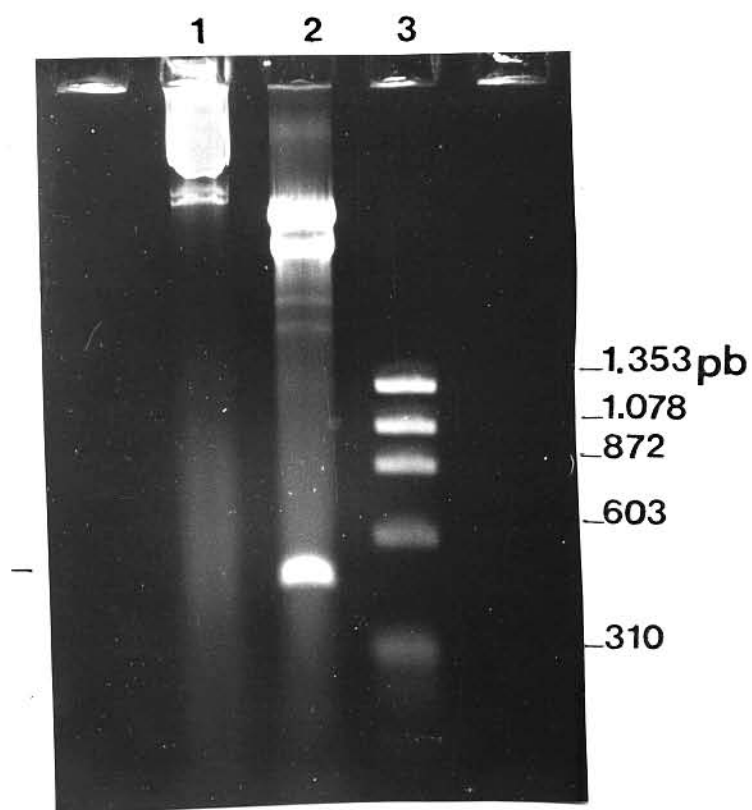


FIGURA 16-Gel de agarose 1,5% do plasmídio pFk99 não digerido, do plasmídio pFK99 digerido e do padrão de peso molecular (ϕ X174).

1. plasmídio pFK99 não digerido
2. plasmídio pFK99 digerido com as enzimas XbaI e PvuII
3. fago ϕ X174-HaeIII usado como padrão de peso molecular

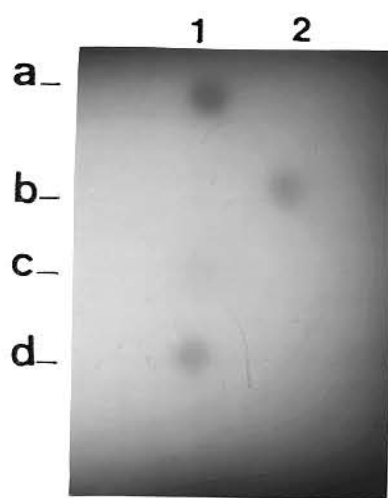


FIGURA 17-Hibridização do dot-blot com a sonda molecular da fímbria F41:

- 1a. DNA cromossômico da amostra 103
- 1b. plasmídio pFK99 ($K99^+$)
- 1c. DNA cromossômico da amostra B41 ($F41^+K99^+$)
- 1d. DNA cromossômico da amostra B41M ($F41^+$)
- 2a. plasmídio pFM205 ($K88ab^+$)
- 2b. DNA cromossômico da amostra 567/7

5. DISCUSSÃO:

A fímbria "F42" isolada a partir de fezes diarréicas de suíno foi descrita por Yano et alii (1986) na amostra de ETEC 567/7. Segundo estes autores, esta fímbria F42 é encontrada em aproximadamente 9.6% das amostras de ETEC isoladas de suínos com diarréia, constituindo-se uma importante fonte causadora de diarréia nos rebanhos brasileiros (Leite, 1986).

Juntamente com a amostra 567/7, foi isolada a amostra 103, que apresenta padrão de hemaglutinação idêntico ao da amostra 567/7, frente a eritrócitos humanos, de cavalo, de carneiro, de cobaio e de galinha. Baseados neste fato, resolvemos estudar, também, a amostra 103, para a possível localização dos genes responsáveis pela expressão da referida fímbria. Ambas as amostras (567/7 e 103) foram doadas pelo Prof. Dr. Tomomasa Yano do Depto. de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP.

A caracterização da amostra 567/7 demonstrou que a mesma é resistente aos antibióticos canamicina, estreptomicina e tetraciclina (ver tabela 2), e produz bacteriocina. Silveira (1986) demonstrou que o plasmídio de 48.9Md (pWS2) possui as marcas de resistência para canamicina, estreptomicina e o gene responsável pela produção de bacteriocina (colicina V), sendo este plasmídio conjugativo. Já o plasmídio de 65.1Md (pWS1) sempre foi transferido com o plasmídio pWS2, concluindo-se, que este último, à semelhança do fator RTF ou Δ , descrito por Watanabe (1963), Anderson & Lewis (1965) e Anderson (1969) tem a capacidade de mobilizar outros plasmídios não conjugativos. Este plasmídio pWS1 é do tipo mobilizável e possui marca de resistência para o antibiótico tetraciclina (Silveira, 1986).

A amostra 103 não é resistente a nenhum dos antibióticos testados, o que dificulta trabalhos genéticos com a mesma, pela impossibilidade de colônias recombinantes serem selecionadas após experimentos de conjugação e/ou transformação. Para trabalhos genéticos, selecionou-se uma amostra derivada da amostra 103 com resistência ao antibiótico estreptomicina.

Através do teste de degradação de lactose, verificou-se que ambas as amostras (567/7 e 103), possuem a capacidade de

degradar este açúcar.

A fímbria "F42" descrita por Yano et alii (1986) apresentou hemaglutinação manose-resistente com eritrócitos humanos, de cavalo, de carneiro, de cobaio e de galinha a 37°C. Este padrão de hemaglutinação foi descrito na amostra 567/7, com a qual foi realizado o trabalho acima citado, e que é a amostra padrão descrita como produtora do fator de colonização F42. Esta amostra (567/7) apresentou dificuldades na localização dos genes responsáveis pela expressão da fímbria F42. Estas dificuldades devem-se ao grande número de plasmídios que a referida amostra possui (descritos como sendo ao todo 7 por Silveira (1986)) e às diversas resistências a antimicrobianos. Estas características dificultam o uso de marcação e mutagênese com transposons, como por exemplo o TnphoA e o Tn801 (3.2.13 e 3.2.19).

Os dados para a determinação do perfil de DNA plasmidial (figura 1) demonstraram que os plasmídios pWS3, pWS4 e pWS5 foram perdidos pela amostra 567/7. O plasmídio pWS3 seria o responsável pela expressão da fímbria F42 (Silveira, 1986). Nossos resultados indicam que este plasmídio não possui os genes responsáveis pela expressão da fímbria F42, porque a amostra 567/7 continua a expressar o padrão de hemaglutinação característico desta amostra e, também a expressar a toxina STa. Devido ao fato de que no experimento realizado por Silveira (1986) foi usado DNA plasmidial separado por eletroforese em gel de agarose e, que a migração deste DNA é próxima à migração do DNA cromossômico, o experimento de transformação poderia ter sido realizado com material cromossômico levando à transformação concomitante de DNA plasmidial (pWS3) e de DNA cromossômico. Este fato, poderia levar à recombinação de DNA cromossômico na linhagem receptora ao mesmo tempo em que houve transformação pelo referido plasmídio, explicando assim, os resultados obtidos por Silveira (1986).

Devido às dificuldades em trabalhar-se com a amostra 567/7, resolvemos também trabalhar com a amostra 103Sm⁺, que possui padrão de hemaglutinação idêntico ao da 567/7, e, por isto, sendo uma provável produtora da fímbria "F42". Esta amostra possui apenas três plasmídios (figura 1), e somente resistência ao antibiótico estreptomicina (tabela 2).

A utilização da técnica de microscopia eletrônica demonstrou a presença de fímbrias rígidas de cerca de 7nm que se expressam a 37°C e a 16°C na amostra 567/7 (figuras 3 e 4). Este padrão de expressão coincide com o descrito para fímbria tipo 1 (Klemm et alii, 1982; Eshdat et alii, 1981 & Salit et alii, 1983). A fímbria expressa pela bactéria 567/7 foi publicada por Yano et alii (1986) como sendo "F42", pois estes não haviam observado sua expressão a 16°C. Entretanto, a fímbria tipo 1 apresenta variação de fase, podendo passar da forma piliada para a não piliada e vice-versa (Briton, 1959). Com o excesso de fímbrias tipo 1 presentes na amostra 567/7 (figuras 3 e 4), tornou-se difícil a visualização de outras fímbrias, sobretudo se estas possuírem estrutura fibrilar. Já as amostras 103 Sm^r e 103-TXP6 que possuem baixa expressão de fímbrias tipo 1, possuem fímbrias de estrutura fibrilar (figuras 5 e 6 respectivamente) que só foram visualizadas quando estas amostras foram crescidas a 37°C e que poderiam ser a fímbria F42. Entretanto esta estrutura fibrilar também é semelhante às estruturas descritas para as fímbrias F41 (Morris et alii, 1982) e K99 (Morris et alii, 1980).

Visando a confirmação da presença da fímbria F42 nas amostras 103 e 567/7, realizou-se a reação desta com o antissoro anti-F42, que foi doado pelo Prof. Domingos da Silva Leite do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP. Como foi demonstrado no item 4.3.3 (tabela 5) dos resultados, este antissoro, além de reconhecer as amostras 567/7 ("F42⁺"), 103 ("F42⁺" K99⁺), B41 (F41⁺ K99⁺) e B41M (F41⁺), reconhece também a amostra ORN115 (Ondorff, 1985), produtora de fímbria tipo 1. Após ser adsorvido (3.2.11) contra a amostra ORN115 produtora de fímbria tipo 1 (crescida a 37°C) e contra as amostras 567/7 e 103, ambas crescidas a 16°C, este antissoro continuou a reconhecer as amostras 567/7, 103, B41 e B41M, deixando de reconhecer a amostra ORN115, indicando que o soro "anti-F42" é provavelmente anti-F41. Por sua vez, a amostra 567/7 foi reconhecida pelo antissoro anti-F41, mesmo após este ter sido adsorvido contra fímbria tipo 1, indicando que, se este antissoro for realmente específico, a amostra 567/7 é produtora de fímbria F41 e não de "F42". A amostra 103 foi reconhecida pelo antissoro anti-K99 e anti-F41 (adsorvido contra fímbria tipo 1), indicando

que, se estes antissoros forem realmente específicos, a amostra 103 é produtora destas duas fímbrias. O antissoro anti-CS31a reconheceu a amostra 567/7 antes de ser adsorvido contra fímbria tipo 1, mas deixou de reconhecê-la após a adsorção, demonstrando que as amostras 567/7 e 103 não são produtoras da fímbria CS31a (com peso molecular aproximado ao das fímbrias F41 e F42) e que o antissoro não adsorvido reconheceu a amostra 567/7 por esta possuir fímbria tipo 1 em grande quantidade. Todos os antissoros citados foram produzidos e doados pelo Depto. de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP. Também testaram-se antissoros comerciais, e, destes antissoros, o antissoro anti-K99 reagiu com as amostras 103, 103-TXP6 e 103-11C, reforçando a idéia de que estas amostras provavelmente produzem a fímbria K99. Os antissoros anti-K88 e anti-987P não reconheceram nenhuma das amostras testadas (tabela 5).

Comparando-se o perfil eletroforético de proteínas de superfície das amostras 567/7 ("F42⁺"), 103 ("F42⁺" K99), B41 (F41⁺K99⁺) e B41M (F41⁺) (figura 8). Observou-se que a amostra 103 possui duas subunidades proteicas (18.63 Kda e 29.294Kda) que não se expressam a 16°C enquanto que a amostra 567/7 expressou somente a subunidade de 29.294 Kda. Esta subunidade proteica (29.294 Kda) foi descrita como sendo a subunidade da fímbria "F42", possuindo peso molecular de 31 Kd calculado por Leite et alii (1988). Os dados encontrados, neste trabalho, diferem daqueles publicados pelos referidos autores.

A amostra B41 produtora das fímbrias F41 (29,5Kd) (de Graaf & Roorda, 1982) e K99 (18,5Kd) (Gaastra & de Graaf, 1982) apresentou duas subunidades proteicas (29,294 e 18,63Kda) que não se expressam a 16°C (figura 8) e a amostra B41M produtora da fímbria F41 (Morris et alii, 1982) apresentou somente uma subunidade proteica (29,294Kda) que não se expressa a 16°C. Estes resultados indicam, mais uma vez, que a subunidade de 29,294Kd pode ser a subunidade da fímbria F41 e que a subunidade de 18,63Kd pode ser a subunidade da fímbria K99.

Através do experimento de Western blotting das proteínas de superfície das amostras 567/7 e 103 com o antissoro anti-F42 não adsorvido (figura 9), constatou-se que este antissoro, reconheceu diversas proteínas de superfície das

amostras, indicando que o mesmo não é específico para a fímbria F42, sugerindo que, esta proteína, não foi totalmente purificada no trabalho original (Leite et alii, 1988). Os western-blottings das proteínas de superfície das amostras 567/7, 103 e B41 (F41⁺K99⁺) com os antissoros anti-F41 (figura 10 e 12) e anti-F42 (figura 10 e 11) ambos adsorvidos conforme descrito no item 3.2.11, demonstraram que ambos os antissoros reconhecem a mesma subunidade proteica (29,294Kda) nas três amostras. Esta subunidade, na amostra B41, é a subunidade da fímbria F41 (de Graaf, 1990), sendo este resultado mais uma indicação de que a fímbria descrita como "F42" é provavelmente F41.

A fímbria F41 apresentou hemaglutinação manose-resistente com eritrócitos de cobaio, carneiro, cavalo e humano e a fímbria K99 com eritrócitos de cavalo e de carneiro (Gaastra & de Graaf, 1982). A fímbria "F42" apresentou hemaglutinação manose-resistente com eritrócitos humano, de cobaio, carneiro, cavalo e de galinha (Yano et alii, 1986). A única diferença nos padrões de hemaglutinação manose-resistente das fímbrias F41 e "F42" é que a fímbria "F42" hemaglutina eritrócitos de galinha e a fímbria F41 não. Entretanto, ao realizarmos o teste de hemaglutinação em lâmina com amostra B41, a qual é produtora das fímbrias F41 e K99 (Morris et alii, 1980), esta apresentou hemaglutinação manose-resistente com eritrócitos de galinha, o que indica que o teste realizado com este tipo de eritrócitos não é conclusivo para a identificação destes tipos de fímbrias.

A hibridização do "Southern-blot" (figuras 13 e 14) e do colony-blot (figura 15) com a sonda molecular do gene da fímbria K99 (de Graaf et alii, 1984), específica para esta fímbria, reconheceu as amostras 103, 103-TXP6, 103-11C e 567/7. As amostras 103 e 103-11C expressam a subunidade proteica de 18,63Kda (figura 7) e são reconhecidas pelo antissoro anti-K99 (tabela 5), ficando demonstrado, definitivamente com a sonda K99, que ambas produzem esta fímbria. A amostra 103-TXP6 (figura 7) não possui a subunidade de 18,63Kda, mas possui uma subunidade de 49,1Kda, que não está presente na amostra 103, a qual deve ser decorrente da fusão da subunidade da fímbria K99 com a fosfatase alcalina do transposon TnphoA. Esta proteína híbrida continuou a

ser reconhecida pelo antissoro anti-K99 (tabela 5). Nestas três amostras (103, 103-11C e 103-TXP6) o gene codificador da subunidade da fímbria K99 está no plasmídio pWSA (figuras 13 e 14). A amostra 567/7 não expressa a subunidade proteica de 18,63Kda e nem é reconhecida pelo antissoro anti-K99, mas é reconhecida pela sonda K99. Este fato pode ser explicado pelo fato de que a maior parte das amostras que só produzem F41 e não K99, como por exemplo a mostra B41M (Morris et alii, 1982), possuem o gene da fímbria K99 silenciado por uma mutação (de Graaf, 1990), sendo, entretanto, reconhecidos pela sonda K99. A amostra VS17 e o plasmídio pBR322 não foram reconhecidos pela sonda molecular de K99 (Figuras 13 e 14), demonstrando que a sonda é específica para o gene de K99. Entretanto, houve hibridização desta sonda na região cromossômica das amostras B41, 103, 567/7, 103-11C, 103-TXP6 e HB101(pFK99), esta hibridização pode ter ocorrido devido a presença de plasmídios pWSA e pWS1 quebrados que bandearam nessa região ou mais provavelmente pela presença de pseudogenes de K99 no cromossomo destas amostras, sendo uma provável indicação de uma origem cromossômica para este gene.

Na hibridização do dot-blot com a sonda molecular para o gene da fímbria F41 (figura 17), esta sonda reconheceu as amostras B41 (F41⁺K99⁺), B41M (F41⁺), 103 e 567/7, demonstrando que as amostras 567/7 e 103, descritas como sendo produtoras do fator de colonização "F42" por Yano et alii (1986), produzem, provavelmente, o fator de colonização F41.

Inicialmente, imaginando-se que as amostras 567/7 e 103 eram produtoras da fímbria "F42", os estudos genéticos com estas amostras, visando a posterior clonagem dessa fímbria, foram iniciados.

No experimento de conjugação entre as amostras 103 Sm^r e HB101(pMR5) foi obtida a transconjugante 103-11C que não possui o plasmídio pWSB e, ao mesmo tempo, possui o plasmídio pWSA marcado com o transposon Tn801 (Ap^r) (figura 2). Esta amostra ainda produz fímbria e STa (tabela 3), demonstrando que o plasmídio pWSB não é o responsável por nenhuma destas características.

Os experimentos de eliminação plasmidial levaram à obtenção de uma amostra (103-4SA) que não possui os plasmídios

pWSB e PWSC (dados não mostrados) e que produz fímbria e STa (tabela 3), demonstrando que o plasmídeo pWSC, também não é o responsável por tais características.

Através da conjugação entre as amostras 103 e SM10 λ pir(pRT733), obteve-se um transconjugante(103-TXP6) que apresentou hemaglutinação diminuída (tabela 3) e não expressou a subunidade de 18.63 Kda, expressando, entretanto, uma subunidade de 48,1 Kda a 37°C e a 16°C que não ocorre na amostra 103 original (figura 7). Essa subunidade de 48,1 Kd presente na amostra 103-TXP6, pode ser devida a expressão de uma proteína híbrida entre a fosfatase alcalina e a proteína codificada pela subunidade de 18.63 Kd, havendo, então sua expressão também a 16°C, devida a fosfatase alcalina.

Não foi obtida a transferência do plasmídeo pWSA (Ap^r) da amostra 103-11C através de conjugação com a amostra C600, indicando ser, este plasmídeo, não conjugativo. A transferência do plasmídeo pWSA via transformação para a amostra DH5 α também não foi obtida, devido, talvez, ao tamanho deste plasmídeo (123Md). Não conseguiu-se eliminar este plasmídeo (pWSA) através de SDS, ou através do uso de plasmídios de diferentes grupos de incompatibilidade.

A amostra 567/7 não foi conjugada com a amostra HB101(pMR5) porque não haveria como fazer a seleção dos transconjugantes, pois o plasmídeo pMR5 é resistente à kanamicina e a amostra 567/7 também (tabelas 1 e 2). Este fato não permite saber em quais colonias o transposon Tn801(Ap^r) teria sido inserido com a eliminação do plasmídeo transportador pMR5.

Mesmo assim, conjugou-se a amostra SM10 λ pir(pRT733) com a amostra 567/7 fazendo-se seleção em meio mínimo, já que a amostra SM10 λ pir(pRT733) é auxotrófica. Porém, não conseguiu-se isolar transconjugantes azuis, pois o transposon TnphoA apresenta marca de resistência à kanamicina e a amostra 567/7 também é resistente a este antibiótico.

Este trabalho demonstrou, através de técnicas de biologia molecular, que a fímbria "F42" descrita por Yano et alii (1986) é provavelmente a fímbria F41, pois possui a subunidade de peso molecular de 29,294Kda, apresenta estrutura fibrilar, é reconhecida pelo antissoro anti-F41 e a sonda molecular do gene

F41 reconhece as amostra 567/7 e 103, descritas como produtoras de "F42". A única diferença entre a suposta fímbria "F42" e F41 é que não é descrita a hemaglutinação manose-resistente de eritrócitos de galinha para F41, entretanto, as amostras B41 (F41⁺K99⁺) e B41M (F41⁺) (Gaastra & de Graaf, 1982) apresentaram hemaglutinação manose-resistente com este tipo de eritrócito, o que indica que este tipo de teste não é conclusivo para a identificação de novas fimbrias.

6. RESUMO:

As amostras de Escherichia coli (567/7 e 103) enterotoxigênicas (STa⁺), isoladas de fezes diarreicas de suínos, produtoras de uma nova fímbria "F42" foram estudadas quanto a produção de bacteriocinas, resistência a antimicrobianos, padrão de hemaglutinação frente a diferentes eritrócitos, produção de toxinas, perfil plasmidial e perfil de proteínas de superfície.

Visando a localização e a posterior clonagem do gene responsável pela codificação de "F42", realizou-se experimentos de conjugação, transformação, mutagênese com transposons e cura plasmidial, entretanto, através de cálculo dos pesos moleculares das subunidades proteicas apresentadas por estas amostras (567/7 e 103), e da observação de fímbrias em microscopia eletrônica, surgiram dúvidas quanto à existência desta "nova fímbria" "F42".

Visando a confirmação da presença da fímbria F42 nas amostras 567/7 e 103 estas foram testadas com diferentes antissoros contra as fímbrias F41, "F42", K99, K88, 31A, CS31A e 987P, sendo que a amostra 103 foi reconhecida pelos antissoros anti-"F42", anti-F41 e anti-K99; e a amostra 567/7 pelos antissoros anti-"F42" e anti-F41.

O perfil de proteínas de superfície destas duas amostras demonstrou que ambas possuem uma subunidade proteica de 29,294Kda que só se expressa a 37°C e que a amostra 103 possui, também uma outra subunidade proteica de 18,63Kda que se expressa nestas mesmas condições. As amostras B41 (F41⁺K99⁺) e B41M (F41⁺) apresentam a subunidade de 29,294Kda, descrita como F41, e a amostra B41 possui, também a subunidade de 18,63Kda, descrita como K99.

Os Western-blotting das proteínas de superfície contra os antissoros anti-F41 e anti-"F42" demonstrou que ambos os antissoros reconhecem apenas a subunidade de 29,294Kda nas amostras 567/7, 103 e B41 (F41⁺K99⁺), sendo mais uma indicação de que as amostras 567/7 e 103 são produtoras da fímbria F41.

A hibridização com a sonda molecular para o gene da fímbria K99 reconheceu as amostras 103 e 567/7, demonstrando que

a amostra 103 é produtora desta fímbria e que a amostra 567/7, possui o gene para esta fímbria silenciado por alguma mutação uma vez que esta amostra (567/7), não expressa esta fímbria.

A hibridização com a sonda molecular para o gene da fímbria F41 reconheceu as amostras 567/7 e 103, sendo mais uma indicação de que estas amostras produzem a fímbria F41.

Os dados apresentados neste trabalho demonstram que a fímbria descrita como "F42" é provavelmente a fímbria F41.

7. ABSTRACT:

The enterotoxigenic Escherichia coli strains (STa⁺) (567/7 and 103), isolated from feces of piglets with diarrhea and producers of a new fimbriae "F42", were studied for the production of bacteriocines, resistance to antibiotics, hemagglutination pattern with different erythrocytes, production of toxins, plasmidial pattern and superficial proteins pattern.

Searching for the localization and cloning of the gene responsible for coding "F42", experiments of conjugation, transposons mutagenesis, transformation and plasmidial elimination were realized, however, by the calculation of the proteic subunits molecular weights of this strains (567/7 and 103) and the observation of the fimbrial structures at electron microscopy, doubts about the existence of the "new fimbria" "F42" appeared.

In order to confirm the presence of the "F42" fimbriae in the strains 567/7 and 103, this strains were tested against different antisera against "F42", F41, K99, K88, 31A, CS31a and 987P fimbriae. Strain 103 was recognized by anti-"F42", anti-F41 and anti-K99 antisera, and strain 567/7 by anti-"F42" and anti-F41 antisera.

The superficial protein pattern of this strains demonstrated that both have a proteic subunit of 29,294Kda which is only expressed at 37°C, and that strain 103, has another proteic subunit of 18,63Kda expressed this way. Strains B41 (F41⁺K99⁺) and B41M (F41⁺) have a proteic subunit of 29,294Kda described as being the f41 subunit, and strain B41 has another subunit of 18,63Kda described as being K99.

The Western-blotting of the superficial proteins against anti-"F42" and anti-F41 antisera, demonstrated that both antisera recognize the 29,294Kda subunit in strains 567/7, B41 and 103, this is one more indication that strains 567/7 and 103 are F41 producers.

The hybridization with the molecular probe for the K99 gene recognized strains 103 and 567/7, demonstrating that strain 103 is a producer of this fimbriae and that strain 567/7 has the gene for this fimbriae silenced for some mutation, as strain

567/7 does not express this fimbriae.

The hybridization with the molecular probe for the gene of F41 recognized strains 567/7 and 103, this being another indication that these strains are F41 producers.

The data presented in this work demonstrate that the fimbriae described as being "F42" is probably the F41 fimbriae.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Acres, S. D.; Isaacson, R. E.; Babiuk, L. A. & Kapitany, R. A. Immunization of calves against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with perified K99 antigen and whole cell bacterins. Infect. Immun., 25: 121-6, 1979.
- Anderson, E .S. & Lewis, M. J. 1965. Characterization of a transfer factor associated with drug resistance in Salmonella typhimurium. Nature, 208: 843-9.
- Anderson, D. G. & Moseley, S. L. *Escherichia coli* F41 adesin: genetic organization, nucleotide sequence, and homology with the K88 determinant. J. Bacteriol., 170: 4890-6, 1988.
- Aronson, M.; Medalia, O.; Schori, L. Prevention of *Escherichia coli* colonization of the urinary tract by blocking bacterial adherence with methyl α -D-mannopyranoside. J. Infect. Dis., 139: 329. 1979.
- Arthur, M.; Campanelli; C.; Arbeit, R. D.; Kim; C.; Steinbach, S.; Johnson; C. E.; Rubin, R. H. & Goldstein, R. Structure and copy number of gene clusters related to the pap P-adhesin operon of uropathogenic *Escherichia coli*. Infecct. Immun., 57: 314, 21, 1989.
- Baldini, M. M.; Kaper, J. B.; Levine, M. M.; Candy, D. C. A. & Moon, H. W. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 2: 534-8, 1983.
- Baldwin, T. J.; Brooks, S. F.; Knutton, S.; Manjarrez Hernandez, H. A.; Aitken, A. & Willians, P. H. Protein phosphorylation by protein kinase c in Hep-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun., 58: 7661-65, 1990.

- Birnboim, H. C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. Nucleic. Acid. Res., 7: 1531-32, 1979.
- Black, R. E.; Brown, K. H.; Becker, S.; Abdul Alim, A. R. M. & Hug, I. (1982). A. J. Epidemiol., 115: 315-24.
- Blum, H.; Beier, H. & Gross, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. Electrophoresis, 8: 93-99, 1987.
- Bopp, C. A.; Greene, K. D.; Downes, F. P.; Sowens, E. G.; Wells, J. E. & Wachsmuth, I. K. Unusual verotoxin producing *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. Microbiol., 25: 1486-1489, 1987.
- Bovian, M.; Coleman, D. C.; Scott, J. R. & Smyth, C. J. Molecular cloning of the plasmid-located determinants for CS1 and CS2 Fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* of serotype O6: K15: H16 of human origin. (Submetido para publicação 12/3/88).
- Boylan, M.; Coleman, C. D. & Smyth, C. J. Molecular cloning and characterization of the genetic determinant encoding CS3 fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Microbiol. Pathogen., 2: 195-209, 1987.
- Burrows, M. R.; Sellwood, R. & Gibbons, R. A. Haemagglutinating and adhesive properties associated with the K99 antigen of bovine strains of *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol., 96: 269-275, 1976.
- Castro, A. F. P. de; Serafim, M. B.; Brito, J. R. F.; Barcellos, D. S. E. N. de & Colli, I. A. G. Virulence factors present in cultures of *Escherichia coli* isolated from pigs in the region of Concórdia, Santa Catarina, Brazil, Pesq. Vet. Bras., 4: 109-14, 1984.

- Chang, P. P.; Moss, J.; Twiddy, E. M. & Holmes, R. K. Type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* activates adenylate cyclase in human fibroblasts by ADP ribosylation. Infect. Immun., 55: 1854-8, 1987.
- Christensen, G. D.; Simpson, W. A. & Beachey, E. H. Microbial adherence in infection. In: Mandell; Douglas & Bennett. Principles and practice of infectious diseases. 2ed. Parte I, Seção A, Cap.2. pp.6-23. 1985.
- Clements, J. D. Vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli* based on hybrid *Salmonella* that express ETEC antigens. Meeting on Development of vaccines for cholera and ETEC diarrhoea, Baltimore, U.S.A., 1988.
- Clements, J. D.; Yancey, R. J. & Finkelstein, R. A. Properties of homogenous heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*. Infect. Immun., 29: 91-7, 1980.
- Cravioto, A.; Gross, R. J.; Scotland, S. M. & Rowe, B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. Curr. Microbiol., 3: 95-99, 1979.
- Crowl, R.; Seamans, C.; Lomedico, P. & McAndrew, S. Versatile expression vectors for high-level synthesis of cloned gene products in *Escherichia coli*. Gene, 38: 31-8, 1985.
- Curtiss III, R.; Maurelli, A. T. & Gulig, P. A. Genetic analysis of pathogenesis of enteric bacteria. In: Owen, P. & Foster, T. J. (eds.). Immunochemical and molecular genetic analysis of bacterial pathogens. cap.6. pp.67-81. Elsevier, 1988.
- Dallas, W. S. & Falkow, S. The molecular nature of heat-labile enterotoxin (LT) of *Escherichia coli*. Nature, 277: 406-407, 1979.

- Dallas, W. S. & Falkow, S. Amino acid sequence homology between cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin. Nature., 288: 499-501, 1980.
- Dallas, W. S.; Gill, W. M. & Falkow, S. Cistrons encoding *Escherichia coli* heat-labile toxin. J. Bacteriol., 139: 850-58, 1979.
- Darfenille, A.; Lafenille, B.; Joly, B. & Cluzel, R. A new colonization factor antigen (CCFA/III) produced by enteropathogenic *Escherichia coli* 0128:B12. Ann. Microbiol., 134: A53-A64, 1983.
- Davis, C. P.; Avots-Avotins, A. E. & Fader, R. C. Evidence for a bladder cell glycolipid receptor for *Escherichia coli* and the effect of neuraminic acid and colonic acid on adherence. Infect. Immun., 34: 944, 1981.
- Davis, B. D. & Minglioli, E. S. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12. J. Bacteriol., 60: 17-28, 1950.
- Dean, A. G.; Ching, Y. C.; Williams, R. G. & Harden, L. B. Test for *Escherichia coli* enterotoxin of diarrhea in children in Honolulu. J. Infect. Dis., 125: 407-11, 1973.
- De Graaf, F. K. & Klaasen, P. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of 987P fimbriae. Mol. Gen. Genet., 204: 75-81, 1986.
- De Graaf, F. K.; Krenn, B. E. & Klaasen, P. 1984. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of K99 fimbriae. Infect. Immun., 43: 508-514.
- De Graaf, F. K. & Roorda, I. Production, purification, and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from calf enteropathogenic *Escherichia coli* B41M. Infect. Immun., 36: 751-3, 1982.

- de Graaf, F. K. Genetics of adhesive fimbriae of intestinal *Escherichia coli* In: Jann, K. & Jann, B. (eds.) Current Topics in Microbiology and Immunology: Bacterial Adhesins. pp. 29-53., Springer-Verlag, Berlin, 1990.
- de Ree, J. M.; Schiwillens, P & Van den Bosch, F. Molecular cloning of F11 fimbriae from a uropathogenic *Escherichia coli* and characterization of fimbriae with polyclonal and monoclonal antibodies. FEMS Microbiol. Letters, 29: 91-7, 1985
- DuPont, H. L.; Formal, S. B.; Hornick, R. B.; Snyder, M. J.; Libonati, J. P.; Sheahan, D. G.; LaBrec, E. H. & Kalas, J. P. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. N. Engl. J. Med., 285: 1-9, 1971.
- Duguid, J. P.; Clegg, S.; Wilson, M. I. The fimbrial and nonfimbrial haemagglutinins of *Escherichia coli*. J. Med. Microbiol., 12: 2/3-27, 1979.
- Duguid, J. P. & Old, D. C. Adhesive properties of Enterobacteriaceae. In: Beachey, E. H. (ed.). Bacterial adherence (receptors and recognition). Ser. B. Vol. 6. p.184. London and Methuen, New York, Chapman and Hall, 1980.
- Dykes, C. W.; Halliday, I. J.; Hobden, A. N.; Read, M. J. & Harford, S. A comparison of the nucleotide sequence of the A subunit of heat-labile enterotoxin and cholera toxin. FEMS Microbiol. Lett., 26: 171-4, 1985.
- Echeverria, P.; Seriwata, J.; Patamaroj, U.; Moseley, S. L.; McFarland, A.; Chityothin, O. & Chaicumpa, W. Prevalence of heat-stable II enterotoxigenic *Escherichia coli* in pigs, water and people at farms in Thailand as determined by DNA hybridization. J. Clin. Microbiol., 19: 489-91, 1984.
- Edwards, P. R. & Ewing, W. H. Identification of Enterobacteriaceae. 3ed. Minneapolis, Burgess Publishers, 1972.

- Eshdat, Y.; Silverblatt, F. J.; Sharon, N. Dissociation and reassembly of *Escherichia coli* type I pili. J. Bacteriol., 148: 308-14, 1981.
- Evans, D. G. & Evans, D. J., Jr. New surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O6 and O8. Infect. Immun., 21: 638-647, 1978.
- Evans, D. G.; Evans, D. J. & Gorbach, S. L. Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. Infect. Immun., 8: 725-31, 1973.
- Evans, D. J.; Evans, D. G.; Young, L. S. & Pitt, J. Hemagglutination typing of *Escherichia coli*: definition of seven hemagglutination types. J. Clin. Microbiol., 12: 235-42, 1980.
- Evans, D. G.; Silver, R. P.; Evans, D. J., Jr; Chase, D. G. & Gorbach, S. L. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. Infect. Immun., 12: 656-667, 1975.
- Ferreira, C. M. 1992. Estudos biológicos e genéticos em uma amostra de *Escherichia coli* enterotoxigénica de origem bovina. Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas S.P.
- Field, M.; Graf, I. H.; Laird, W. J. & Smith, P. L. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: in vitro effects on Cyclase activity, cGMP concentration, and ion transport in small intestine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75: 2800-4, 1978.
- Firon, N.; Ofek, I. & Sharon, N. Interaction of manose-containing oligosaccharides with the fimbrial lectin of *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 105: 1426, 1982.

- Fondacaro, J. D. Intestinal ion transport and diarrheal disease. Am. J. Physiol., 250: G1-G8, 1986.
- Fondacaro, J. D. & Henderson, L. S. Evidence for protein kinase C as a regulator of intestinal electrolyte transport. J. Physiol., 249: G422-G426, 1985.
- Formal, S. B. & Hornick, R. B. Invasive *Escherichia coli*. J. Infect. Dis., 137: 641-4, 1978.
- Frantz, J. C.; Jaso-Friedman, L. & Robertson, D. C. Binding of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to rat intestinal cells and brush border membranes. Infect. Immun., 43: 622-30, 1984.
- Gaastra, W & De Graaf, F. K. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive *Escherichia coli* strains. Microbiol. Rev., 46(2): 129-161, 1982.
- Gannon, V. P. J. & Gyles, C. L. Four types of *Escherichia coli* verotoxins. Abstracts of an International Symposium and Workshop on Verocitotoxin-Producing *Escherichia coli* Infections., Toronto, Abstracts, STF-15, 1987.
- Gariépy, J.; Jud, A. & Schoolnik, G. K. importance of disulfide bridges in the structure and activity of *Escherichia coli* enterotoxin ST1b. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 8907-11, 1987.
- Gariépy, J.; Lane, A.; Frayman, F.; Wilbur, D.; Robien, W.; Schoolnik, G. K. & Jardetzky, O. Structure of the toxin domain of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin ST1. Biochemistry, 25: 7854-66, 1986.
- Gariépy, J. & Schoolnik, G. K. Design of a protoreactive analogue of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin ST1b: use in identifying its receptor on rat brush border membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 483-87, 1986.

- Gill, D. M. & Richardson, S. H. Adenosine diphosphate-ribosylation of adenylate cyclase catalysed by heat-labile enterotoxin. Infect. Immun., 33: 677-82, 1980.
- Girardeau, J. P.; Vartanian, M; Ollier, J. L. & Contrepolis, M. CS31a, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. Infect. Immun., 56(8):2180-2188.
- Gransden, W. R.; Damm, M. A. S.; Anderson, J. D.; Carter, J. E. & Lior, H. Further evidence associating hemolytic uremic syndrome with infection by verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. J. Infect. Dis., 154: 522-4,
- Green, B. A.; Neil, R. J.; Ruyechan, W. T. & Holmes, R. K. Evidence that a new enterotoxin of *Escherichia coli* which activates adenylate cyclase in eucariotic target cell is not plasmid mediated. Infect. Immun., 41: 383-90, 1983.
- Greenberg, R. N. & Guerrant, R. L. *E. coli* heat-stable enterotoxin. Pharmacol. Ther., 13: 507, 1980.
- Guineé, P. A. M. & Jansen, W. H. Detection of enterotoxigenicity and attachment factors in *Escherichia coli* strains of human, porcine, and bovine origin; a comparative study. Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. Reihe A, 243: 245-57, 1979.
- Gyles, C. L. Limitations of the infant mouse test for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins. Can. J. Comp. Med., 34: 337-40, 1979.
- Hacker, J.; Schmidt, G.; Hughes, C.; Knapp, S.; Marget, M & Goebel, W. Cloning and characterization of genes involved in production of mannose-resistant, neuraminidase-susceptible (X) fimbriae from a uropathogenic O6:K15:H31 *Escherichia coli* strain. Infect. Immun., 47: 434-440, 1985.

- Hale, T. L.; Sansonetti, P. J.; Schad, P. A.; Austin, S. & Formal, S. B. Characterization of virulence plasmids and plasmid-associated outer membrane proteins in *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, and *Escherichia coli*. Infect. Immun., 40: 340-50, 1983.
- Hagbert, L.; Hull, R.; Hull, S. et alii. Contribution of adhesion to bacterial persistence in the mouse urinary tract. Infect. Immun., 40: 265, 1983.
- Hagbert, L.; Jodal, U.; Korhonen, T. K. et alii. Adhesion, hemagglutination, and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections. Infect. Immun., 31: 564, 1981.
- Hanson, M. S.; Hempel, J. & Brinton, Jr. C. Purification of the *Escherichia coli* type 1 pili and minor pilus proteins and partial characterization of the adhesin protein. J. Bacteriol., 170(8): 3350-8, 1988.
- Hirst, T. R.; Randal, L. & Hardy, S. J. Cellular location of heat-labile enterotoxin in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 157: 637-42, 1984.
- Hison, G. & Williams, P. H. Adhesins of pathogenic *Escherichia coli*. In: Hopwood, D. A. & Chater, K. E. Genetics of bacterial diversity. cap.14, pp.287-307. London, Academic Press, 1989.
- Hoefer Scientific Instruments. Hoefer Electrophoresis Catalog and Exercises (1990-1991). San Francisco, 1990.
- Holmgren, J. Comparison of the tissue receptors for *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins by means of gangliosides and natural cholerae toxoid. Infect. Immun., 8: 851-59, 1973.

- Holmgren, J.; Fredman, P.; Lindbald, M.; Svennerholm, A. M. & Svennerholm, L. Rabbit intestinal glycoprotein receptor for *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin lacking affinity for cholerae toxin. Infect. Immun., 38: 424-33, 1982.
- Homes, T. K.; Twiddy, E. M. & Pickett, C. L. Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun., 53: 464-73, 1986.
- Huges, J. M.; Murad, F.; Chang, B & Guerrant, R. L. Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. Nature, 271: 755-6, 1978.
- Jackson, M. P.; Neill, R. J.; O'Brien, A. D.; Holmes, R. K. & Newland, J. W. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Letters, 44: 109-114, 1987.
- Jayappa, H. G.; Goodnow, R. A. & Geary, S. J. Role of *Escherichia coli* type I pilus in colonization of porcine ileum and its protective nature as a vaccine antigen in controlling colibacillosis. Infect. Immun., 48: 350-4, 1985.
- Jerse, A. E.; Yu, J.; Tall, B. D. & Kaper, J. B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 7839-43, 1990.
- Johnson, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clin. Microbiol. Rev., 4: 80-128, 1991.
- Johnson, W. M.; Lior, H. & Bezanson, G. S. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis in Canada. The Lancet, I: 76, 1983.

- Karmali, M. A.; Petric, M.; Corazon, L.; Fleming, P. C.; Arbus, G. S. & Lior, H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin producing *Escherichia coli*. J. Infect. Dis., 151: 775-82, 1985.
- Karmali, M. A.; Petric, M.; Lim, C.; Flirming, P. C. & Steele, B. T. *Escherichia coli* cytotoxin, hemolytic uremic syndrome, and hemorrhagic colits. Lancet, 2: 1299-1300, 1983.
- Kauffman, F. The errology oj the coli group. J. Immunol., 57: 71-100, 1947 *apud* Levine, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J. Infect. Dis., 155(3): 337-389, 1987.
- Kauffman, F. & Vahlne, G. Ueber die Bedeutung des serologischen Formenwechsels für die Bakteriophagen-wirkung in der Coli-Gruppe. Acta. Pathol. Microbiol. Scand., 22(B): 119-37, 1946 *apud* Gaastra, W. & DeGraaf, F. K. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive eneterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Microbiol. Rev., 46: 129-161, 1982.
- Klemm, P.; Birthe, J.J.; Die, I. van; Ree, H. & Bergmans, H. The fim genes responsable for synthesis of type I fimbriae in *Escherichia coli*, cloning and genetic organization. Mol. Gen. Genet., 199: 410-14, 1985.
- Klemm, P.; Orskov, I. & Orskov, F. F7 and type-I-like fimbriae from three *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections: protein chemical and immunological aspects. Infect. Immun., 36: 462-8, 1982.
- Klipstein, F. A.; Engert, R. F. & Clements, J. D. Development of a vaccine of cross-linked heat-stable and heat-labile enterotoxins that protects against *Escherichia coli* producing either enterotoxin. Infect. Immun., 37: 550-7, 1982.

- Laemmli, U. K. cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685, 1970.
- Leffer, H. & Svanborg-Eden, C. Glycolipid receptors for uropathogenic *Escherichia coli* on human erythrocytes and uroepithelial cells. Infect. Immun., 34: 920-9, 1981.
- Leite, D. S. Isolamento, purificação e caracterização de um novo fator de colonização (F42) de *Escherichia coli* enterotoxigênica de origem suína. Tese de mestrado apresentada à Universidade Estadual de Campinas, 1986.
- Leite, D. S.; Yano, T. & Pestana A. F. C. Production, purification and partial characterization of a new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol., 139: 295-306, 1988.
- Levine, M. M. *Escherichia coli* infections. In: Bacterial vaccines. cap.7, pp.187-235. London, Academic Press, 1984.
- Levine, M. M. *Escherichia coli* infections. New England J. Med., 313: 445-7, 1985.
- Levine, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J. Infect. Dis., 155(3): 337-389, 1987.
- Levine, M. M. & Edelman, R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. Epidemiol. Rev., 6: 31-51, 1984.
- Levine, M. M.; Fereccio, C.; Black, R. E.; Germanier, R. & Chilean Typhoid Committee. Large-scale field trial of Ty21a live oral vaccine in enteric coated capsule formulation. Lancet, I: 1049-52, 1987.

- Levine, M. M.; Nataro, J. P.; Karch, H.; Baldini, M. M.; Kaper, J. B.; Black, R. E.; Clements, M. L. & O'Brien, A. D. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. J. Infect. Dis., 152: 550-9, 1985.
- Manning, P. A.; Timmis, K. N. & Stevenson, G. Colonization factor antigen II (CFA/II) of enterotoxigenic *Escherichia coli*: molecular cloning of the CS3 determinant. Molecular and General Genetics, 200: 322-327, 1985.
- Marques, L. R. M.; Peiris, J. S. M.; Cryz, S. J. & O'Brien, A. D. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. FEMS Microbiol. Letters, 44: 33-8, 1987.
- Mathewson, J. J.; Johnson, P. C.; DuPont, H. L.; Morgan, D. R.; Thornton, S. A.; Wood, L. V. & Ericson, C. D. A newly recognized cause of travelers' diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*. J. Infect. Dis., 151: 471-5, 1985.
- Mathewson, J. J.; Johnson, P. C.; DuPont, H. L.; Satterwhite, T. K. & Winsor, D. K. Pathogenicity of enteroadherent *Escherichia coli*. J. Infect. Dis., 154: 524-7, 1986.
- Matsuidara, P. T. & Burgess, D. R. Partial reconstruction of the microvillus core bundle: characterization of villin as a Ca^{+2} dependent actin-bundlin/depolymerizing protein. J. Cell. Biol., 92: 648-56, 1982.
- Maurelli, A. & Sansinetti, P. J. Genetics determinants of *Shigella* pathogenicity. Ann. Rev. Microbiol., 42: 127-50, 1988.
- Maurer, L. & Ondorff, P. E. Identification and characterization of genes determining receptor binding and pilus length of *Escherichia coli* type I pili. J. Bacteriol., 169: 640-5, 1987.

- Meas, R.; Silva, R. M.; Gomes, T. A. T.; Trabulsi, L. R.; Maas, W. K. Detection of genes for heat-stable enterotoxin I in *Escherichia coli* strains isolated in Brazil. Infect. Immun., 49: 46-51, 1985
- Merson, M. H.; Orskov, F.; Orskov, I.; Sack, R. B.; Hug, I & Koster, F. T. (1979). Infect. Immun., 23: 325-29.
- Meyers, J. A.; Sanches, D.; Elwell, L. P. & Falkow, S. 1976. Simple agarose electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol., 127: 1529-1537.
- Miller, J. H. Experiments in molecular biology. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.
- Mooi, F. R. & de Graaf, F. K. Molecular biology of fimbrial of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Current Topics Microbiol. Immunol., 118: 119-138, 1985.
- Mooi, F. R.; de Graaf, F. K. & Van Embden, J. D. A. Cloning, mapping and expression of the genetic determinant that encodes for the K88ab antigen. Nucleic. Acid. Res., 6: 849-65, 1979.
- Mooi, F. R.; Harms, N.; Bakker, D. & de Graaf, F. K. Organization and expression of genes involved in the production of the K88ad antigen. Infect. Immun., 32: 1155-63, 1981.
- Mooi, F. R.; Van Bruben, M.; Koopman, G.; Rossendaal, B. & de Graaf, F. K. A K88ab gene of *Escherichia coli* codes a fimbriae like protein distinct from the K88ab fimbrial adhesin. J. Bacte. Mol., 159: 482-487.
- Mooi, F. R.; Wouters, C.; Wijffjes, A. & de Graaf, F. K. Construction and characterization of mutants impaired in the biosynthesis of the K88ab antigen. J. Bacteriol., 150: 512-21, 1982.

- Moon, H. W.; Kohler, E. M.; Schneider, R. A. & Whipp, S. C. Prevalence of pilus antigens, enterotoxins types and enteropathogenicity among K88 negativ enterotoxigenic *Escherichia coli* from neonatal pigs. Infect. Immun., 27: 222-30, 1980.
- Moon, H. W.; Whipp, S. C.; Argenzio, R. A.; Levine, M. M. & Giannella, R. A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestins. Infect. Immun., 41: 1340-51, 1983.
- Morgan, R. I.; Isaacson, R. E.; Moon, H. W. & Briton, C. C. Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced diarrheal disease by vaccinating dams with purified 987 or K99 pili: Protection correlates with pilus homology of vaccine and challenge. Infect. Immun., 22: 771-7, 1978.
- Morris, J. A.; Thorns, C; Scott, A. C.; Sojka, W. J. & Wells, G. A. Adhesion in vitro and in vivo associated with an adhesive antigen (f41) produced by a K99 mutant of the reference strain *Escherichia coli* B41. Infect. Immun., 36:1146-1153, 1982.
- Morris, J. A.; Thorns, C. J. & Sojka, J. Evidence for two adhesive antigens on the K99 reference strain *Escherichia coli* B41. J. Gen. Microbiol., 118: 107-113, 1980.
- Moseley, S. L.; Dougan, G.; Schneider, R. A.; Moon, H. W. cloning of chromosomal DNA encoding the F41 adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli* and genetic homology between adhesins F41 and K88. J. Bacteriol., 167(3):779-804, 1986.
- Moseley, S. L.; Hardy, J. W.; Huq, M. I.; Escheverria, P. & Falkow, S. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun., 39: 1167-74, 1983.

- Nagy, B.; Moon, H. W. & Isaacson, R. E. Colonization of porcine small intestine by *Escherichia coli*: Ileal colonization and adhesion by pig enteropathogens that lack K88 antigen and by some acapsular mutants. Infect. Immun., 13: 1214-1220, 1976.
- Nataro, J. P.; Baldini, M. M.; Kaper, J. B.; Black, R. E.; Bravo, N. & Levine, M. M. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. J. Infect. Dis., 152: 560-65, 1985.
- Norgreen, M.; Normak, S.; Lark, N.; O'Hanley, P.; Schoolnik, G.; Falkow, S.; Svenborg-Eden, C.; Baga, M. & Uhlin, B. E. Mutations in *Escherichia coli* cistrons affectin adhesion to human cells do not abolish Pap pili fiber formation. EMBO J., 3: 1159-65, 1984.
- O'Brien, A. D. & Holmes, R. K. Shiga and Shiga-like toxins. Microbiol. Rev., 51: 206-20, 1987.
- O'Brien, A. D.; Lively, T. A.; Chen, M. E.; Rothman, S. W. & Formal, S. B. *Escherichia coli* 0157:H7 strains associated with hemorrhagic colits in the United States produced a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like citotoxin. Lancet, I: 702, 1983.
- O'Brien, D. A.; Newland, J. W.; Miller, S. F.; Holmes, R. K.; Smith, H. W. & Formal, S. B. Shiga-like toxin cconverting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colits of infantile diarrhea. Science, 226: 694-96, 1984.
- Ofek, I.; Beachey, E. H. General concepts and pricioles of bacterial adherence in animals and man. In: Beachey, E. H. Receptors and recognition. Series B, vol.6. Bacterial adherence. London, Chapman & Hall, 1-29, 1980.
- Ondorff, P. E.; Spears, P. A.; Schauer, D. & Falkow, S. Two models of control of *pilA*, the gene encoding type 1 pilin in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 164: 321-330, 1985.

- Orskov, I. & Orskov, F. (1977). Med. Microbiol. Immunol., 163: 99-110.
- Orskov, F.; Orskov, I.; Evans, D. J.; Sack, D. A & Wadstrom, T. (1976). Med. Microbiol. Immunol., 162: 73-80.
- Orskov, I.; Orskov, F.; Smith, H. W.; Sojka, W. J. The establishment of K99, a thermolabile, Transmissible *Escherichia coli* K antigen, previously called "Kco", possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. Acta Pathol. et. Microbiol. Scand. [Section B], 83: 31-6, 1975.
- Orskov, I.; Orskov, F.; Sojka, W. J.; Leach, J. M. Simultaneous occurrence of *E. coli* B and L antigens in strains from diseased swine. Acta. Pathol. et. Microbiol. Scand., 53: 404-22, 1961.
- Overall, 1970 *apud* Levine, M. M. *Escherichia coli* infections. In: Bacterial vaccines. cap.7, pp.187-235. London, Academic Press, 1984.
- Pickett, C. L.; Twiddy, E. M.; Belisle, B. W. & Holmes, R. K. Cloning of genes that encode a new heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 165: 348-52, 1986.
- Pickett, C. L.; Weinstein, D. L. & Holmes R. K. Genetics of type IIa heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* operon fusions, nucleotide sequences, and hybridizations studies. J. Bacteriol., 159: 5180-87, 1987.
- Polotsky, Y. U. E.; Dragunskaya, E. M.; Seliverstova, V. G.; Avdeeva, T. A.; chakhutinskaya, M. G.; Kétyi, I.; Vertényi, A.; Ralovich, B.; Emody, L.; Málovics, I.; Safanova, N. V.; Snigirevskaya, E. S. & Karyagina, E. L. Pathogenic effect of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Escherichia coli* causing infantile diarrhoea. Acta. Microbiol. Hung., 24: 221-36, 1977.

- Remis, R. S.; MacDonald, K. L.; Riley, L. W.; Puhr, N. D.; Wells, J. D.; Davis, B. R.; Blake, P. A. & Cohen, M. L. Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* 0157:H7. Ann. Intern. Med., 101: 624-6, 1984.
- Riley, L. W.; Remis, R. S.; Helgersen, 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. Hemorrhagic colitis associated with rare *Escherichia coli* serotypes. N. Engl. J. Med., 308: 681-85, 1982.
- Roberts, J. A.; Kaack, B.; Korhonen, T. K.; Kallenius, G.; Swenson, S. B. & Windberg, J. Protection against pyelonephritis by immunization with bacterial fimbriae of *Escherichia coli* in the primate model [abstract N°243]. In: Proceedings of the 7th International Congress on Infections and Parasitic Disease, Stockholm, 1982.
- Roosendal, B.; Gaastra, W. & de Graaf, F. K. The nucleotide sequence of the gene encoding the K99 subunit of enterotoxigenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Letters, 22: 253-58, 1984.
- Rothbaum, R.; McAdams, A. J.; Gianella, R. & Partin, J. C. A clinicopathologic study of enterocyte-adherent *Escherichia coli*: a cause of protracted diarrhea in infants. Gastroenterol., 83: 441-54, 1982.
- Rutter, J. M. & Jones, G. W. Protection against enteric diseases caused by *Escherichia coli*- a model of vaccination with a virulence determinant? Nature, 242: 531-2, 1973.
- Salit, I. E. & Gotschich, E. C. Type I *Escherichia coli* pili: Characterization of binding to monkey kidney cells. J. Exp. Med., 146: 1182-94, 1977.

- Salit, I. E.; Vavougios, J. & Hofmann, T. Isolation and characterization of *Escherichia coli* pili from diverse clinical sources. Infect. Immun., 42: 755-62, 1983.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. & Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York, Cold Spring Harbour Press, 1989.
- Scaletsky, I. C. A.; Silva, M. L. M. & Trabulsi, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to Hela cells. Infect. Immun., 45: 534-536, 1984.
- Scotland, S. M.; Smith, H. R. & Rowe, W. Two distinct toxins active in Vero cells from *Escherichia coli* 0157:H7. Lancet, II: 885-86, 1985.
- Scotland, S. M.; Smith, H. R.; Willshaw, G. H. & Rowe, B. Vero cytotoxin production in strain of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage. The Lancet, II: 216-24, 1983.
- Schuuring, C. New era vaccination. Nature, 296: 792, 1982.
- Shimonishi, Y.; Hidaka, Y.; Koizumi, M.; Hane, M.; Aimoto, S.; Takeda, T.; Miwatani, T. & Takeda, Y. Mode of disulfide bond formation of a heat-stable enterotoxin (STh) produced by a human strain of enterotoxigenic *Escherichia coli*. FEBS Letter, 215: 165-70, 1982.
- Shipley, P. L.; Douglan, G. & Falkow, S. Identification and cloning of the genetic determinant that encodes for the K88ac adherence antigen. J. Bacteriol., 145: 920-5, 1981.
- Silveira, W. D. 1986. Estudo plasmidial em Amostras enterotoxigênicas de *Escherichia coli* produtoras do novo fator de colonização F42. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP). Ribeirão Preto S.P.

- Smith, H. W. & Linggood, M. A. Further observations on *Escherichia coli* enterotoxins with particular regard to those produced by atypical piglet strains and by calf and lamb strains: the transmissible nature of these enterotoxins and of a K antigen possessed by calf and lamb strains. J. Med. Microbiol., 5: 243-50, 1972.
- Smith, W. H.; Green, P. & Parsell, Z. Vero cells toxin in *Escherichia coli* and related bacteria: transfer by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens and pigs. J. Gen. Microbiol., 129: 3121-37, 1983.
- Smith, N. W. & Sack, R. B. Immunologic cross-reactions of enterotoxins from *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. J. Infect. Dis., 127: 164-70, 1973.
- Smith, H. R.; Scotland, S. M.; Chart, H. & Rowe, W. Vero cytotoxin production and presence of VT genes in strains of *Escherichia coli* and *Shigella*. FEMS Microbiol. Letters., 42: 173-77, 1987.
- Smith, H. R.; Scotland, S. M. & Rowe, B. Plasmid that code for the production of colonization factor antigen II a 1 enterotoxin production in strains of *Escherichia coli*. Infect. Immun., 40: 1236-1239, 1983.
- Sojka, W. J.; Wray, C. & Morris, J. A. Passive protection of lambs against experimental enteric colibacillosis by colostral transfer of antibodies from K99-vaccinated ewes. J. Med. Microbiol., 11: 493-6, 1978.
- So, M. & Macarthy, B. J. Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Proc. Natl. Sci. USA. 77: 4011-15, 1980.

- Spicer, E. K. & Noble, J. A. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin-nucleotide sequence of the A subunit gene. J. Biol. Chem., 257: 5716-21, 1982.
- Strim, S.; Orskov, I. & Orskov, F. K88, an episome-determinant protein antigen of *Escherichia coli*. Nature, 290: 507-8, 1968.
- Thomas, L. V.; Cravioto, A.; Scotland, S. M. & Rowe, B. New fimbrial antigenic type (E8775) that may represent a colonization factor in enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans. Infect. Immun., 35: 1119-1124, 1982.
- Thompson, M. R. & Gianella, R. A. Revised amino acid sequence for a heat-stable enterotoxin produced by an *Escherichia coli* strain (18D) that is pathogenic for humans. Infect. Immun., 47: 834-36, 1985.
- Tsujii, T.; Joya, J. E.; Yao, S.; Honda, T. & Miwatani, T. Purification and characterization of heat-labile enterotoxin isolated from chicken enterotoxigenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett., 52: 79-84, 1988.
- Tzipori, S.; Wachsmuth, I. K.; Chapman, C.; Birner, R.; Brinttngam, J.; Jackson, C. & Hogg, J. The pathogenesis of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* 0157:H7 in gnotobiotic piglets. J. Infect. Dis., 154: 712-26.
- Ulshen, M. H. & Rollo, J. L. Pathogenesis of *Escherichia coli* gastroenteritis in man: another mechanism. N. Engl. J. Med., 302: 99-101, 1980.
- Van Die, I.; Van Megen, I.; Hoehstra, W. & Bergans H. Molecular organization of the genes involved in the production of fimbrial, causing manose resistant hemagglutination of a uropathogenic *Escherichia coli* 06:H1:F7 strains. MGG, 194: 528-33, 1989.

- Van Die, I.; Wauben, M.; Van Megen, I.; Bergmans, H et alii.
Genetic manipulation of major P-fimbrial subunits and
consequences for formation of fimbriae. J. Bacteriol.,
170(12): 5870-6, 1988.
- Van Embden, J. D. A.; de Graaf, F. K.; Schouls, L. M. & Teppema,
J. S. Cloning and expression of a desoxirribonucleic acid
fragment that encodes for the adhesive antigen K99. Infect.
Immun., 29: 1125-33, 1980.
- Wanger, A. R.; Murray, B. E.; Echeverria, P.; Mathewson, J. J. &
DuPont, H. L. Enteroinvasive *Escherichia coli* in travelers
diarrhea. J. Infect. Dis., 158: 640-2, 1988.
- Watanabe, T. 1963. Infective heredity of multiple drug resistance
in bacteria. Bacteriol. Rev., 27: 87-115.
- Whipp, S. G.; Moon, H. W. & Argenzio, R. A. Comparison of
enterotoxigenic activities of heat-stable enterotoxins from class
1 and class 2 *Escherichia coli* of swine origin. Infect.
Immun., 31: 245-51, 1981.
- Willshaw, G. A.; Smith, H. R.; McConnell, M. M. & Rowe, B.
Expression of cloned plasmid regions encoding colonization
factor antigen I (CFA/I) in *Escherichia coli*. Plasmid, 13:
8-16, 1985.
- Willshaw, G. A.; Smith, H. R.; McConnel, M. M. & Rowe, B. Clone
of genes encoding coli-surface antigens in enterotoxigenic
Escherichia coli and development of specific DNA probes.
Abstracts of the 109th Meeting of the Society for general
Microbiology, Durham, p.28, 1987.
- Willshaw, G. A.; Smith, H. R.; MacConnel, M. M. & Rowe, B.
Cloning of genes encoding coli-surface (CS) antigens in
enterotoxigenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett., 49:
473-78, 1988.

- Willshaw, G. A.; Smith, H. R. & Rowe, B. Cloning of regions encoding colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Letters, 16: 101-6, 1983.
- Yamamoto, T.; Gojobori, T. & Yokota, T. Evolutionary origin of pathogenic determinants in enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* O1. J. Bacteriol., 169: 1352-7, 1987.
- Yano, T.; Leite, D. S.; Camargo, I. J. B. & Castro, A. F. P. A probable new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. Microbiol. Immunol., 30: 495-508, 1986.