

BC/17513
IB/81016



UNICAMP

T/UNICAMP

M523_c

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

SERGIO DE MENDONÇA

CLONAGEM MOLECULAR DO GENE *faeG* (K88ab) COMO
PROVÁVEL CARREADOR DE GENES RESPONSÁVEIS PELA
EXPRESSÃO DE EPÍTOPOS ANTIGÊNICOS DE INTERESSE
VETERINÁRIO.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Sergio de Mendonça
e aprovada pela Comissão Julgadora.
[Assinatura] 16/05/94

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 Dias da Silveira

Campinas - SP

1994

UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	
T/UNICAMP	
MS23C	
V.	17.513
QUANTO A	286194
	0 X
R\$	11.00
	23108194
N.º LPO	

CM-00059994-6 ✓

03/11/94
MOCALCO de Manutenção

DEDICO

**Aos meus pais Américo (*in memoriam*) e Norbinda,
pelo amor, incentivo e ensinamentos de
honestidade, confiança e coragem frente aos
desafios.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira, pela orientação, amizade, dedicação e importante participação na minha formação científica.

Aos meus irmãos José Américo e Ana Cristina, pelo apoio e por compreenderem o distanciamento do convívio familiar, que meu trabalho em muitos momentos me impôs.

À Luciana, sempre a meu lado nos bons e maus momentos, pelo carinho essencial, otimismo, incentivo e fundamental auxílio na redação desta Tese.

Ao Prof. Dr. Claudio Luiz Messias, pelas sugestões, apoio e participação como membro da banca examinadora desta dissertação.

À Prof^a. Dr^a. Lucila Costallat Ricci, pela colaboração, amizade e excelentes sugestões como membro da banca examinadora desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, pela sua contribuição fundamental para a realização deste trabalho, seja pelas sugestões como membro da pré-banca examinadora, seja cedendo seu laboratório e equipamento; mas principalmente pela amizade e bom humor que tanto me incentivaram.

Aos Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, Clarice Ams, Marlene Braide Serafim e principalmente Maria Sílvia Vicari Gatti, pela agradável convivência, amizade e colaboração na utilização de seus laboratórios.

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro, pelo apoio direto ou indiretamente e pela importância fundamental na formação do grupo de pesquisadores do Departamento de Microbiologia desta Universidade.

Aos Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo, Sergio Marangoni e Yoko Bomura Rosato pela importância de seus cursos em minha formação profissional e por me ajudarem a desenvolver uma visão crítica da ciência.

Aos Prof. Dr. Sergio Marangoni, Mary Anne Heidi Dolder e Anete Pereira de Souza pela excelente colaboração como membros da banca de qualificação e inestimáveis sugestões.

A Prof^a. Dr^a. Yoko Bomura Rosato, pela perfeita coordenação do curso de pós-graduação, incentivando a discussão democrática com o objetivo de aperfeiçoá-lo para formar pesquisadores cada vez mais capacitados.

Aos Professores Paulo Arruda e Adilson Leite por permitir a utilização de seus laboratórios e equipamentos e inestimável auxílio científico, direta ou indiretamente.

A Prof^a. Dr^a. Shirlei Maria Recco Pimentel, pela permissão de utilização de seu laboratório e pelo apoio, amizade, confiança e bom humor que sempre demonstrou.

Ao amigo Edmyr Rosa Reis, pelos ótimas conversas e apoio, principalmente na produção de anti-soro.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular Bacteriana, Fabiana, Marcelo Brochi, Paulo Moretti, Paulo Afonso, Patricia, Cristiana, Marcelo Palma, Edmyr, Vanessa, Cleide, Gilson, e Enelda, pela agradável convivência, apoio, amizade, discussões e ótimas sugestões.

Às amigas Stella, Isildinha, Paula e Mirthes, pela amizade, colaboração e animadas conversas.

Às secretárias Cleide, Lúcia, Sílvia e Tereza, pela eficiência, disposição e simpatia

Aos amigos da associação de pós-graduação, Evelyn, Ricardo, Nathan, Marcio e Karen, pela oportunidade de ampliar as fronteiras nas discussões relacionadas ao desenvolvimento e objetivos da ciência no Brasil e pelo apoio, sempre que necessário.

Aos novos amigos da Biologia, especialmente ao Marcelo (Valinhos), Jonas, Geórgia, Edmilson e Gonçalo, com quem aprendi muito em nossas discussões e trocas de idéias e que têm sido tão importante pelo companheirismo e estímulo nos momentos difíceis.

Aos amigos de muitos anos, André, Cleide, Paulo Oliveira, Marcos, Mauro e Rudl, de quem nesta caminhada recebi tanta alegria e ensinamentos e que não podem ser apagados nem pelo distanciamento a que, em muitos momentos, a vida nos obrigou.

Aos meus amigos Fernando Freitas e Marcelo Brochi, pela alegria, otimismo, apoio e pelas constantes e animadas conversas que amenizaram os obstáculos do longo caminho.

A Mônica Barbosa de Mello, pela sua força e amizade.

A memória do Professor e amigo Renato Bonatelli Jr., pelas valiosas lições que nossas conversas me propiciaram. Seu exemplo de espírito científico e de humildade estarão sempre comigo.

Ao mestre Avelino Rodrigues Oliveira, pelo bem sucedido trabalho de gerir jovens cientistas, sempre admirando e motivando seus alunos como um artesão que contempla seu trabalho.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. CARACTERÍSTICAS DE <i>Escherichia coli</i>	3
2.1 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica para animais	4
2.1.1. Enterotoxinas	4
2.1.1.1. Enterotoxina termo-lábil LT	5
2.1.1.2. Enterotoxina termo-estável ST	6
2.1.2. Fatores de colonização	7
2.1.2.1. A fímbria K88	11
2.2. Infecção por <i>Escherichia coli</i> em suínos	17
2.3. Desenvolvimento de vacinas	18
2.3.1. Bacterinas, toxóides e atenuação	18
2.3.2. Tecnologia do DNA recombinante	20
2.3.3. Atenuação de <i>Salmonella</i>	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Plasmídios e linhagens bacterianas	24
3.2. Meios de cultura	27
3.3. Soluções de uso geral	28
3.4. Extração de DNA plasmidial	28
3.4.1. Extração de DNA plasmidial em pequena escala	28
3.4.2. Amplificação de DNA plasmidial	29
3.4.3. Extração de DNA plasmidial em grande escala	30
3.5. Quantificação de DNA por espectrofotometria	30
3.6. Clonagem molecular	31
3.6.1. Digestão de DNA com enzimas de restrição	31
3.6.2. Desfosforilação de DNA do vetor plasmidial	32

3.6.3. Clonagem molecular do gene <i>faeG</i>	32
3.6.4. Clonagem molecular para correção da orientação do gene <i>faeG</i>	33
3.6.5. Deleção sítio específica pelo preenchimento com Klenow DNA polimerase	33
3.6.6. Colocação de "linker" para restabelecimento do sítio de restrição <i>HindIII</i>	34
3.7. Purificação de DNA plasmidial.	34
3.7.1. Purificação de DNA plasmidial através de extração com fenol : clorofórmio : álcool isoamílico	34
3.7.2. Purificação de DNA plasmidial pelo kit "Magic™ DNA clean-up system" (Promega).....	35
3.7.3. Purificação de fragmentos de DNA pelo kit "Gene Clean™"(Bio 101Inc)	35
3.8. Transformação bacteriana.	36
3.8.1. Preparo de células competentes	36
3.8.2. Adição de DNA às células competentes.....	37
3.9. Extração de proteínas	37
3.9.1. Extração de proteínas bacterianas totais	37
3.9.2. Extração de proteínas bacterianas de superfície	38
3.9.3. Precipitação de proteínas do sobrenadante de cultura bacterianas.....	39
3.10. Eletroforese	39
3.10.1. Eletroforese de DNA plasmidial em gel de agarose	39
3.10.2. Eletroforese de proteínas em gel de poliácridamida-SDS (PAGE-SDS)	40

3.10.2.1. Coloração de géis de poliacrilamida-SDS	
pela impregnação com prata	41
3.11. Sequenciamento de DNA	42
3.11.1. Reação de desnaturação	43
3.11.2. Reação de anelamento do "primer"	43
3.11.3. Reação de sequenciamento	43
3.11.4. Preparo de gel de poliacrilamida	44
3.11.5. Eletroforese vertical de DNA em gel de acrilamida	45
3.12. Produção de anti-soro policlonal em coelhos	45
3.13. Absorção de anti-soro policlonal	46
3.14. Soroaglutinação de bactérias <i>Escherichia coli</i>	47
3.15. "Western blot"	47
4. RESULTADOS	49
4.1. Determinação dos sítios de restrição adequados	
para clivagem de parte do fragmento <i>faeG</i>	49
4.2. Purificação do fragmento referente ao gene <i>faeG</i>	49
4.3. Clonagem do fragmento de 778-pb referente ao gene	
<i>faeG</i> no vetor plasmidial pUC18 e análise de transformantes	52
4.4. Sequenciamento nucleotídico de parte do fragmento de 778-pb	
(<i>faeG</i>) inserido no plasmídeo pSM1	54
4.5. Construção do plasmídeo pSM2 com o fragmento de 778-pb	
(<i>faeG</i>) na orientação correta	55
4.6. Deleção sítio específica por digestão enzimática e	
tratamento com Klenow DNA polimerase	55
4.7. Inserção do "linker" <i>HindIII</i> no plasmídeo pSM3	56
4.8. Produção de anti-soro policlonal	57
4.9. Absorção do anti-soro policlonal	57

4.10. "Western blot"	59
5. DISCUSSÃO	62
6. PERSPECTIVAS	68
7. RESUMO	69
8. SUMMARY	71
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Características de fimbrias de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica isolada de animais, quanto ao sorogrupo, toxinas relacionadas e hemaglutinação	8
Tabela 2. Características de fimbrias de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica isolada de animais, quanto a morfologia, peso molecular, localização genética e hospedeiro	8
Tabela 3. Propriedades dos polipeptídeos da fimbria K88ab e o efeito da mutação nos genes do operon K88ab	13
Tabela 4. Plasmídios utilizados	24
Tabela 5. Linhagens de <i>Escherichia coli</i> utilizadas	25
Tabela 6. Soluções para a preparação de gel de poliácridamida-SDS	41
Tabela 7. Sequência de soluções para a impregnação de PAGE-SDS com prata	42
Figura 1. Modelo proposto para a biogênese da fimbria K88ab	14
Figura 2. Mapa genético do operon da fimbria K88ab clonado no plasmídio pFM205	15
Figura 3. Sequência nucleotídica e de aminoácidos correspondentes ao gene <i>fæG</i> . Inclui as regiões de peptídeo sinal, 16s ribossômico, "TATA BOX" (região promotora) e principais sítios enzimáticos utilizados neste trabalho	16
Figura 4. Mapa físico do plasmídio pFM205	25
Figura 5. Mapa físico dos plasmídios pUC18 e pUC19	26

Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1,2% dos plasmídios pBR322 e pFM205 clivados com enzimas de restrição para determinação do fragmento <i>faeG</i>	50
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1,2% para determinação da eficiência de purificação do fragmento <i>faeG</i>	51
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1% para demonstração da ligação do fragmento <i>faeG</i> ao vetor pUC18	53
Figura 9. Sequência nucleotídica obtida de parte do fragmento de 778-pb (<i>faeG</i>), a partir do "primer" universal clonado no plasmídio pSM1	54
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1,4% para demonstração da clonagem do fragmento de 778-pb (<i>faeG</i>) nos plasmídios pSM1, pSM2, pSM3 e pSM4 construídos, deleção sítio específica <i>HindIII</i> e adição de "linker" <i>HindIII</i>	58
Figura 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12,5% para demonstração do padrão de proteínas transferidas para filtro de nitrocelulose.....	60
Figura 12. "Western blot" das proteínas separadas por gel de poliacrilamida-SDS reconhecidas por anti-soro anti-FaeG policlonal absorvido	61
Figura 13. Modelo esquemático demonstrando a estratégia utilizada na construção dos plasmídios pSM1, pSM2, pSM3 e pSM4 na clonagem do fragmento de 778-pb (<i>faeG</i>) que codifica a subunidade principal da fimbria K88ab	64

1. INTRODUÇÃO

A bactéria *Escherichia coli* é o microrganismo anaeróbico facultativo predominante na flora normal de mamíferos e aves, desempenhando importante papel na manutenção da fisiologia intestinal (Drasar & Hill, 1974). Entretanto, algumas linhagens podem apresentar fatores de virulência, tornando-se muitas vezes patogênicas ao hospedeiro.

O grupo de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) é um dos agentes infecciosos principais nas diarreias humanas e de animais, provocando cerca de um terço dos casos em leitões recém-nascidos (Soderling & Mollby, 1978). A patogenicidade destas amostras está ligada a produção de diferentes fatores de virulência como fimbrias e toxinas. Uma das fimbrias mais comuns encontradas em ETEC enterotoxigênicas (ETEC) para suínos é a K88 (F4). Dentre as toxinas associadas a esta infecção, a termo-estável e pouco imunogênica ST-I é predominante (Gaastra & de Graaf, 1982).

O controle da infecção causada por este tipo de patógeno têm sido feita através de vacinação com bactérias mortas (bacterinas), bactérias atenuadas por métodos físico-químicos ou pela inoculação de toxinas antigênicas importantes na patogenicidade, purificadas e modificadas (toxóides). Entretanto, os resultados obtidos demonstraram que estes métodos são pouco eficientes (Isaacson, 1985; Porter *et al.*, 1974).

O estudo molecular dos mecanismos de patogenicidade e fatores de virulência aliado ao aprimoramento de técnicas que permitem a manipulação gênica, levou a uma nova abordagem no desenvolvimento de vacinas. A construção de sistemas carreadores de epítopos antigênicos e a utilização de linhagens molecularmente atenuadas são apenas dois dos caminhos mais promissores para o desenvolvimento de vacinas imunogenicamente mais eficientes e certamente mais seguras.

Nos principais centros de desenvolvimento de vacinas do mundo, estudos já permitiram grandes avanços na construção de sistemas carreadores e na atenuação molecular de algumas espécies de bactérias, como por exemplo *Vibrio cholera* e espécies do gênero *Salmonella* (Chatfield *et al.*, 1989).

Este trabalho, que é parte de um projeto desenvolvido pelo laboratório de Biologia Molecular Bacteriana, do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, teve por objetivo a clonagem do gene *faeG*, responsável pela codificação da subunidade principal da fímbria K88ab (F4). Esta construção visa a possibilidade de futura inserção de sequências nucleotídicas, responsáveis pela expressão de proteínas de interesse médico-veterinário, com conseqüente produção de uma proteína híbrida capaz de estimular resposta imunológica a estes fatores de virulência bacterianos.

2. CARACTERÍSTICAS DE *Escherichia coli*

O bacilo gram-negativo *Escherichia coli* (Escherich, T., 1885), pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é o anaeróbico facultativo predominante na flora bacteriana normal de mamíferos e aves, desempenhando importante papel na manutenção da fisiologia intestinal (Drasar & Hill, 1974). Entretanto, algumas linhagens podem apresentar fatores de virulência tornando-se muitas vezes patogênicas ao hospedeiro.

A superfície da bactéria *Escherichia coli* possui substâncias que estimulam reações imunológicas e que são, normalmente, utilizadas para a identificação sorológica da amostra e possibilidade de diferenciação entre linhagens patogênicas e não patogênicas. Estas substâncias mais comuns são os antígenos O e H. Os antígenos somáticos O são lipopolissacarídeos termoestáveis complexos constituintes da membrana externa, enquanto o antígeno flagelar H possui natureza protéica e é termosensível (Gaastra & de Graaf, 1982).

Em relação aos fatores de virulência, estes permitem às bactérias patogênicas causarem no hospedeiro tanto infecções intestinais, como diarreias agudas em mamíferos; quanto infecções extraintestinais, como cistite e pielonefrite no homem; e infecções respiratórias em aves (Levine, 1984).

As linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas podem ser classificadas em quatro categorias principais, de acordo com as características clínicas observadas nas síndromes diarreicas, propriedades de virulência, tipo de interação com a mucosa intestinal, diferenças epidemiológicas apresentadas e sorogrupos específicos. Estes grupos são: *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) e *Escherichia coli* enteroaderente (EAEC) (Mathewson, et al., 1985; 1986; Levine, 1987).

As linhagens enteropatogênicas apresentam, geralmente, algumas características, comuns mesmo quando classificadas em grupos diferentes. Estas características são: (i) os fatores de virulência principais geralmente são codificados por plasmídios, (ii) existe uma interação característica com a mucosa intestinal do hospedeiro, (iii) ocorre a produção de toxinas e (iv) as linhagens são agrupadas em determinados sorogrupos O:H (Levine, 1987).

2.1 *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÊNICA PARA ANIMAIS

O grupo das *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC) é responsável por causar diarreia em humanos e em animais recém-nascidos, principalmente em países subdesenvolvidos. Nestas áreas é comum ocorrerem duas a três infecções por ETEC por criança durante os três primeiros anos de vida. Em animais, alguns estudos revelaram que *Escherichia coli* enterotoxigênica é o agente causador de cerca de um terço das diarreias em leitões recém-nascidos (Soderling & Mollby, 1978).

A infecção por *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) ocorre através da ingestão, pelo hospedeiro, de alimentos ou água contaminados. No aparelho digestivo, estas bactérias colonizam a porção proximal do intestino delgado (Hinson & Williams, 1989) e produzem enterotoxinas responsáveis pela síndrome diarreica (Betley *et al.*, 1986).

2.1.1. ENTEROTOXINAS

As toxinas produzidas por *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) são classificadas em dois tipos: toxina termo-lábil (LT), que é inativada por aquecimento a 60°C por 30 min; e toxina termo-estável (ST), ativa mesmo após ser submetida a aquecimento de 100°C por 15 min (Smith & Gyles, 1970; Scotland, 1988).

2.1.1.1. ENTEROTOXINA TERMO-LÁBIL LT

A enterotoxina LT é uma proteína imunogênica de alto peso molecular (85 KDa a 90 KDa) composta por uma subunidade A e cinco subunidades B (Levine, 1984). A subunidade B permite a ligação da holoenzima à membrana dos enterócitos pela interação com o gangliosídeo GM1 de superfície epitelial e glicoproteínas (Holmgren, 1973; Holmgren *et al.*, 1982), enquanto a subunidade A é clivada em dois polipeptídeos sendo que um deles (A₁) tem a capacidade de estimular a adenil ciclase por sua atividade ADP ribosilante (Gill & Richardson, 1980). Devido a esta capacidade ocorre um acúmulo de AMP cíclico, o que causa uma secreção de fluidos ricos em eletrólitos pelas células da cripta e decréscimo da absorção pelas células da base das microvilosidades. O resultado desta secreção é a origem de um quadro clínico diarréico (Levine, 1984).

A enterotoxina LT é muito semelhante à toxina colérica (CT) em estrutura, atividade biológica e determinantes antigênicos e, além disso, os genes codificadores das duas toxinas mostram grande homologia (Dallas & Falcow, 1980; Clements *et al.*, 1980; Smith & Sach, 1973; Betley *et al.*, 1986; Yamamoto *et al.*, 1987).

Duas formas diferentes de LT (LT_H e LT_P) foram encontradas em bactérias isoladas do homem e suínos, respectivamente. As subunidades B das duas formas diferem em apenas 4 dos 103 resíduos de aminoácidos e as subunidades A₁ diferem em 1 dos 194 resíduos (Dykes *et al.*, 1985; Yamamoto *et al.*, 1987).

Uma forma variante de LT (LT-II) foi isolada de búfalos com diarreia na Tailândia e apresenta atividade biológica semelhante a LT-I, apesar de não apresentar neutralização por anticorpos anti-LT-I ou anti-CT (Green *et al.*, 1983; Pickett *et al.*, 1986). Os genes que codificam LT-II parecem estar localizados no cromossomo bacteriano e produzem uma proteína de peso molecular de 87 KDa composta por duas subunidades (A e B) (Pickett *et al.*, 1986; Holmes *et al.*, 1986). Recentemente, duas variantes da toxina LT-II (LT-IIa e LT-IIb) foram descritas por Guth *et al.*, 1986.

2.1.1.2. ENTEROTOXINA TERMO-ESTÁVEL ST

A toxina ST também possui dois tipos principais denominados ST-I (ou STa) e ST-II (ou STb) (Whipp *et al.*, 1981). A toxina ST-I é um pequeno polipeptídeo com imunogenicidade reduzida, a menos que esteja acoplada a uma proteína carreadora (Klipstein, *et al.*, 1982). ST-I é solúvel em metanol, ativa no modelo do camundongo recém-nascido e exerce sua atividade biológica através da estimulação da guanilato ciclase, elevando os níveis intracelulares de GMP cíclico (Hughes, *et al.*, 1978; Pickett *et al.*, 1986). Não está claro, ainda, o mecanismo pelo qual esta toxina reconhece e penetra nos enterócitos, ativando a guanil ciclase. Esta ativação, entretanto, altera a membrana dos enterócitos e resulta numa elevada secreção de fluidos com consequente diarreia (Field *et al.*, 1978).

Verificou-se, posteriormente, com a utilização de sondas específicas, que dentro do grupo ST-I existem dois tipos de toxinas: um denominado STa1 ou STap por ter sido descoberta em *Escherichia coli* patogênica para suínos e outro denominado STa2 ou STah descoberto em amostra patogênica para humanos (Moseley *et al.*, 1983).

A toxina ST-I é sintetizada como uma forma precursora de 72 aminoácidos que após a maturação, originam pequenos peptídeos que possuem 6 resíduos de cisteína e apresentam 3 pontes dissulfeto intracadeia, essenciais para a configuração tridimensional da forma ativa (Guerrant *et al.*, 1980; Chan *et al.*, 1981; Gariepy *et al.*, 1987).

As formas ativas das toxinas STah e STap são constituídas, respectivamente, por 19 e 18 resíduos de aminoácidos (Field *et al.*, 1978; Frantz *et al.*, 1984; Gariepy & Shoolnik, 1986). Essas sequências apresentam grande homologia, tendo apenas 4 aminoácidos diferentes, 3 na região amino-terminal e 1 na região carboxi-terminal; e 1 aminoácido a mais na toxina STah. A capacidade de reconhecimento de receptores e toxigenicidade parece estar relacionada aos 13 resíduos de aminoácidos da região carboxi-terminal (Gariepy *et al.*, 1986; Shimonishi *et al.*, 1982; Thompson & Gianella, 1985).

A toxina ST-II é insolúvel em metanol, ativa em alça ligada intestinal de suínos de 5 a 7 semanas e estimula a secreção intestinal por um mecanismo ainda desconhecido que não envolve alterações das concentrações de nucleotídeos cíclicos (Kennedy *et al.*, 1984; Weickel *et al.*, 1986). Quando ST-II foi analisada em ensaio com alça ligada de suínos, observou-se uma secreção ativa de bicarbonato (Weikel *et al.*, 1986). ST-II é codificada por genes plasmidiais e sintetizada como uma cadeia polipeptídica de 71 aminoácidos, sendo os 23 primeiros correspondentes a região de peptídeo sinal. Entretanto, após a maturação esta proteína fica constituída por 48 aminoácidos com um peso molecular de 5 KDa. Não foi observada homologia entre as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos de ambas as toxinas (Lee *et al.*, 1983).

2.1.2. FATORES DE COLONIZAÇÃO

Linhagens de *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC) produzem adesinas ou fatores de colonização que permitem a adesão na mucosa intestinal do hospedeiro com consequente resistência ao movimento peristáltico de limpeza (Levine, 1984).

Um tipo especial de adesinas, denominada fimbria, é composta por estruturas protéicas filamentosas ou fibrilares localizadas na superfície bacteriana (Mooi & de Graaf, 1985). As fímbrias reconhecem receptores específicos de diversas células, incluindo enterócitos e geralmente eritrócitos. A capacidade de aderir ou não a eritrócitos (hemaglutinação) de diferentes animais e do homem pode ser utilizada para identificação e classificação das diferentes fímbrias (Gaastra & de Graaf, 1982). Atualmente são conhecidos vários tipos de fímbrias com antigenicidade, peso molecular e especificidade a receptores característicos, como mostram as Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Características de fimbrias de *Escherichia coli* enterotoxigênica isoladas de animais, quanto ao sorogrupo, toxinas relacionadas e hemaglutinação

FÍMBRIA	SOROGRUPO	TOXINAS	HEMAGLUTINAÇÃO
K88 (F4)	O8, O9, O20, O45, O138, O147, O149, O157	ST, LT, ST+LT	cobaia, galinha
K99 (F5)	O8, O9, O20, O64, O101, O149	ST	cavalo, carneiro
987P (F6)	O8,O9, O20, O64, O141, O149	ST	ND ^a
F41	O9, O20, O64, O101	ST	humano, cobaia, cavalo, carneiro

^a ND, não determinado com espécies animais utilizadas

Fonte - Gaastra & de Graaf, 1982.

Tabela 2. Características de fimbrias de *Escherichia coli* enterotoxigênica isoladas de animais, quanto a morfologia, peso molecular, localização genética e hospedeiro

FÍMBRIA	MORFOLOGIA	PM ^a	LOCALIZAÇÃO	ORIGEM
Tipo1 (F1)	rigida	15700	cromossomo	animais, homem
K88 (F4)	flexível	27540	plasmídio	suínos
K99 (F5)	flexível	18200	plasmídio	suínos, bovinos,
987P (F6)	rigida	20000	cromossomo	suínos
F41	flexível	29500	cromossomo	suíno, bovino.
F42	rigida	31000	plasmídio	suínos
FY	flexível	20000	ND ^b	bovinos

^a PM, peso molecular em daltons

^b ND, não determinado

Fonte - Gaastra & de Graaf, 1982; Moon, 1990.

Fimbrias Tipo1 (F1) são encontradas nas bactérias patogênicas e não patogênicas, possuem morfologia rígida, apresentam variação de fase (Klemm, 1986), não são termoreguladas e a aglutinação de eritrócitos é inibida pelo açúcar D-manose (de Graaf, 1990).

As fimbrias hospedeiro-específicas incluem K88 (F4) (Orskov *et al.*, 1964), 987P (F6) (Nagy *et al.*, 1976), F42 (Yano *et al.*, 1986) e F165 (Fairbrother *et al.*, 1986) presentes em *Escherichia coli* isoladas de suínos; K99 (F5) (Orskov *et al.*, 1975) e F41 (de Graaf & Roorda, 1982) presentes em amostras de suínos, ovinos e bovinos; CFAI, CFACII (Evans *et al.*, 1975; Evans & Evans, 1978), CFAIII (Honda *et al.*, 1984), CFACIV (Thomas *et al.*, 1982) e o fator de colonização proposto PCF0159 (Tacket *et al.*, 1987) associadas a amostras de origem humana.

A expressão da maioria das fimbrias é regulada pela temperatura de crescimento da cultura de bactérias. Em temperaturas próximas a 37°C a maior parte das fimbrias são produzidas, enquanto a temperaturas entre 16°C e 25°C dificilmente se expressam (Mooi & de Graaf, 1985).

Algumas fimbrias de *Escherichia coli*, como Tipo1 e 987P, apresentam variação de fase, isto é, dentro de uma mesma população bacteriana que apresente estas fimbrias, algumas bactérias não as expressam devido a capacidade de inversão da região promotora, com consequente bloqueio da transcrição gênica (Hinson & Williams, 1989).

As fimbrias são compostas de várias subunidades protéicas que, após serem sintetizadas, são transportadas através das membranas e montadas na superfície celular. Geralmente 5 a 8 polipeptídeos produzidos pelo mesmo operon estão envolvidos no processamento, transporte e ancoragem das subunidades principais das fimbrias (Mooi *et al.*, 1982; Norgren *et al.*, 1984; van Die *et al.*, 1989; de Graaf *et al.*, 1984; Mooi & de Graaf, 1985).

Dois tipos morfológicamente diferentes de fimbrias são conhecidos (Levine, 1984; Levine, 1987; Mooi & de Graaf, 1985). Um tipo morfológico é representado pelas fimbrias Tipo1, CFAM, CS1, CS2, CS4, CS5, CFAMIII, F42, F165 e PCF0159 e são constituídos por filamentos protéicos rígidos, com diâmetro de aproximadamente 7 nm. O segundo tipo morfológico é representado pelas fimbrias K88, K99, F41, CS3 e CS6 que são estruturas finas e flexíveis com diâmetro entre 2 a 5 nm, chamadas fibrilas ou fimbrias fibrilares.

As fimbrias de ETEC formam um grupo funcional e estrutural relacionado que podem ter evoluído a partir de genes ancestrais comuns (Mooi e de Graaf, 1985). A estrutura primária das subunidades estruturais de algumas fimbrias foram parcialmente ou totalmente sequenciadas. Foi observada uma sequência de aminoácidos conservada em maior grau na região carboxi-terminal e, em menor grau, na amino-terminal. Estas regiões estão envolvidas, provavelmente, com funções como transporte através da membrana externa, ancoragem, ligação entre as subunidades e manutenção da estrutura. As porções centrais são mais variáveis e estão provavelmente relacionadas ao reconhecimento de diferentes receptores ou podem ter simplesmente divergido em resposta às pressões imunológicas, devido a menor importância estrutural e funcional atribuída a estas regiões (Mooi & de Graaf, 1985)

Com relação à genética molecular dos diferentes fatores de colonização presentes em amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênica, os genes responsáveis podem ser cromossômicos ou plasmidiais (de Graaf, 1990)

2.1.2.1. A FÍMBRIA K88

A fímbria K88 foi obtida a partir de amostras de ETEC patogênicas para suínos e descrita como sendo um tipo de antígeno capsular (do alemão *Kapsee*) em 1964. Os primeiros estudos já destacavam a importância deste fator na patogenicidade bacteriana e muitos esforços foram centralizados na descoberta de sua constituição, estrutura, mecanismo de ação e genética molecular.

A fímbria K88 é constituída de numerosas subunidades protéicas de aproximadamente 26 KDa, codificadas por genes plasmidiais, e com expressão dependente da temperatura (Mooi & de Graaf, 1985). A regulação por temperatura parece não atuar a nível transcricional (Bak *et al.*, 1972).

Sorologicamente, pelo menos três variantes do antígeno K88 podem ser distinguidos, K88ab, K88ac e K88ad. Estes variantes possuem em comum um determinante antigênico **a** e um diferente **b**, **c** ou **d** (Orskov *et al.*, 1964; Guinée & Jansen, 1979).

Estudos realizados por Smith & Parsell, 1975, verificaram que linhagens de *Escherichia coli* enterotoxigênicas produtoras de fímbria K88 e isoladas de suínos apresentavam a capacidade de metabolização do açúcar rafinose. Outros pesquisadores demonstraram que os genes responsáveis pela expressão da fímbria K88 eram encontrados em um plasmídio não conjugativo de 50 MDa, mobilizável por plasmídios conjugativos, próximos aos genes para utilização de rafinose (Shipley *et al.*, 1978).

O plasmídio selvagem pRI8801 de 51 MDa, contendo os determinantes genéticos da fímbria K88ab e da proteína responsável pelo metabolismo do açúcar rafinose, foi utilizado para clonagem destes determinantes no vetor pBR322. Os genes responsáveis pela produção da fímbria K88ab foram detectados em um fragmento *HindIII* de 7,7 MDa e a expressão da fímbria foi altamente dependente da orientação de clonagem do fragmento (Mooi *et al.*, 1979).

O plasmídio recombinante pFM200, contendo o fragmento *HindIII* de 7,7 MDa, foi utilizado para a construção de um plasmídio de menor tamanho (pFM205, Figura 4) por deleção "in vitro" de um fragmento *EcoRI* de 3,4 MDa. O plasmídio pFM205 não foi distinguido do pFM200 com respeito a produção de antígenos K88ab, e apresentou uma produção quatro vezes maior em relação ao plasmídio selvagem pRI8801 e trinta vezes maior quando crescido a 37°C, em comparação ao mesmo a 19°C. Este aumento da expressão pode estar relacionado ao número de cópias do plasmídio (Mooi *et al.*, 1979).

O plasmídio recombinante pFM205 possui todos os genes necessários para a produção de uma fimbria normal, entretanto não contém todos os genes do operon K88ab. A expressão neste plasmídio é dependente do promotor P_i do plasmídio pBR322, indicando que o promotor natural não foi clonado. Quando o promotor P_i foi deletado observou-se uma diminuição de 10 a 20 vezes da produção de K88ab. A pequena produção pode estar relacionada a existência de um promotor fraco localizado próximo ao gene *faeC*. Curiosamente, o operon clonado continua a apresentar uma produção de fimbria dependente de temperatura. Esta regulação parece estar relacionada com uma região de simetria localizada posteriormente ao gene *faeC* (Mooi & de Graaf, 1985).

O fragmento de DNA envolvido na biossíntese de K88ab foi estudado e contém um operon com seis genes designados *faeC* até *faeH*, precedidos de sequência peptídeo sinal (Mooi *et al.*, 1981) (Figura 2). O gene *faeG* codifica a subunidade protéica principal, enquanto os outros genes codificam proteínas necessárias para secreção e montagem das subunidades e componentes menores (Tabela 3) (Oudega *et al.*, 1989; Mooi *et al.*, 1982). A proteína FaeC é um componente menor, localizado na extremidade da estrutura (Oudega *et al.*, 1989), enquanto FaeD é uma proteína localizada na membrana externa. As proteínas FaeE e FaeF estão localizadas no espaço periplasmático (van Doorn *et al.*, 1982). A localização da proteína FaeH ainda não foi determinada.

A análise do sequenciamento nucleotídico de um clone, que contém os determinantes genéticos completos para a síntese da fimbria K88ab, revelou a existência de pelo menos outros dois genes denominados *faeB* e *faeI* localizados em região anterior ao *faeC* e posterior ao *faeH*, respectivamente (de Graaf, 1990).

Tabela 3. Propriedades dos polipeptídeos da fimbria K88ab e o efeito da mutação nos genes do operon K88ab

PROPRIEDADES			MUTAÇÃO	
POLYPEPTÍDEOS	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR	HEMAGLUTINAÇÃO	BIOGÊNESE DA FIMBRIA	FUNÇÃO PROVÁVEL
FaeC	Extracelular	não	1- sem produção de fimbria 2- acúmulo intracelular de FaeG	componente menor da fimbria K88ab
FaeD	membrana externa	não	1- sem produção de fimbria 2- acúmulo de precursores no espaço periplasmático	transporte de FaeG através da membrana externa e ancoragem da fimbria
FaeE	espaço periplasmático	não	1- sem produção de fimbria 2- degradação de FaeG e FaeH	transporte de FaeG através da membrana externa
FaeF	espaço periplasmático	não	1- transporte de FaeG através da membrana externa e montagem da fimbria reduzida 2- acúmulo de precursores no espaço periplasmático	modificações do FaeG
FaeG (principal)	extracelular	não	sem produção da fimbria	componente principal da fimbria K88ab
FaeH	espaço periplasmático	reduzida	diminuição da síntese de FaeG e da produção de fimbria	não determinada

Fonte - Mooi & de Graaf, 1985.

Um modelo para a secreção das subunidades da fimbria foi proposto com base na localização celular de cada proteína relacionada ao operon K88ab (Mooi & de Graaf, 1985; Pedersen & Andersen, 1991). Neste modelo (Figura 1), a subunidade protéica principal da fimbria K88ab (FaeG) codificada pelo gene *faeG* é transportada através de membrana interna conforme a via secretória comum das proteínas periplasmáticas. No espaço periplasmático, FaeG se associa com FaeE e adquire a conformação adequada para atravessar a membrana externa. Estes dímeros possuem baixa afinidade entre si e portanto formam multímeros que mais tarde irão facilitar a montagem da fimbria. Tais multímeros são ligados a FaeF que permite afinidade com FaeD. O complexo formado provoca uma mudança conformacional na proteína FaeG o que permite o transporte através de canais formados na proteína FaeD. Os componentes FaeE e FaeF se dissociam sendo reutilizados em outros ciclos e a conformação adquirida pela subunidade FaeG permite uma alta afinidade por outras moléculas idênticas formando a estrutura da fimbria. O componente FaeC é considerado um constituinte estrutural menor da fimbria (Figura 1).

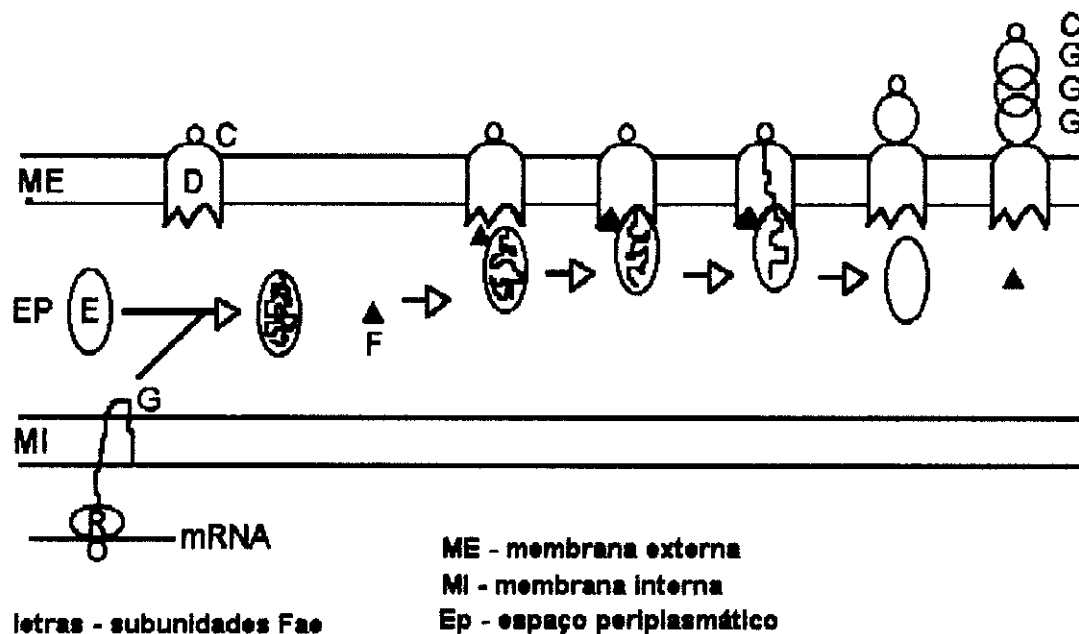


Figura 1. Modelo proposto para a biogênese da fimbria K88ab

Fonte - Mooi & de Graaf, 1985

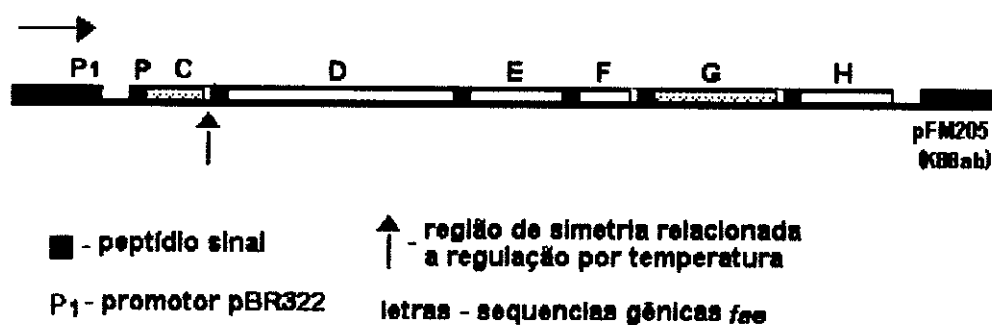


Figura 2. Mapa genético do operon da fímbria K88ab clonado no plasmídeo pFM205

Fonte - Mooi & de Graaf, 1985.

A sequência nucleotídica e os aminoácidos da proteína codificada pelo gene *faeE* foi comparada com outras, que apresentaram função semelhante nas demais fímbrias, verificando-se a existência de grande homologia. Estas proteínas fazem parte de uma mesma família de proteínas periplasmáticas (Bertin, *et al.*, 1993).

A sequência nucleotídica do gene *faeG* foi determinada e apresenta 858 nucleotídeos a partir do primeiro códon codificador (Figura 3). Os primeiros 63 nucleotídeos codificam os 21 aminoácidos da sequência peptídeo sinal e esta ainda é precedida por uma parte da região promotora (Gaastra *et al.*, 1981). A estrutura primária da subunidade principal da fímbria K88ab também teve a sua sequência de aminoácidos determinada (Klemm, 1981). O peso molecular exato dos 264 resíduos de aminoácidos da subunidade protéica principal foi calculado em 27,54 KDa (Klemm, 1981).

A subunidade principal da fímbria K88ab possui todos os 19 aminoácidos comuns, com excessão de cisteína. Portanto as forças responsáveis pela manutenção da estrutura tridimensional da fímbria são, principalmente, devido à hidrofobicidade ou interações eletrostáticas entre subunidades adjacentes (Gaastra & de Graaf, 1982).

A partir da caracterização genética e bioquímica, muitos estudos tem sido realizados com o objetivo de utilizar a estrutura de montagem da fímbria para expressar sequências peptídicas exógenas, principalmente pela substituição de regiões variáveis (Thiry, *et al.*, 1989; Pedersen & Andersen, 1991).

TTTAAACGGAGCCGCGGGGATGGTTTTACGGTAATTCGGGAAAAATAAGGGTTACCGATTTCAGTTTATTATTTGTGATATC
DraI **BstEII** **Tata Box**
Met Lys Lys Thr Leu Ile Ala Leu Ala Ile Ala Ala Ser Ala Ala Ser
AAGGGGTTTATTTT **ATG AAA AAG ACT CTG ATT GCA CTG GCA ATT GCT GCA TCT GCT GCA TCT**
16s ribossomo Peptideo Sinal
Gly Met Ala His Ala Trp Met Thr Gly Asp Phe Asn Gly Ser Val Asp Ile Gly Gly Ser
GGT ATG GCA CAT GCC **TGG ATG ACT GGT GAT TTC AAT GGT TCG GTC GAT ATC GGT GGT AGT**

Ile Thr Ala Asp Asp Tyr Arg Gln Lys Trp Glu Trp Lys Val Gly Thr Gly Leu Asn Gly
ATC ACT GCA GAT GAT TAT CGT CAG AAA TGG GAA TGG AAA GTT GGT ACA GGT CTT AAT GGA
PstI
Phe Gly Asn Val Leu Asn Asp Leu Thr Asn Gly Gly Thr Lys Leu Thr Ile Thr Val Thr
TTT GGT AAT GTA TTG AAT GAC CTG ACC AAT GGT GGA ACC AAA CTG ACC ATT ACT GTT ACT

Gly Asn Lys Pro Ile Leu Leu Gly Arg Thr Lys Glu Ala Phe Ala Thr Pro Val Ser Gly
GGT AAT AAG CCA ATT TTG TTG GGC CGA ACC AAA GAA GCA TTT GCT ACG CCA GTA AGT GGT

Gly Val Asp Gly Ile Pro Gln Ile Ala Phe Thr Asp Tyr Glu Gly Ala Ser Val Lys Leu
GCT GTA GAT GGA ATT CCT CAG ATT GCA TTT ACT GAC TAT GAA GGA GCT TCT GTA AAA CTC
EcoRI
Arg Asn Thr Asp Gly Glu Thr Asn Lys Gly Leu Ala Tyr Phe Val Leu Pro Met Lys Asn
AGA AAC ACT GAT GGT GAA ACT AAT AAA GGT TTA GCA TAT TTT GTT CTG CCG ATG AAA AAT

Ala Glu Gly Thr Lys Val Gly Ser Val Lys Val Asn Ala Ser Tyr Ala Gly Val Phe Gly
GCA GAG GGC ACT AAA GTT GGT TCA GTG AAA GTG AAT GCA TCT TAT GCC GGT GTG TTC GGG

Lys Gly Gly Val Thr Ser Ala Asp Gly Glu Leu Phe Ser Leu Phe Ala Asp Gly Leu Arg
AAA GGT GGG GTT ACT TCT GCG GAC GGG GAG CTG TTT TCG CTT TTT GCG GAC GGG TTG CGC

Ala Ile Phe Tyr Gly Gly Leu Thr Thr Thr Val Ser Gly Ala Ala Leu thr Ser Gly Ser
GCT ATC TTT TAT GGT GGT TTG ACG ACG ACT GTT TCG GGT GCT GCA CTC ACG AGT GGG AGT

Ala Ala Ala Ala Arg Thr Glu Leu Phe Gly Ser Leu Ser Arg Asn Asp Ile Leu Gly Gln
GCC GCA GCG GCG CGC ACA GAG TTG TTT GGA AGT CTA TCA AGA AAT GAT ATT CTC GGA CAG

Ile Gln Arg Val Asn Ala Asn Ile Thr Ser Leu Val Asp Val Ala Gly Ser Tyr Arg Glu
ATT CAA AGA GTA AAC GCA AAT ATT ACT TCT CTT GTT GAC GTC GCA GGT TCT TAC AGG GAA
HincII
Asp Met Glu Tyr Thr Asp Gly Thr Val Val Ser Ala Ala Tyr Ala Leu Gly Ile Ala Asn
GAC ATG GAG TAC ACT GAT GGA ACT GTT GTT TCT GCT GCC TAT GCA CTG GGT ATT GCA AAC

Gly Gln Thr Ile Glu Ala Thr Phe Asn Gln Ala Val Thr Thr Ser Thr Gln Trp Ser Ala
GGT CAG ACT ATT GAG GCA ACT TTT AAT CAG GCT GTA ACT ACC AGC ACT CAG TGG AGC GCT

Pro Leu Asn Val Ala Ile Thr Tyr Tyr stop
CCG CTG AAC GTA GCA ATA ACT TAT TAC TAA

Figura 3. Sequência nucleotídica e de aminoácidos correspondentes ao gene *faeG*. Inclui as regiões de peptídeo sinal, 16s ribossômico, "TATA BOX" (região promotora) e principais sítios enzimáticos utilizados neste trabalho

Fonte - Gastra *et al.*, 1981; Klemm, 1981.

2.2. INFECÇÃO POR *Escherichia coli* EM SUÍNOS

Amostras de *Escherichia coli* podem causar em suínos três tipos principais de infecções: colibacilose entérica, doença do edema e mastite (Wilson, 1984; Nielsen, 1984; Bertschinger & Pohlens, 1984).

A doença do edema é causada pela infecção do trato intestinal por determinadas amostras patogênicas de *Escherichia coli* e caracteriza-se por progressivo quadro de comprometimento neurológico, envolvendo paralisia das patas, convulsões e coma. A doença do edema afeta suínos recém-nascidos, provocando altas taxas de mortalidade.

A mastite é caracterizada por infecção do tecido mamário de fêmeas de suínos por amostras de *Escherichia coli* e de outros gêneros de bactérias. A taxa de mortalidade de fêmeas infectadas é baixa, mas suínos recém-nascidos sofrem mais com a doença e casos de mortalidade são comuns.

A colibacilose entérica suína é a causa mais comum de mortalidade de animais recém-nascidos. O agente etiológico principal desta doença são linhagens de *Escherichia coli* enterotoxigênicas (Wilson & Francis, 1986). A patogenicidade das mesmas está ligada a produção de diferentes fatores de virulência tais como as toxinas STap, STb e LT e os fatores de colonização K88, K99, 987P, F41, F42 e F165 (Moon, 1990).

A infecção de suínos pode ocorrer principalmente em três períodos de vida. Na primeira semana após o nascimento (neonatal imediata), ao redor de três semanas após o nascimento (fase de amamentação) e durante as duas semanas seguintes ao desmame. As infecções mais severas são aquelas adquiridas antes e durante o período de amamentação, quando o sistema imunológico ainda não está totalmente desenvolvido, ficando o animal dependente dos anticorpos obtidos do colostro do leite materno. O animal infectado sofre desidratação e perda de peso, o que pode em muitos casos levar a morte (Stevenson, 1963).

Nos Estados Unidos, cerca de 48% dos casos de diarreia neonatal em suínos são causados por amostras de *Escherichia coli* (Wilson, 1984). No Brasil ainda não existem muitos dados a este respeito, mas a incidência parece ser próxima ou mesmo maior (Pestana de Castro, A. F., comunicação pessoal). A taxa de mortalidade de animais infectados, principalmente neonatal, parece ser igualmente alta, ao redor de 50%. A mortalidade aliada à perda de peso dos animais sobreviventes é responsável por grandes prejuízos econômicos a suinocultura brasileira.

As amostras de ETEC patogênicas a suínos geralmente pertencem a determinados sorogrupos (Sojka, 1965). O levantamento de sorogrupos e fatores de virulência presentes em amostras isoladas de suínos com diarreia no Brasil apresentaram parcial correlação com os dados da literatura (Gatti *et al.*, 1985).

2.3. DESENVOLVIMENTO DE VACINAS

A grande incidência de colibacilose entérica suína e os muitos prejuízos decorrentes desta doença no Brasil, aliada ao fato dos mecanismos de prevenção e tratamento não serem totalmente eficazes, levam à necessidade de desenvolvimento de vacinas eficientes.

A pesquisa e desenvolvimento de vacinas potenciais depende dos estudos básicos de patogenicidade e imunologia os quais irão determinar os epítomos antigênicos capazes de estimular o sistema imunológico do hospedeiro em termos de uma resposta protetora eficaz.

2.3.1. BACTERINAS, TOXÓIDES E ATENUAÇÃO

As vacinas bacterianas disponíveis atualmente, podem ser divididas em dois grupos: bacterinas e toxóides (Isaacson, 1985)

Bacterinas são preparações que contêm a célula total de bactérias mortas por tratamentos físicos ou químicos. Toxóides são derivados de componentes das toxinas importantes. Atualmente toxóides são incluídos numa classe emergente e promissora de vacinas, as vacinas de subunidades. A grande vantagem do uso de vacinas de subunidades em relação às bacterinas deve-se à não utilização de componentes celulares que, além de não contribuírem para a ativação da resposta imunológica poderiam ser tóxicos ao hospedeiro.

Contudo, até o momento, a grande maioria de vacinas utilizadas na prevenção de infecções causadas por amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC) tem sido baseadas em preparados de enterotoxinas e fatores de colonização (Levine *et al.*, 1983).

Neste aspecto, a enterotoxina LT fortemente imunogênica e em experimentos de imunização apresenta a capacidade de estimular a resposta imunológica, com consequente produção de anticorpos anti-LT (Kaper & Levine, 1988). A enterotoxina STa, apesar de ser considerado um imunogênico fraco devido ao pequeno tamanho da sua forma ativa (Frantz & Robertson, 1981), pode adquirir maior capacidade imunogênica quando acoplada a uma proteína carreadora (Gianella *et al.*, 1981; Kauffman, 1981). De fato, quando a proteína de membrana externa OmpC foi utilizada como carreadora da toxina STa, a imunização de coelhos provocou uma produção de anticorpos em resposta às duas proteínas (Saarilahti, *et al.*, 1989).

Com relação as fímbrias de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), estas são consideradas fortemente imunogênicas e tem sido utilizadas no desenvolvimento de vacinas (Levine *et al.*, 1983). Diversos pesquisadores demonstraram que anticorpos produzidos a partir da inoculação de fímbrias são capazes de dificultar ou mesmo impedir a colonização do epitélio do intestino delgado do hospedeiro, pelas bactérias que as expressem (Rutter & Jones, 1973; Acres *et al.*, 1979; Morgan *et al.*, 1978; Sojka *et al.*, 1978; Nagy *et al.*, 1978; Isaacson *et al.*, 1980; Runnels *et al.*, 1987; Contrepois & Girardeau, 1985).

Os suínos recém-nascidos não apresentam o sistema imunológico totalmente formado, sendo dependentes de anticorpos adquiridos do colostro e do leite materno. A administração parenteral de fímbrias purificadas ou bacterinas em fêmeas grávidas induzem a produção de anticorpos que acabam sendo transferidos para os recém-nascidos através do colostro e do leite, mas não através da placenta. (Isaacson *et al.*, 1985; Morgan *et al.*, 1978; Nagy *et al.*, 1978; Acres *et al.*, 1979). Esta imunização, entretanto, não é capaz de proteger de maneira eficiente, os recém-nascidos (Porter, *et al.*, 1974).

A imunização por via oral, na maioria dos casos, tem apresentado maior eficiência quando comparada com as demais vias, pela ativação direta do sistema imunológico intestinal, e consequente produção de IgA. Suínos imunizados por via oral com bactérias mortas apresentaram resultados apenas moderados (Porter, *et al.*, 1974), contrastando com a resposta obtida após utilização de bactérias vivas atenuadas, cujos resultados foram promissores (Moon, 1981; Moon *et al.*, 1988; Francis & Willgohs, 1991).

Linhagens de *Escherichia coli* atenuadas apresentam capacidade de expressar fímbrias como K88, K99 ou 987P e de colonizar a mucosa intestinal do hospedeiro, ativando de modo mais eficiente uma resposta imunológica, sem contudo apresentar o desenvolvimento de doença. Fêmeas de suínos imunizadas por este método apresentam imunoglobulinas IgA e IgM no colostro e no leite, bem como IgG no soro sanguíneo (Moon, 1981; Moon *et al.*, 1988).

2.3.2. TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE

A aplicação da tecnologia do DNA recombinante no desenvolvimento de vacinas tem contribuído de maneira significativa na obtenção de linhagens com atenuação estável e segura, além da construção de carreadores para epítomos antigênicos responsáveis pela patogenicidade. Deste modo, linhagens podem ser desenvolvidas para expressar vários epítomos antigênicos simultâneos, simplificando a produção e permitindo a imunização contra mais de um microrganismo.

As subunidades constituintes da estrutura da fimbria têm sido estudadas em relação a esta capacidade de expressar e carrear epítomos antigênicos exógenos, sem contudo evitar a montagem correta da fimbria. As regiões variáveis do gene estrutural da fimbria Tipo1 foram substituídas pelas sequências gênicas do vírus da hepatite B, do antígeno C3 do vírus da poliomielite Tipo1 e do núcleo capsídeo do vírus da febre aftosa (Klemm & Hedegaard, 1990). Em muitos destes experimentos a fimbria foi expressa na superfície bacteriana e reconhecida tanto por anticorpos anti-Tipo1 quanto por anticorpos contra os antígenos carregados.

A substituição de regiões na subunidade *faeG* da fimbria K88ab pela inserção de sequências nucleotídicas conhecidas e a análise da expressão destas através do mecanismo de secreção e montagem da fimbria, também mostrou a possibilidade de utilização destas regiões hipervariáveis para clonagem de genes exógenos (Thiry *et al.*, 1989).

Um outro estudo utilizou a subunidade principal da fimbria K88ab para construir uma fusão com a proteína pré-S2 do vírus da hepatite B, e também destacou a possível utilização deste sistema como vacinas recombinantes (Pedersen & Andersen, 1991). Estes resultados promissores iniciam um novo campo de pesquisa e desenvolvimento de vacinas bacterianas pela utilização de fimbrias como carreadores de sequências antigênicas.

Entretanto, para uma vacina atingir índices elevados de eficiência imunológica é importante estimular uma resposta simultânea antibactéria e antitoxina, provocando assim um efeito sinérgico. Desta maneira, o desenvolvimento de linhagens atenuadas com capacidade de expressar antígenos fimbrianos e antígenos de toxinas são de extrema importância (Francis & Willgoos, 1991).

2.3.3. ATENUAÇÃO DE *Salmonella*

Muitos grupos de pesquisadores têm utilizado linhagens atenuadas de *Salmonella* como vacinas experimentais para a apresentação de antígenos heterólogos ao sistema imune (Chatfield *et al.*, 1989).

Linhagens de *Salmonella* atenuadas através de mutação no gene *galE* têm sido muito utilizadas para a inserção e expressão de plasmídios recombinantes dos genes de antígenos de *Shigella sonnei* (Formal *et al.*, 1981), subunidade B da toxina LT de *E.coli* (Clements *et al.*, 1984), operon da fimbria K88ab de *E.coli* (Stevenson *et al.*, 1985), e gene da β -galactosidase (Brown *et al.*, 1987).

Entretanto, as linhagens de *Salmonella* mais utilizadas para expressão de proteínas recombinantes têm sido aquelas atenuadas por mutação nos genes *aro* de compostos aromáticos. Plasmídios recombinantes codificando a subunidade B da toxina LT de *E.coli* (Clements *et al.*, 1986; Schödel *et al.*, 1989), proteína M de *Streptococcus* (Poirier *et al.*, 1988), nucleoproteína de vírus Influenza A (Tite *et al.*, 1990), hemaglutinina filamentosa de *Bordetella pertussis* (Guzmán *et al.*, 1991) foram inseridos em *Salmonella* e estas construções utilizadas para se analisar a estimulação do sistema imune do hospedeiro.

As vantagens da utilização de linhagens atenuadas de *Salmonella* como carreadores inclui a possibilidade de serem utilizadas como vacinas administradas por via oral, e de serem capazes de estimular no hospedeiro, resposta secretória, humoral e mediada por células (Chatfield *et al.*, 1989). Entretanto, apenas uma resposta imune fraca foi observada nos testes das proteínas recombinantes, devido à instabilidade plasmidial na ausência de pressão seletiva "in vivo", possivelmente devido às linhagens atenuadas poderem se multiplicar algumas vezes dentro do hospedeiro na ausência de antibióticos. Outros estudos demonstraram que pode ser obtida estabilidade pela inserção do gene do antígeno heterólogo a ser expresso diretamente no cromossomo de *Salmonella* (Strugnelli *et al.*, 1990).

Diferentes grupos de pesquisadores têm direcionado os seus estudos no desenvolvimento de estratégias que permitam inserir genes heterólogos no cromossomo de *Salmonella*, principalmente nos genes *aro* dos compostos aromáticos e *galE*.

Uma linhagem de *Salmonella galE* atenuada foi construída através de clonagem em plasmídeo do gene *galE*, deleção de parte do mesmo e posterior recombinação com o gene *galE* cromossômico. Esta linhagem não apresentou reversão e estimulou a produção de anticorpos quando inoculada em camundongos (Hone *et al.*, 1987). Posteriormente, esta linhagem foi utilizada para expressar o gene do operon da fimbria K88ab de *E. coli* pela clonagem num plasmídeo com o gene *his* deletado e recombinação com o mesmo gene cromossômico em *Salmonella* (Hone *et al.*, 1988).

Neste presente trabalho tivemos como objetivo a clonagem do gene *faeG* de *Escherichia coli*, como possível carreador de sequências nucleotídicas de interesse médico-veterinário. Esta primeira etapa deverá contribuir para o desenvolvimento de vacinas pela tecnologia do DNA recombinante e é parte integrante de um projeto extenso do laboratório de Biologia Molecular, do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP. Entretanto, a obtenção de uma vacina eficiente e segura, seja pela utilização de fusão gênica e codificação protéica de carreadores acoplados a fatores de virulência, seja pela utilização de *Salmonella* atenuada ou ainda por um sistema misto, dependerá de outros resultados a serem obtidos posteriormente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PLASMÍDIOS E LINHAGENS BACTERIANAS

Os plasmídios e linhagens bacterianas utilizados neste trabalho estão relacionados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4. Plasmídios utilizados

PLASMÍDIOS	CARACTERÍSTICAS	ORIGEM
pFM205 ^a	K88ab ⁺ ^a Ap ^r ^b	Mooi <i>et al.</i> , 1979
pUC18 ^f	Ap ^r <i>lac</i> ⁺ ^c	Vieira & Messing, 1985
pUC19 ^f	Ap ^r <i>lac</i> ⁺	Vieira & Messing, 1985
pSM1	pUC18/ <i>faeG</i> ^d Ap ^r	este trabalho
pSM2	pUC19/ <i>faeG</i> Ap ^r	este trabalho
pSM3	pUC19/ <i>faeG</i> Ap ^r <i>HindIII</i> ⁻	este trabalho
pSM4	pUC19/ <i>faeG</i> Ap ^r <i>HindIII</i> ⁺	este trabalho

^a K88ab⁺, contém o operon da fímbria K88ab

^b Ap^r, apresenta resistência à ampicilina

^c *lac*⁺, possui o promotor *lac*, β -galactosidase positivo

^d *faeG*, gene da subunidade principal da fímbria K88ab

^e esquema representado na Figura 4

^f esquema representado na Figura 5

Tabela 5. Linhagens de *Escherichia coli* utilizadas

LINHAGENS	CARACTERÍSTICAS	ORIGEM
DH5 α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (ϕ so <i>lacZ</i> Δ M15), <i>hsdK17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Hanahan <i>et al.</i> , 1983
V517	referência de PM plasmidial (32.04; 5.19; 3.48; 3.03; 2.24; 1.69; 1.51; 1.25) ^a	Macrina <i>et al.</i> , 1978

^a valores de peso molecular em megadaltons

As amostras bacterianas utilizadas neste trabalho foram conservadas em meio semi-sólido a temperatura ambiente, com repiques a cada 6 meses.

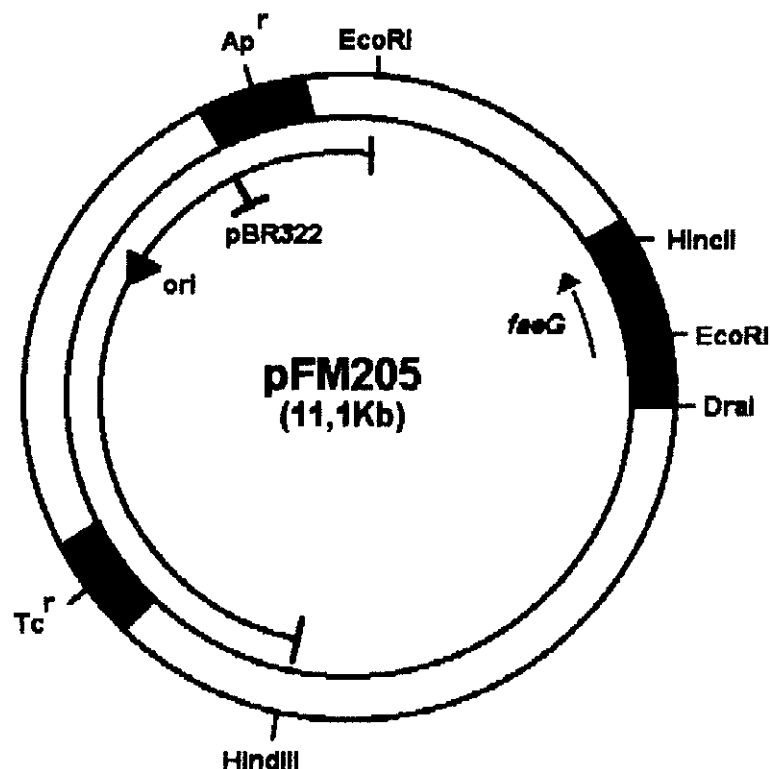


Figura 4. Mapa físico do plasmídeo pFM205

Fonte - Mooi *et al.*, 1979.

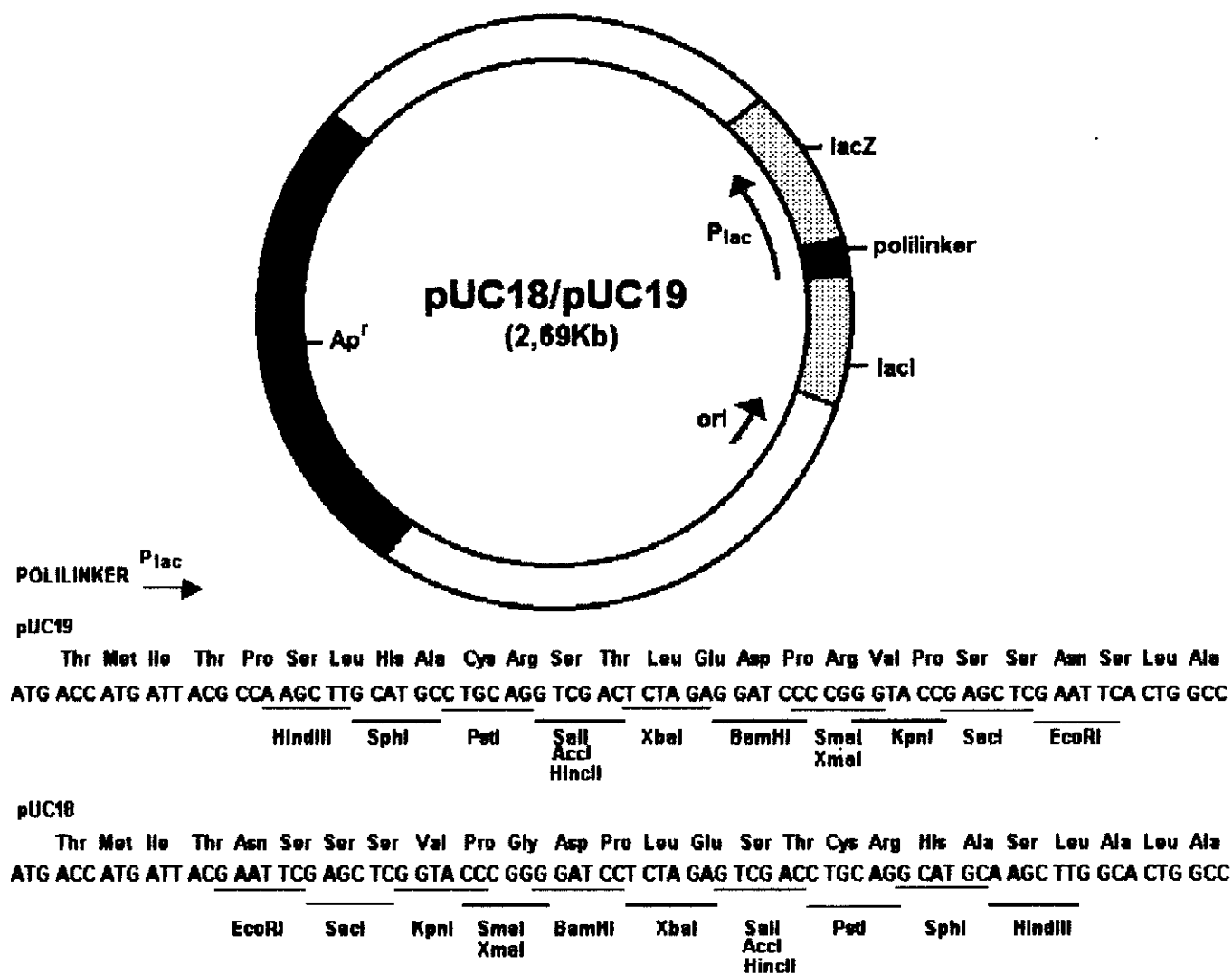


Figura 5. Mapa físico dos plasmídios pUC18 e pUC19

Fonte - Vieira & Messing, 1985.

3.2. MEIOS DE CULTURA

Todos os meios utilizados para manutenção, cultivo e ensaio das amostras bacterianas foram preparados com reagentes de grau P.A., H₂O destilada, e esterilizados por autoclavagem a 121°C por 20 min. Os antibióticos foram acrescentados nas concentrações adequadas, quando necessário. Para preparação de meios sólidos foi utilizado ágar (Difco) na concentração de 15 g/L e para meios semi-sólidos 7 g/L.

MEIO LB (Luria - Bertani)

bacto-triptona10,0 g
bacto-extrato de levedura 5,0 g
NaCl10,0 g

Os solutos foram dissolvidos em 800 ml de H₂O destilada, o pH acertado para 7.0 com NaOH 10 M e o volume completado para 1 L e autoclavado.

MEIO BHI (Brain Heart Infusion)

40 g de BHI (Difco) foram diluídos em 1 L de H₂O destilada e autoclavado .

MEIO SOB

bacto-triptona20,0 g
bacto-extrato de levedura5,0 g
NaCl0,5 g

Os solutos foram dissolvidos em 800 ml de H₂O destilada e foi acrescentado 10 ml de KCl 250 mM antes de ser acertado o pH para 7.0. O volume foi corrigido para 975 ml e após ser autoclavado, foi adicionado ao meio 5 ml de solução MgCl₂ 2 M esterilizada.

MEIO SOC

Ao meio SOB foi adicionado 20 ml de solução de glicose 1 M esterilizada por filtração em membrana Millipore 0.22 μm .

3.3. SOLUÇÕES DE USO GERAL

Todas as soluções utilizadas foram preparadas com reagentes de grau P.A., H_2O destilada deionizada MilliQ (Millipore Inc.) e esterilizados, quando necessário, por autoclavagem a 121°C por 20 min ou filtração em membrana Millipore 0.22 μm .

3.4. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

3.4.1. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM PEQUENA ESCALA

Para extração rápida de DNA plasmidial em pequena escala foi utilizado o método descrito por Birboim & Doly, 1979, com modificações.

As amostras bacterianas foram inoculadas em 4 ml de meio LB e foi acrescentou-se 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina naquelas resistentes. Após 18 h de incubação a 37°C, 1,4 ml de cultura foi transferida para tubo eppendorf (1,5 ml) e centrifugada a 12000 g por 1 min em microcentrifuga. O sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspendido em 100 μl de solução I (10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8.0). O tubo foi mantido em gelo por 5 min e 200 μl de solução II (0,2 N NaOH, 1% SDS) foi adicionado, homogeneizando-se por inversão. A suspensão clara e viscosa foi mantida em gelo por 3 min e após este período foi adicionado 150 μl de solução III (acetato de sódio 3 M pH 4.8).

O tubo foi invertido por alguns segundos para a formação da rede de DNA e mantido em gelo por 15 min para precipitação de proteínas, RNA de alto peso molecular e DNA cromossômico. A preparação foi centrifugada a 12000 g por 6 min e 400 µl de sobrenadante transferidos para um tubo eppendorf novo onde 1 ml (2,5 vol.) de etanol 100% gelado foi acrescentado para precipitação de DNA plasmidial. O tubo foi invertido, mantido a -20°C por 1 h. e então centrifugado a 12000 g por 6 min.

O sobrenadante foi retirado e o sedimento, após secagem, foi ressuspendido em 40 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) para análise do perfil de DNA plasmidial por eletroforese em gel de agarose. Nas preparações de DNA plasmidial a serem digeridas com enzimas de restrição, o sedimento obtido foi ressuspendido em 100 µl de solução IV (acetato de sódio 0.1 M, Tris-HCl 0.05 M pH 8.0) e adicionado 200 µl (2 vol.) de etanol 100% gelado. O tubo foi invertido, mantido a -20°C por 1 h. e novamente centrifugado a 12000 g por 6 min. Após secagem, o sedimento foi ressuspendido em 36 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) e acrescentado 4 µl de RNase A (10 µg/ml) para concentração final de 1 µg/ml.

3.4.2. AMPLIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

Os plasmídios pBR322 e pFM205 foram amplificados antes de ser realizada a extração de DNA plasmidial em grande escala. Amostras bacterianas foram inoculadas em tubo com 4 ml de LB e ampicilina numa concentração de 100 µg/ml e incubadas por 18 h a 37°C. Uma diluição 1:100 realizada em um erlenmeyer com 50 ml de meio LB e ampicilina foi incubada sob agitação de 150 rpm a 37°C até atingir a fase logarítmica de crescimento (OD, 0,5). Uma nova diluição foi feita, agora de 1:10, em 2 frascos erlenmeyer com 50 ml de meio LB cada. Os frascos foram incubados sob agitação de 150 rpm a 37°C até uma densidade óptica OD 0,6. Aos frascos foi adicionado cloranfenicol numa concentração final de 170 µg/ml e mantida a incubação sob agitação por 18 h. A cultura foi transferida para tubos de polipropileno de 50 ml e centrifugado a 5000 rpm por 10 min.

3.4.3. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM GRANDE ESCALA

Para a extração de DNA plasmidial em grande escala foi utilizado o método descrito em Sambrook *et al.*, 1989, com modificações.

Amostras bacterianas foram incubadas em 4 ml de meio LB com o antibiótico ampicilina (100 µg/ml) por 18 h a 37°C e 100 µl transferidos para 2 frascos erlenmeyers (150 ml) com 50 ml de LB e ampicilina. Os frascos foram incubados sob agitação de 150 rpm a 37°C por 18 h e a cultura posteriormente transferida para tubos de polipropileno (40 ml). Os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 10 min, o sobrenadante retirado e cada sedimento ressuspensionado em 5 ml de solução I (10 mM EDTA pH 8.0, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM glicose, 2 mg/ml lisozima). Os tubos foram mantidos em gelo por 30 min e adicionados 10 ml de solução II (0,2 N NaOH, 1% SDS). Os tubos foram, então, invertidos suavemente, recolocados em gelo por 5 min e a lise alcalina interrompida pela adição de 7,5 ml de solução III (acetato de sódio 3 M). Após incubação de 30 min no gelo, a preparação foi centrifugada a 12000 rpm por 15 min e o sobrenadante transferido para outro tubo através de filtração em gaze. A precipitação de DNA foi feita pela adição de 13,5 ml (0,6 vol) de isopropanol gelado, incubação a -20°C por 1 h e centrifugação a 10000 rpm por 10 min. O sedimento foi lavado com 10 ml de etanol 70%, seco a temperatura ambiente e ressuspensionado em 1 ml de TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). A purificação de DNA foi feita por extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico ou pelo kit de purificação de DNA da Promega ("Magic™ DNA clean-up system"), conforme descrito nos itens .

3.5. QUANTIFICAÇÃO DE DNA POR ESPECTROFOTOMETRIA

A quantificação de DNA por espectrofotometria foi feita de acordo com o descrito em Sambrook *et al.*, 1989.

As preparações foram diluídas 50, 100 e 500 vezes e analisadas quanto à absorbância nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm. A leitura a 260 nm permite calcular a concentração de ácidos nucleicos. Uma unidade de absorbância (OD) a 260 nm corresponde a 50 µg/ml de DNA dupla fita, 40 µg/ml de DNA fita simples e RNA, ou 20 µg/ml de oligonucleotídeos fita simples. A razão entre a leitura em 260 nm e 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) fornece uma estimativa da pureza da amostra. Preparações puras de DNA têm valores desta relação entre 1,8 e 2,0. Se houver contaminação com proteína ou fenol, o valor será menor.

3.6. CLONAGEM MOLECULAR

3.6.1. DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

As enzimas de restrição foram utilizadas de acordo com as especificações do fabricante (Pharmacia LKB) e o método utilizado conforme descrito em Sambrook *et al.*, 1989, com modificações.

Em tubo eppendorf novo, 1 µg de DNA foi diluído em H₂O deionizada até um volume de 18 µl. A esta solução foram adicionados 2 µl de tampão "one-phor-all buffer" (100 mM tris-acetato pH 7,5, 100 mM acetato de magnésio, 500 mM de acetato de potássio) concentrado 10 vezes e fornecido pelo fabricante. O tubo foi mantido em gelo e 0,5 µl da enzima de restrição adequada foi adicionada (5 - 10 unidades) e misturada.. A reação foi incubada em temperaturas e tempos apropriados para cada enzima:

*Bst*Ell - 65°C 1 h

*Dra*I - 37°C 1 h

*Hinc*II - 37°C 1 h

*Hind*III - 37°C 1 h

*Eco*RI - 37°C 1 h

*Bam*HI - 37°C 1 h

*Pst*I - 37°C 1 h

As reações foram inativadas por aquecimento a 65°C por 20 min ou por 85°C por 30 min. O resultado foi observado por eletroforese em gel de agarose.

3.6.2. DESFOSFORILAÇÃO DE DNA DO VETOR PLASMIDIAL

Os vetores pUC18 e pUC19 utilizados foram digeridos com enzimas adequadas e desfosforilados pela adição de 2 µl de fosfatase alcalina (Pharmacia LKB), diluída 1:20 em tampão "one-phor-all buffer" fornecido pelo fabricante e diluído 1X. Após 30 min a 37°C, a reação foi inativada por aquecimento a 85°C por 15 min ou por adição de EDTA 0,5 M para uma concentração final de 5 mM. A preparação foi purificada por fenol:clorofórmio e precipitada pelo acréscimo de etanol, após correção da concentração salina para 200 mM.

3.6.3. CLONAGEM MOLECULAR DO GENE *faeG*

A reação de ligação entre as extremidades abruptas do fragmento *faeG* ao vetor pUC18 foi realizada segundo método descrito em Sambrook *et al.*, 1989, e conforme recomendação do fabricante das enzimas (Pharmacia LKB), estando esquematizada na Figura 13.

Num tubo eppendorf foram adicionados o equivalente a 0,1 µg de DNA plasmidial do vetor pUC18, clivado com enzima de restrição *HincII* e desfosforilado por fosfatase alcalina, e 0,3 µg do fragmento *faeG* (pFM205), clivado com enzimas de restrição *DraI* e *HincII* e purificado por "gene clean" (Bio 101) para um volume final de 12 µl. Ao tubo foram adicionados 2 µl de tampão "one-phor-all buffer" 10X (Pharmacia LKB), 6,5 µl de ATP 1 mM e 1,5 µl de enzima T⁴ DNA ligase. A reação foi incubada a 16°C por 16 h e inativada por aquecimento a 65°C por 10 min. A eficiência da reação foi analisada por eletroforese em gel de agarose e células competentes de DH5α foram transformadas, conforme descrito no item . Os transformantes obtidos foram analisados quanto a presença do fragmento *faeG* clonado.

3.6.4. CLONAGEM MOLECULAR PARA CORREÇÃO DA ORIENTAÇÃO DO GENE *faeG*

Em um tubo eppendorf foi adicionado o equivalente a 0,1 µg de DNA plasmidial do vetor pUC19, desfosforilado com fosfatase alcalina após ser clivado com enzimas *Bam*HI e *Hind*III, e quantidade equimolar do fragmento *faeG* clonado no plasmídio pSM1, clivado com as mesmas enzimas e purificado por "gene clean" (Bio101). H₂O deionizada foi adicionada para um volume final de 15 µl e então acrescentados 2 µl de tampão "one-phor-all buffer" 10X (Pharmacia LKB), 2 µl de ATP 10 mM e 1 µl de enzima T⁴ DNA ligase. A reação foi incubada a 16°C por 18 h e células de DH5α competentes foram transformadas.

3.6.5. DELEÇÃO SITIO ESPECÍFICA PELO PREENCHIMENTO COM KLENOW DNA POLIMERASE

O plasmídio pSM2 foi clivado com a enzima de restrição *Hind*III. Após inativação enzimática, foi adicionado ao tubo 1 µl de solução de dNTP (dTTP, dATP, dCTP, dGTP) a uma concentração de 1 mM cada, e 0,3 µl da enzima Klenow DNA polimerase (Pharmacia LKB). A reação foi incubada por 15 min a temperatura ambiente e inativada por aquecimento a 75°C por 10 min.

No tubo de reação foram então adicionados 1 µl de ATP 10 mM e 1 µl de enzima T⁴ DNA ligase. A reação foi incubada a 16°C por 18 h e células DH5α competentes foram transformadas.

3.6.6. COLOCAÇÃO DE "LINKER" PARA RESTABELECIMENTO DO SÍTIO DE RESTRIÇÃO *HindIII*

O plasmídeo pSM3 foi digerido com enzima de restrição *HincII*, sendo 200 ng transferidos para novo tubo onde foram adicionados 100 ng de "linker" *HindIII*, H₂O deionizada para um volume de 17 µl, 2 µl de tampão "one-phor-all buffer" 10X (Pharmacia LKB) e 1 µl de T⁴ DNA ligase. A reação foi incubada a 16°C por 16 h e a enzima inativada por aquecimento a 65°C por 20 min.

O excesso de "linker" *HindIII* foi retirado por digestão enzimática com *HindIII*, separação de fragmentos por eletroforese em gel de agarose, purificação por kit "gene clean" (BIO101) e religação das extremidades coesivas formadas. Uma alíquota desta reação foi utilizada para transformar células DH5α competentes.

3.7. PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

3.7.1. PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL ATRAVÉS DE EXTRAÇÃO COM FENOL : CLOROFÓRMIO : ÁLCOOL ISOAMÍLICO

A purificação de DNA plasmidial através de extração com fenol : clorofórmio : álcool isoamílico foi realizada conforme descrito em Sambrook *et al.*, 1989.

A solução obtida na lise alcalina em grande escala foi dividida em tubos eppendorf com 500 µl em cada. Aos tubos foram acrescentados igual volume de uma mistura de fenol : clorofórmio : álcool isoamílico numa proporção de 25:24:1, e após agitação suave, foram centrifugados a 12000 g por 30 s a temperatura ambiente.

A fase aquosa superior foi transferida para novo tubo e o procedimento repetido até não ser visualizado resíduo protéico na interface líquida. A fase aquosa foi novamente transferida e igual volume de clorofórmio : álcool isoamílico acrescentado, novamente misturado e centrifugado nas condições anteriores. A concentração salina foi acertada para 200 mM e adicionado 2,5 vol de etanol 100% ou 0,6 vol de isopropanol; o tubo foi então invertido e colocado a -20°C de 1 h a 16 h. O tubo foi centrifugado a 12000 g por 6 min, o sedimento seco a vácuo e ressuspendido em H₂O deionizada.

3.7.2. PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL PELO KIT "MAGIC™ DNA CLEAN-UP SYSTEM" (Promega)

Solução de DNA plasmidial de 100 µl foi misturada a 1 ml de resina em tubo eppendorf. Esta mistura foi transferida para uma seringa de 3 ml e, após colocação do embolo na seringa, a mistura foi injetada em uma minicoluna. A resina foi lavada com 2 ml de isopropanol 80% e seca por centrifugação de 20 s em microcentrifuga. A minicoluna foi conectada a um tubo eppendorf novo e 200 µl de H₂O MilliQ pré-aquecida a 70°C acrescentada à resina. Após 1 min o sistema foi centrifugado por 20 seg. em microcentrifuga para a eluição do DNA.

3.7.3. PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA PELO KIT "GENE CLEAN™" (Bio 101 Inc)

Os plasmídios digeridos com as enzimas de restrição adequadas tiveram os fragmentos separados por eletroforese em gel de agarose em tampão TAE 1X (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 1 mM). Os fragmentos corretos foram detectados por visualização em luz ultravioleta de onda longa e excisados do gel. Os pedaços de agarose contendo os fragmentos foram colocados em tubo eppendorf e seu volume determinado.

Ao tubo foi acrescentado 2,5 a 3,0 vol de solução estoque de NaI, sendo o tubo mantido a 50°C até dissolução completa da agarose, quando foram adicionados 5 µl de "glassmilk" (Bio 101). O tubo foi então incubado em gelo por 5 min e centrifugado a 12000 g por 5 s sendo o sobrenadante retirado.

O sedimento foi ressuscitado com 10 a 50 vol da solução "new wash" (Bio 101) gelada, os tubos foram centrifugado a 12000 g por 5 s e esta lavagem repetida outras duas vezes. O sedimento foi, finalmente, ressuscitado com TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) ou dH₂O num volume equivalente ao de "glassmilk" adicionados anteriormente, e após nova centrifugação o sobrenadante foi utilizado para clonagem molecular.

3.8. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

3.8.1. PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES

A linhagem DH5α foi inoculada em 3 ml de LB e incubada a 37°C por 18 h. Uma alíquota deste crescimento foi transferida para 50 ml de LB em frasco erlenmeyer numa diluição de 1:20 ou 1:100, e incubada sob agitação de 150 rpm a 37°C até atingir absorbância 0,5. A cultura foi dividida para dois tubos de polipropileno esterilizados (25 ml/tubo), e mantida em gelo por 10 min. A seguir esta cultura foi centrifugada a 5000 rpm por 10 min a 4°C, o sobrenadante retirado e o sedimento ressuscitado em 20 ml de solução de CaCl₂ 0,1 M. Os tubos foram mantidos em gelo por 10 min e centrifugados nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi retirado e ambos os sedimentos foram ressuscitados em 2 ml de CaCl₂ 0,1 M, sendo então transferidos para tubos de ensaio previamente gelados em alíquotas de 200 µl onde permaneceram em gelo no mínimo 4 h.

3.8.2. ADIÇÃO DE DNA ÀS CÉLULAS COMPETENTES

Aos tubos anteriores foram adicionados 100 ng de DNA a ser inserido nas células competentes, sendo mantidos por 40 min em gelo. A seguir, foram submetidos a um choque térmico de aquecimento por 5 min a 37°C seguido de resfriamento em gelo por 2 min.

Em cada tubo foi adicionado 800 µl de meio SOC e, após incubação a 37°C por 45 min, o conteúdo foi transferido para outro tubo. Estes foram centrifugados a 12000 g por 2 min, sendo o sedimento ressuscitado em 100 µl de LB. A preparação foi inoculada em placas de Petri em meio seletivo adequado, quando necessário.

As placas foram incubadas a 37°C por 18 h e as colônias isoladas analisadas por extração plasmidial em pequena escala seguida de digestão com enzimas de restrição.

3.9. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

3.9.1. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS BACTERIANAS TOTAIS

As amostras bacterianas foram inoculadas em 4 ml de meio BHI com o antibiótico adequado e incubadas a 37°C ou 16°C, quando necessário, por no mínimo 18 h. Aliquotas de 100 µl foram utilizadas para semear placas de petri com meio BHI ágar e esta cultura foi incubada nas mesmas condições anteriores. O crescimento bacteriano foi coletado e dissolvido em 500 µl de PBS pH 7,2, homogeneizado em vortex por 5 s e centrifugado a 12000 g por 5 min. O sedimento foi então ressuscitado em 200 µl de PBS e igual volume de solução de ressuspensão 2X (Tris-HCl 100 mM pH 6,8, Glicerol 20%, SDS 4%, Azul de Bromofenol 0,2%, 2-Mercaptoetanol 10%). A preparação foi fervida por 5 min, a 100°C e centrifugada a 12000 g por 5 min, sendo o sobrenadante transferido para outro tubo e estocado por congelamento.

3.9.2. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS BACTERIANAS DE SUPERFÍCIE

As amostras bacterianas foram inoculadas em placas de petri (6 placas por amostra) conforme descrito no método de extração de proteínas totais, e o crescimento foi coletado com o auxílio de bastão de Drigalski, após adição de 1 ml de PBS pH 7.2 por placa. A preparação foi passada 10 vezes através de agulha de gauge 23 em seringa de 5 ml e transferida para tubos eppendorf.

Os tubos foram centrifugados a 12000 g por 4 min, sendo o sobrenadante cuidadosamente transferido para tubos novos, onde foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 40% num volume adequado para concentração final de 10%. Os tubos foram mantidos em gelo por 20 min e novamente centrifugados. O sedimento foi ressuspensionado em etanol : éter (1:1) por vortex vigoroso e mantido em gelo por outros 20 min, quando nova centrifugação foi realizada. A lavagem com etanol : éter foi repetida outras duas vezes e o sedimento final ressuspensionado em 250 µl de PBS. Antes de ser realizada a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (PAGE-SDS) foi adicionada à preparação igual volume de solução de ressuspensão 2X (Tris-HCl 100 mM pH 6.8, Glicerol 20%, SDS 4%, Azul de Bromofenol 0,2%, 2-Mercaptoetanol 10%), seguida de fervura a temperatura de 100°C por 5 min.

3.9.3. PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SOBRENADANTE DE CULTURAS BACTERIANAS

As amostras bacterianas foram inoculadas em 50 ml de meio BHI num frasco erlenmeyer a partir de um pré-inóculo em tubo de ensaio. O frasco foi incubado sob agitação a 150 rpm por 18 h a 37°C e a seguir a cultura foi transferida a tubos de polipropileno para centrifugação a 10000 g por 10 min.

O sobrenadante foi então transferido para novo tubo e acrescentado ácido tricloroacético (TCA) 40% para uma concentração final de 10%. Esta preparação foi mantida em gelo por 10 min e centrifugada a 10000 g por 10 min. O sedimento foi ressuspensionado por vortex em 2 ml de solução de etanol : éter (1:1) e transferido para tubos eppendorf. Os tubos foram mantidos por 20 min em gelo e centrifugados a 12000 g por 5 min. O sedimento foi lavado outras duas vezes com etanol : éter e, finalmente, ressuspensionado em 250 µl de PBS pH 7,2. A preparação foi desnaturada com adição de solução de ressuspensão e fervura, conforme descrito na metodologia de extração de proteínas de superfície (item 3.9.2.), antes da separação por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (PAGE-SDS).

3.10. ELETROFORESE

3.10.1. ELETROFORESE DE DNA PLASMIDIAL EM GEL DE AGAROSE

O método de eletroforese de DNA plasmidial em gel de agarose foi realizado conforme descrito em Sambrook *et al.*, 1989.

Agarose em concentração adequada foi dissolvida em tampão TBE 1X (Tris-borato 0,09 M, EDTA 2 mM) sob aquecimento e dispensada em placa de vidro para solidificação a temperatura ambiente. Aliquotas de DNA foram adicionadas à solução de ressuspensão (Azul de bromofenol 0,25%, Xileno cianol 0,25%, Ficoll 15%) e aplicadas no gel. A corrida eletroforética foi realizada com tampão TBE 1X e submetida a uma diferença de potencial de 80 V ou 100 V, de acordo com o tamanho do gel (5 V/cm).

Após o tempo adequado, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (5 µg/ml) por 1 h à temperatura ambiente, ou por 16 h a 4°C e visualizado em transluminador de luz ultravioleta de onda curta. Exposição a filme preto e branco 125 ISO por 10 s foi utilizado como registro definitivo dos resultados. A revelação e ampliação seguiram especificações do fabricante (Eastman Kodak).

3.10.2. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS (PAGE-SDS)

A eletroforese de proteínas seguiu metodologia descrita por Laemmli, 1970, e o gel foi preparado de acordo com especificações do "Hoefer Eletrophoresis Catalog and Exercises" (1990-1991).

A corrida eletroforética utilizou o equipamento da Pharmacia LKB modelo 2001 e as soluções foram preparadas conforme mostrado na Tabela 6, para gel de separação de concentração 12,5% e gel de empacotamento de concentração 4%, nas quantidades suficientes para o preparo de dois géis simultaneamente .

As soluções foram misturadas por agitação branda constante e a eletroforese foi realizada com tampão de corrida Tris-Glicina (Tris 0,025 M pH 8.3, Glicina 0,192 M, SDS 0,1%) sob uma diferença de potencial de 120 V por 4 h ou corrente elétrica de 15 mA/gel durante 12 h. As proteínas foram visualizadas pela coloração de impregnação com prata.

Tabela 6. Soluções para a preparação de gel de poliacrilamida-SDS

SOLUÇÕES	Gel de Separação ^a	Gel de Empacotamento ^a
	12,5% Acrilamida	4% Acrilamida
30% A ^a 2,7% BisA ^b	25 ml	2,66 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8.8	15 ml	-----
Tris-HCl 0,5 M pH 6.8	-----	5,0 ml
SDS ^c 10%	600 µl	200 µl
H ₂ O destilada	19,1 ml	12,2 ml
Persulfato de Amônio 10%	300 µl	100 µl
TEMED ^d	20 µl	10 µl

^a acrilamida

^b bis-acrilamida

^c dodecil sulfato de sódio

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

^e quantidade suficiente para dois géis simultâneos

3.10.2.1. COLORAÇÃO DE GÉIS DE POLIACRILAMIDA-SDS PELA IMPREGNAÇÃO COM PRATA

A coloração pela impregnação com prata seguiu metodologia descrita por Blum *et al.*, 1987. O gel de poliacrilamida-SDS foi retirado do equipamento de eletroforese e transferido para um recipiente onde as soluções foram trocadas de acordo com a sequência descrita na Tabela 7. Durante toda a coloração o gel foi manipulado com o auxílio de luvas e mantido sob agitação orbital constante. A revelação foi interrompida quando as proteínas se tornaram adequadamente visíveis.

Tabela 7. Sequência de soluções para a impregnação de PAGE-SDS com prata

SOLUÇÕES	TEMPO
Fixador (Etanol 50%, Ácido Acético 12%, 0,5 ml/L de Formaldeído a 37%)	> 1 h
Etanol 50%	3X 20 min
Tiosulfato de Sódio 0,02%	1 min
H ₂ O destilada	3X 20 s
Marcador (Nitrato de Prata 0,2%, 0,75 ml/L formaldeído a 37%)	20 min
H ₂ O destilada	2X 20 s
Revelador (Carbonato de Sódio 6%, Tiosulfato de Sódio 0,4 mg/L, 0,5 ml/L de Formaldeído a 37%)	aprox. 10 min
H ₂ O destilada	2X 2 min
Bloqueador (Metanol 50%, Ácido Acético 12%)	10 min

Os géis foram fotografados e recolocados no recipiente para as imersões em metanol 30% por 30 min, seguidas de glicerol 3% por mais 30 min. Após este procedimento, os géis foram plastificados em papel celofane.

3.11. SEQUENCIAMENTO DE DNA

O sequenciamento do fragmento de 778-pb (*faeG*) inserido no plasmídeo pSM1, foi feito com o kit T7 "DNA sequencing" (Pharmacia LKB), segundo especificação do fabricante.

3.11.1. REAÇÃO DE DESNATURAÇÃO

Num tubo eppendorf, 8 µg de DNA foram diluídos em H₂O deionizada para um volume final de 40 µl, sendo então adicionados outros 40 µl de tampão de desnaturação 2X (0,4 M NaOH, 0,4 mM EDTA pH 8,0), onde a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 5 min. A seguir, foram adicionados simultaneamente 8 µl (0,1 vol) de acetato de sódio 2 M pH 4,5 e 176 µl (2 vol) de etanol 100% gelado. A preparação foi mantida por 1 h a temperatura de -20°C e o DNA precipitado por centrifugação a 12000 g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado e foram adicionados 500 µl de etanol 70% ao tubo, sem ressuspender o sedimento. Após nova centrifugação a 12000 g por 15 min a 4°C, o sedimento foi seco à vácuo, ressuspendido em 20 µl de H₂O deionizada e dividido em 2 tubos.

3.11.2. REAÇÃO DE ANELAMENTO DO "PRIMER"

A um dos tubos eppendorf anteriores foram adicionados 10 µl de DNA para anelamento com "primer" universal (Pharmacia LKB) e ao outro, 8,8 µl de DNA para anelamento com "primer" reverso (Bhoringer). A seguir, 2 µl de "primer" universal e 3,2 µl de "primer" reverso foram adicionados aos tubos adequados, seguidos de 2 µl de tampão de anelamento (Pharmacia LKB), totalizando um volume final de 14 µl. Os tubos foram agitados, centrifugados momentaneamente e incubados a 60°C por 10 min. A seguir, as reações foram mantidas a temperatura ambiente por 10 min e novamente centrifugadas.

3.11.3 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

a- Preliminares

Quatro tubos para sequenciamento por "primer" universal e quatro para "primer" reverso foram marcados (A, G, T, C) e em cada um deles foram adicionados 2,5 µl de solução correspondente (A "mix-short", G "mix-short", T "mix-short", C "mix-short"). Cada "mix-short" contém os quatro deoxinucleotídeos e o dideoxinucleotídeo correspondente.

b- Reação de marcação (pré-mix)

Num tubo eppendorf foram adicionados 8 μ l de H₂O deionizada, 24 μ l de "labeling-mix A" (Pharmacia LKB), 16 μ l de T⁷ DNA polimerase diluída 5X (Pharmacia LKB) e 8 μ l de dATP marcado com ³⁵S. Estes 56 μ l de solução foram misturados por agitação, centrifugados momentaneamente e incubados em gelo.

Nos tubos com DNA anelado ao "primer", foram adicionados 6 μ l da solução pré-mix com 1 min de diferença para cada tubo, sendo misturados com micropipeta e incubados a temperatura ambiente por 5 min.

c- Reação de terminação

Os tubos com dideoxinucleotídeos foram transferidos do gelo para um banho a 37°C onde foram mantidos por um mínimo de 1 min. A seguir, foram transferidos a estes tubos 4,5 μ l de reação de sequenciamento, sendo misturados por pipetagem e incubados por 5 min a 37°C. A cada tubo foram então adicionados 5 μ l de solução de terminação (Pharmacia LKB) e a seguir, transferidos para gelo. Quando todas as reações foram concluídas, os tubos foram centrifugados momentaneamente e armazenados a -20°C por no máximo 30 dias. Antes de aplicar as amostras no gel de sequenciamento, as reações foram descongeladas e aquecidas a 80°C por 3 min para desnaturação.

3.11.4. PREPARO DO GEL DE ACRILAMIDA

O sequenciamento de DNA foi realizado em equipamento Pharmacia com preparação de dois géis, um de concentração 5% e outro de concentração 6%. Numa proveta foram adicionados 25,2 g de uréia, 7,5 ml de acrilamida 40% (para o gel 5%) ou 9,0 ml de acrilamida 40% (para o gel 6%) e 6 ml de TBE 10X (Tris-Borato 0,9 M, EDTA 20 mM). À mistura foi adicionada H₂O até um volume de 60 ml. A seguir, 480 μ l de uma solução de persulfato de amônio (100 μ g/ml) foram adicionados, seguidos de 30 μ l de TEMED (N, N, N', N'- tetrametiletilenodiamina). A solução foi misturada e imediatamente aplicada sobre as placas.

3.11.5. ELETROFORESE VERTICAL DE DNA EM GEL DE ACRILAMIDA

Após o tratamento de desnaturação das amostras, 2 µl de cada reação foram aplicados no gel na ordem GATC. O tampão utilizado na corrida eletroforética foi TBE 1X e a diferença de potencial aplicada foi 2500 V (50 W/placa) durante 2 h no gel 6% e 8 h no gel 5%. Os géis foram expostos a filme de autorradiografia por 2 dias e revelados conforme recomendação do fabricante (Eastman Kodak).

3.12. PRODUÇÃO DE ANTI-SORO POLICLONAL EM COELHOS

A metodologia para a produção de anti-soro policlonal foi utilizada de acordo com o sugerido por Sambrook *et al.*, 1989.

A proteína da subunidade principal da fimbria k88ab (faeG) foi extraída, segundo método já descrito no item 3.9.2., e a seguir separada por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. A região do gel com a proteína foi excisada e homogeneizada, com igual volume de PBS pH 7,4 e de adjuvante Freund (Sigma) completo, através de um sistema conector de seringas. Dois coelhos de 1,5 kg foram seleccionados e 10 ml de sangue retirados para obtenção do soro normal pré-imunização destes animais. Este soro foi conseguido pela centrifugação a 12000 g por 30 s, após o descolamento e retração do coágulo. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e armazenado a -20°C até o momento dos ensaios biológicos. A solução do antígeno homogeneizada foi inoculada intramuscularmente na parte interna das patas trazeiras dos coelhos.

O mesmo procedimento foi realizado após 21 dias do primeiro inóculo utilizando-se adjuvante incompleto de Freund, como estímulo de resposta imune secundária, e repetido por mais 2 vezes a cada 7 dias, ou seja, nos 28º e 35º dias após a primeira inoculação. Decorridos mais 7 dias coletou-se 10 ml de sangue de cada animal para ser analisado quanto ao título de anticorpos produzidos em provas de soroaglutinação em lâmina. O anti-soro policlonal obtido foi absorvido contra a linhagem DH5 α não produtora de fimbria K88ab, e analisado quanto a existência de anticorpos em experimentos de soroaglutinação e "Western blot".

3.13. ABSORÇÃO DO ANTI-SORO POLICLONAL

A amostra bacteriana utilizada como controle positivo DH5 α (pFM205), capaz de expressar a fimbria K88ab, e a amostra controle negativo DH5 α foram inoculadas em placas de Petri com meio BHI ágar, a partir de um pré-inóculo e incubadas a 37°C por 16 h. Uma alíquota de 500 μ l do anti-soro a ser absorvido foi transferida para tubo eppendorf, onde o crescimento bacteriano da placa com DH5 α foi raspado suavemente e adicionado ao anti-soro. O tubo foi incubado a 37°C por 30 min, centrifugado a 12000 g por 2 min e o sobrenadante cuidadosamente transferido para outro tubo. O anti-soro foi analisado quanto à capacidade de aglutinação com a linhagem DH5 α e o procedimento repetido até não ser mais observada soroaglutinação positiva. O anti-soro foi então testado em relação à soroaglutinação com a linhagem DH5 α (pFM205), crescida em meio sólido a 37°C, para ser observada a especificidade.

3.14. SOROAGLUTINAÇÃO DE BACTÉRIAS *Escherichia coli*

As amostras bacterianas foram inoculadas em placas de Petri com meio BHI a partir de um pré-inóculo crescido a 37°C ou a 16°C. As placas foram mantidas nas mesmas condições até crescimento bacteriano adequado. Um raspado de cada amostra bacteriana foi analisada em relação a soroaglutinação frente aos anti-soros brutos, absorvidos e frente a solução salina. Em uma placa de vidro foram adicionados 20 µl de anti-soro ou solução salina e um raspado bacteriano adicionado e homogeneizado com o auxílio de um palito. Após alguns minutos, observou-se a possível ocorrência de grumos de bactérias.

3.15. "WESTERN BLOT"

A metodologia de "western blot" para transferência de proteínas separadas em gel de poliácridamida-SDS foi realizada de acordo com o descrito em Sambrook *et al.*, 1989. Dois géis de poliácridamida idênticos foram submetidos a eletroforese simultaneamente, sendo um utilizado para transferência de proteínas para um filtro de nitrocelulose e outro corado com impregnação pela prata. Este procedimento permitiu a comparação entre o padrão de migração das amostras protéicas e o observado no filtro após a revelação com peroxidase.

O filtro de nitrocelulose foi cortado no tamanho exato ao do gel e colocado em recipiente com H₂O deionizada por 5 min. Dois pedaços de papel Whatman 3MM também foram cortados no tamanho do gel e imersos em tampão de transferência (39 mM glicina, 48 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,037% SDS, 20% metanol). O sistema de transferência foi montado de tal forma que o gel de poliácridamida estivesse em contato com o filtro de nitrocelulose e ambos revestidos externamente pelos papéis Whatman 3MM, sendo estes envolvidos por uma camada esponjosa ("pad") previamente imersa em tampão de transferência.

O sistema foi colocado na cuba de transferência vertical, com o gel mais próximo ao pólo negativo, de forma a permitir a transferência de proteínas ao filtro de nitrocelulose. Uma diferença de potencial foi aplicada para uma corrente elétrica constante de 0,65 mA/cm² (100 mA no total) durante 2 h. O gel foi corado com prata para ser confirmada a eficiência da transferência e o filtro de nitrocelulose imerso em 50 ml de solução bloqueadora (Leite em pó desnatado 5%, Tween 20 0,02%, PBS pH 7,4) por 2 h sob agitação orbital a temperatura ambiente. A seguir, a solução bloqueadora foi substituída por outros 50 ml de nova preparação e acrescentados 50 µl de anti-soro anti-*faeG* absorvido (1:1000). O filtro foi incubado por 18 h sem agitação a 4°C e lavado 3 vezes com PBS pH 7,4 por 10min sob agitação. A seguir, o filtro foi lavado em solução livre de fosfato (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) por 10 min e transferido para outra cuba com 20 ml de solução bloqueadora livre de fosfato (Leite em pó desnatado 5%, Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM), adicionando-se 10 µl (concentração final de 1:2000) de anti-corpo anti-IgG de coelho (Gibco BRL) e incubando-se por 1 h a temperatura ambiente sob agitação. O filtro foi então lavado 4 vezes com solução livre de fosfato por 10 min sob agitação, e transferido para 10 ml de solução substrato para peroxidase (6 mg de Diaminobenzidina, Tris-HCl 0,01 M pH 7,6) com a adição de 10 µl de H₂O₂. O progresso da reação foi monitorado e interrompido por lavagens com H₂O destilada, sendo o filtro, em seguida, fotografado e conservado em PBS pH 7,4 a 4°C, protegido de luz.

4. RESULTADOS

4.1. DETERMINAÇÃO DOS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO ADEQUADOS PARA CLIVAGEM DE PARTE DO FRAGMENTO *faeG*

Os plasmídios pBR322 e pFM205 foram clivados com as enzimas de restrição *DraI*, *HincII* e *EcoRI*. Os fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2% (Figura 6). A presença de um fragmento em torno de 778-pb após clivagem dupla com enzimas *DraI-HincII*, seguido do desaparecimento do mesmo fragmento após a clivagem com *EcoRI*, é um forte indicativo deste ser o gene *faeG*. Observa-se, também na mesma Figura 6, linha 11, que este fragmento pode ser tecnicamente excisado por corte do gel, sem risco de contaminação por outra parte do DNA do plasmídeo.

4.2. PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO REFERENTE AO GENE *faeG*

O fragmento de 778-pb referente ao gene *faeG* clivado do plasmídeo pFM205 pela digestão dupla *DraI-HincII* foi purificado utilizando-se o kit "Gene Clean" (BIO 101 Inc.) conforme descrito no item 3.7.3. A eficiência da purificação foi observada por eletroforese em gel de agarose 1,2% (Figura 7). Observa-se a presença do fragmento de 778-pb, sem o aparecimento de qualquer contaminação por outra parte do DNA.

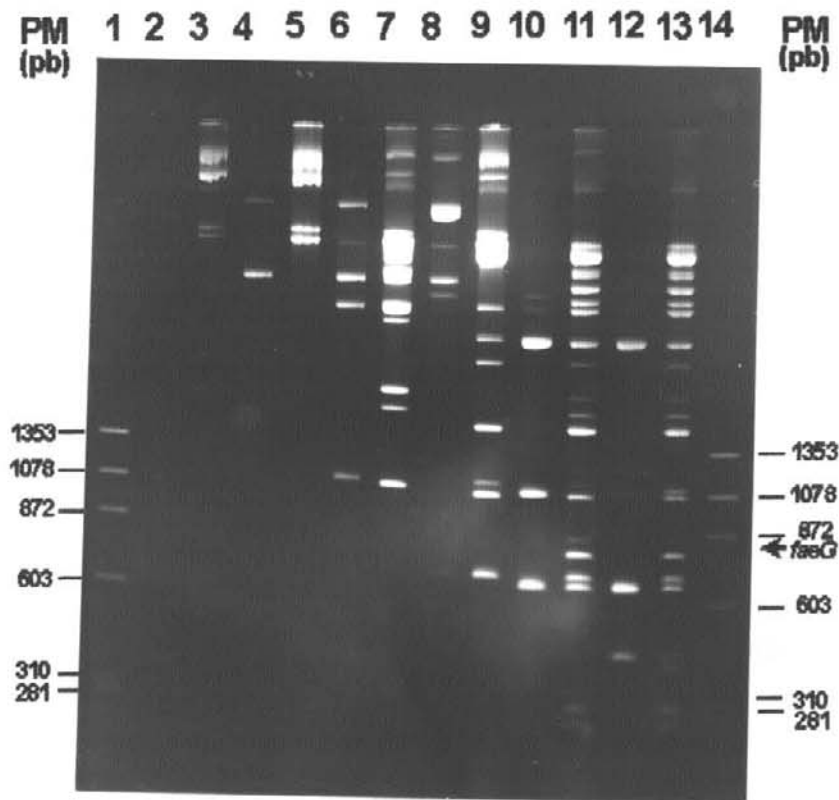


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1,2% dos plasmídios pBR322 e pFM205 clivados com enzimas de restrição para determinação do fragmento *faeG*.

- | | |
|--|---|
| 1- DNA do fago ϕ X174 <i>HaeIII</i> | 8- pBR322 clivado com <i>DraI</i> |
| 2- pBR322 | 9- pFM205 clivado com <i>DraI</i> |
| 3- pFM205 | 10- pBR322 clivado com <i>DraI-HincII</i> |
| 4- pBR322 clivado com <i>EcoRI</i> | 11- pFM205 clivado com <i>DraI-HincII</i> |
| 5- pFM205 clivado com <i>EcoRI</i> | 12- pBR322 clivado com <i>DraI-HincII-EcoRI</i> |
| 6- pBR322 clivado com <i>HincII</i> | 13- pFM205 clivado com <i>DraI-HincII-EcoRI</i> |
| 7- pFM205 clivado com <i>HincII</i> | 14- DNA do fago ϕ X174 <i>HaeIII</i> |

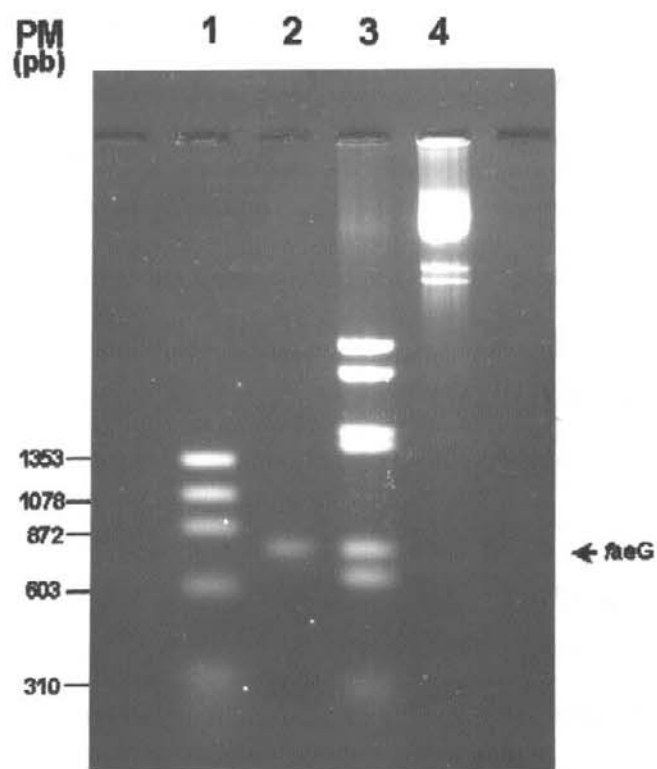


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1,2% para determinação da eficiência de purificação do fragmento *faeG*.

- 1- DNA do fago ϕ x174 clivado com *HaeIII*
- 2- Fragmento *faeG* purificado por "Gene Clean"
- 3- Plasmídeo pFM205 clivado com *DraI-HincII*
- 4- Plasmídeo pFM205

4.3. CLONAGEM DO FRAGMENTO DE 778-pb REFERENTE AO GENE *faeG* NO VETOR PLASMIDIAL pUC18 E ANÁLISE DE TRANSFORMANTES

O fragmento de 778-pb referente ao gene *faeG* purificado por "Gene Clean" após clivagem com enzimas de restrição *DraI* e *HincII*, e o vetor plasmidial pUC18, previamente digerido com enzima de restrição *HincII* e desfosforilado com fosfatase alcalina, tiveram suas extremidades abruptas ligadas conforme métodos descritos nos itens 3.6.1, 3.6.2 e 3.6.3. Uma segunda reação de ligação foi realizada entre vetores desfosforilados, sem a adição do fragmento de 778-pb (*faeG*) a ser inserido, para ser analisada a eficiência da desfosforilação. Os resultados das ligações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 8). A desfosforilação teve uma alta eficiência, pois não houve diminuição da banda referente ao vetor pUC18 linearizado, tampouco o aparecimento de bandas novas de uma possível ligação entre dois ou mais vetores pUC18. Entretanto, observa-se uma banda referente ao vetor pUC18 íntegro mesmo antes da reação de ligação, indicando a ocorrência de digestão parcial da enzima *HincII*. Quanto a inserção do fragmento de 778-pb (*faeG*) nota-se o aparecimento de uma banda nova, possivelmente entre o vetor pUC18 e o fragmento de 778-pb, visto que a banda referente a este último desapareceu após a adição da enzima T⁴ DNA ligase (Figura 8, linhas 4 e 5).

Aliquotas de ambas as reações foram utilizadas para transformar células DH5 α competentes, conforme o método descrito no item 3.8, e transformantes foram selecionados em meio de cultura sólido com a adição do antibiótico ampicilina e de X-Gal (40 μ l/placa da solução estoque de 20 mg/ml). Das 150 colônias brancas isoladas, 20 foram analisadas por extração de DNA plasmidial e apresentaram uma migração menor, quando comparado com o vetor pUC18 íntegro, indicando a provável inserção do fragmento de 778-pb. Destas, 10 colônias foram analisadas por digestão com enzimas de restrição *BamHI*-*HindIII* e observou-se a recuperação tanto do vetor pUC18 quanto do fragmento de 778-pb (Figura 10).

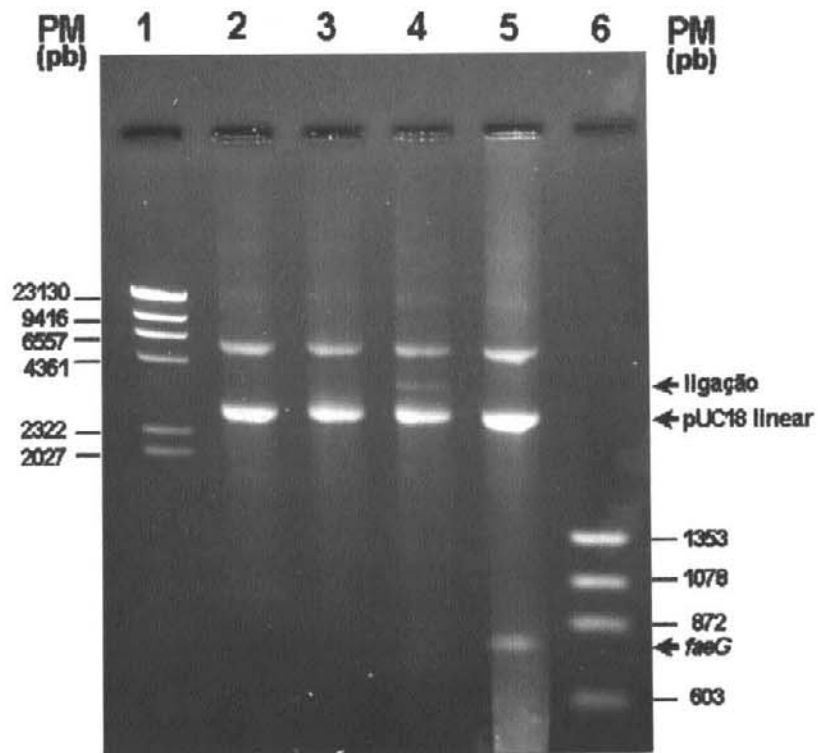


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1% para demonstração da ligação do fragmento *faeG* ao vetor pUC18.

- 1- DNA do fago λ clivado com *HindIII*
- 2- pUC18 clivado com *HincII* e desfosforilado
- 3- Ligação entre vetores pUC18
- 4- Ligação entre o fragmento de 778-pb *faeG* e o vetor pUC18
- 5- Fragmento de 778-pb *faeG* e vetor pUC18 linearizado
- 6- DNA do fago ϕ X174 clivado com *HaeIII*

Entretanto, a digestão destas amostras com a enzima de restrição *Pst*I, para a observação da orientação do fragmento clonado, indicou o posicionamento invertido em relação ao promotor *lac* do vetor pUC18 (resultado não apresentado). Um destes plasmídios obtidos, denominado pSM1, foi extraído em grande escala para a continuidade do trabalho.

4.4. SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO DE PARTE DO FRAGMENTO DE 778-pb (*faeG*) INSERIDO NO PLASMÍDIO pSM1

O sequenciamento nucleotídico de parte do fragmento de 778-pb (*faeG*) foi realizado conforme descrito no item 3.11. Por algum problema técnico, não ocorreu o anelamento do "primer" inverso (BOERINGHER), entretanto, como pode ser observado na Figura 9, a leitura da sequência obtida pelo "primer" universal (PHARMACIA LKB) confirmou a inserção do fragmento de 778-pb (*faeG*) em orientação invertida ao promotor *lac* do vetor pUC18.

```
...5'TGGTTTTACGGTAATTCCGGAAAAATAAGGGTTACCGATTTCAGTTTATTATTTGTGGATATC
AAGGGGTTTAATTTTATGAAAAGACTCTGATTGCACTGGCATTGCTGCATCTGCTGCATCTGGT
ATGGCACATGCCTGGATGACTGGTGATTTC AATGGTTCGGTCGATATCGGTGGTAGTATCACTG
CAGATGATTATCGTCAGAAATGGGAATGGAAAGTTGGTACAGGTCTTAATGGATTGTTGGTAATGT
ATTGAATGACCTGACCAATGGTGGAAACCAAAGTACCATTAA3'...
```

Figura 9. Sequência nucleotídica obtida de parte do fragmento de 778-pb (*faeG*) a partir do "primer" universal, clonado no plasmídio pSM1.

4.5. CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDIO pSM2 COM O FRAGMENTO DE 778-pb (*faeG*) NA ORIENTAÇÃO CORRETA

O plasmídeo pSM1, obtido anteriormente pela inserção do fragmento de 778-pb no vetor pUC18, e o vetor pUC19 foram digeridos com enzimas de restrição *Bam*HI-*Hind*III e os respectivos fragmentos de aproximadamente 805-pb (*faeG*) e 2656-pb (pUC19) foram purificados por "Gene Clean" (BIO 101 Inc.), conforme descrito nos itens 3.6.1 e 3.7.3. Os fragmentos foram ligados como descrito em 3.6.4, e a linhagem DH5 α foi transformada. Das 200 colônias selecionadas por resistência a ampicilina, 20 foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,7% quanto à presença de plasmídios. Destes, 10 plasmídios foram digeridos com enzimas de restrição *Bam*HI-*Hind*III para ser observada a recuperação dos fragmentos originais de 805-pb e 2656-pb. Um dos plasmídeo (pSM2) foi comparado por eletroforese em gel de agarose 1,4% com o plasmídeo pSM1 tratado com as mesmas enzimas e observou-se migração semelhante de fragmentos (Figura 10, linhas 4 e 5). Este plasmídeo pSM2 foi utilizado para continuidade do trabalho.

4.6 DELEÇÃO SÍTIO ESPECÍFICA POR DIGESTÃO ENZIMÁTICA E TRATAMENTO COM KLENOW DNA POLIMERASE

O plasmídeo pSM2, obtido pela clonagem do fragmento de 805-pb (pSM1) no vetor pUC19, foi extraído em grande escala, purificado com o kit "Magic DNA" (Promega) e clivado com a enzima de restrição *Hind*III. A seguir foi feito um tratamento com a enzima Klenow DNA polimerase para a correção do quadro de leitura de códons ("reading frame"), conforme descrito no item 3.6.5.

Das 55 colônias, selecionadas por resistência a ampicilina, após transformação de linhagem DH5α com alíquota obtida pela religação do plasmídio, 10 tiveram seus plasmídios extraídos e foram digeridas com a enzima de restrição *HindIII*. Apenas 2 plasmídios não foram clivados com esta enzima, sendo um selecionado (pSM3) e comparado aos plasmídios pSM1 e pSM2 (Figura 10, linhas 2, 3, 4, 5 e 6).

4.7. INSERÇÃO DE "LINKER" *HindIII* NO PLASMÍDIO pSM3

O plasmídio pSM3, obtido pela deleção do sítio *HindIII* no plasmídio pSM2, foi clivado com a enzima de restrição *HincII*, para a colocação de "linker" *HindIII* na extremidade 3'OH do fragmento de 778-pb (*faeG*), conforme descrito nos itens 3.6.1 e 3.6.6. Das 48 colônias selecionadas por resistência a ampicilina, 10 foram analisadas quanto ao tamanho dos plasmídios apresentados e digeridas com a enzima *HindIII*. Destes, 3 apresentaram a inserção do "linker" *HindIII* e um foi isolado (pSM4) para a continuidade do trabalho. O plasmídio pSM4 foi digerido com enzimas *BstEII*, *BamHI* e *HindIII* e comparado com os plasmídios pSM1, pSM2 pSM3 e pUC19 submetidos as mesmas condições.

O resultado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,4% e demonstrou a clonagem do fragmento de 778-pb (*faeG*) em todos os plasmídios construídos, assim como a existência de sítio *HindIII* nos plasmídios pSM1, pSM2 e pSM4 (Figura 10).

4.8. PRODUÇÃO DE ANTI-SORO POLICLONAL

O anti-soro policlonal anti-FaeG foi produzido pela inoculação, em coelhos, da subunidade principal da fímbria K88ab (FaeG) purificada a partir de uma eletroforese de poliacrilamida-SDS, conforme descrito no item 3.12.

O resultado da soroaglutinação demonstra uma baixa especificidade (resultado não apresentado), provavelmente devido a algum contato prévio dos coelhos com bactérias *Escherichia coli*, uma vez que houve também o reconhecimento do controle negativo DH5 α pelo soro normal pré-imunização do coelho. O anti-soro bruto foi absorvido contra a linhagem DH5 α .

4.9 ABSORÇÃO DO ANTI-SORO POLICLONAL

O anti-soro anti-FaeG produzido pelos coelhos foi absorvido com bactérias *Escherichia coli* da linhagem DH5 α cultivadas a 37°C e com DH5 α (pFM205) cultivada a temperatura de 16°C, conforme descrito no item 3.13. O anti-soro absorvido foi, então, utilizado para detectar proteínas FaeG por "Western blot".

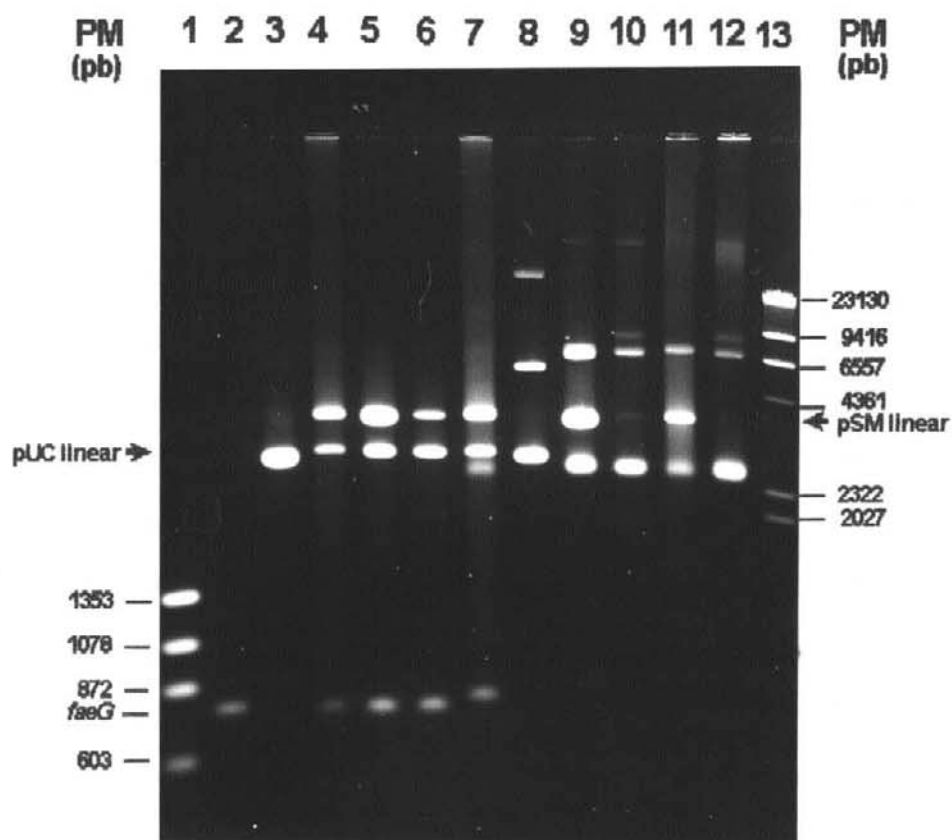


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1,4% para demonstr  o da clonagem do fragmento de 778-pb (*faeG*) nos plasmídios pSM1, pSM2, pSM3 e pSM4 construídos, deleção sítio específica *HindIII* e adição de "linker" *HindIII*

- | | |
|--|--|
| 1- DNA do fago ϕ X174 clivado com <i>HaeIII</i> | 8- pUC19 clivado com <i>HindIII</i> |
| 2- Fragmento de 778-pb (<i>faeG</i>) purificado | 9- pSM2 clivado com <i>HindIII</i> |
| 3- pUC19 clivado com <i>BamHI-HindIII</i> | 10- pSM3 clivado com <i>HindIII</i> |
| 4- pSM1 clivado com <i>BstEII-BamHI</i> | 11- pSM4 clivado com <i>HindIII</i> |
| 5- pSM2 clivado com <i>BstEII-BamHI</i> | 12- Plasmídio pSM4 |
| 6- pSM3 clivado com <i>BstEII-BamHI</i> | 13- DNA do fago λ clivado com <i>HindIII</i> |
| 7- pSM4 clivado com <i>BstEII-BamHI</i> | |

4.10 "WESTERN BLOT"

A extração de proteínas de superfície, totais e de sobrenadante foi obtida das amostras bacterianas DH5 α (controle negativo), DH5 α (pFM205) (controle positivo), e DH5 α (pSM4), na temperatura de 37°C conforme descrito no item 3.9

Numa primeira etapa foi utilizada apenas as proteínas das amostras controle negativo DH5 α e controle positivo DH5 α (pFM205) extraídas da superfície a 37°C frente aos anti-soros bruto, absorvido e normal pré-imunização. A proteína FaeG da fimbria K88ab foi reconhecida pelos anti-soros bruto e absorvido. A amostra controle negativo DH5 α não apresentou nenhum tipo de reconhecimento pelos anti-soros e o soro normal pré-imunização não reconheceu nenhuma proteína de ambos os controles.

Numa segunda etapa, as proteínas de superfície e totais a 37°C extraídas das amostras DH5 α , DH5 α (pFM205), DH5 α (pSM4) e as proteínas precipitadas do sobrenadante da amostra DH5 α (pSM4), cultivada a 37°C, foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (Figura 11) e analisadas por "western blot", conforme descrito nos itens 3.9, 3.10.2 e 3.15., frente ao anti-soro absorvido. Não foi observado reconhecimento da proteína FaeG pelo anti-soro anti-FaeG na amostra pSM4 construída (Figura 12).

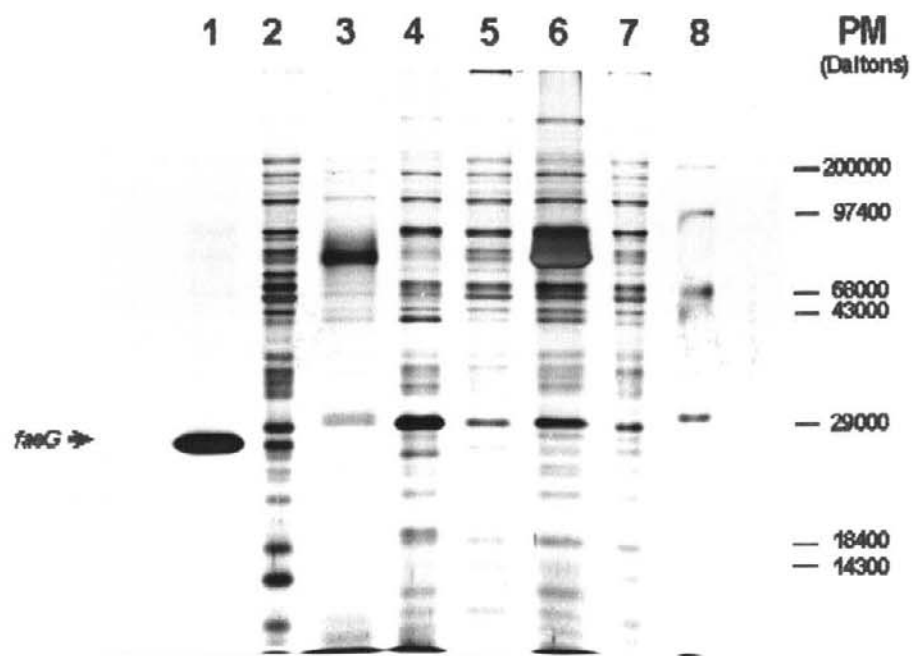


Figura 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12,5% para demonstração do padrão de proteínas transferidas para filtro de nitrocelulose

- | | |
|--|------------------------------------|
| 1- Proteínas de superfície de DH5 (pFM205) | 5- Proteínas totais de DH5 (pSM4) |
| 2- Proteínas totais de DH5 (pFM205) | 6- Proteínas de superfície de DH5  |
| 3- Proteínas do sobrenadante de DH5 (pSM4) | 7- Proteínas totais de DH5  |
| 4- Proteínas de superfície de DH5 (pSM4) | 8- Padrão de peso molecular |

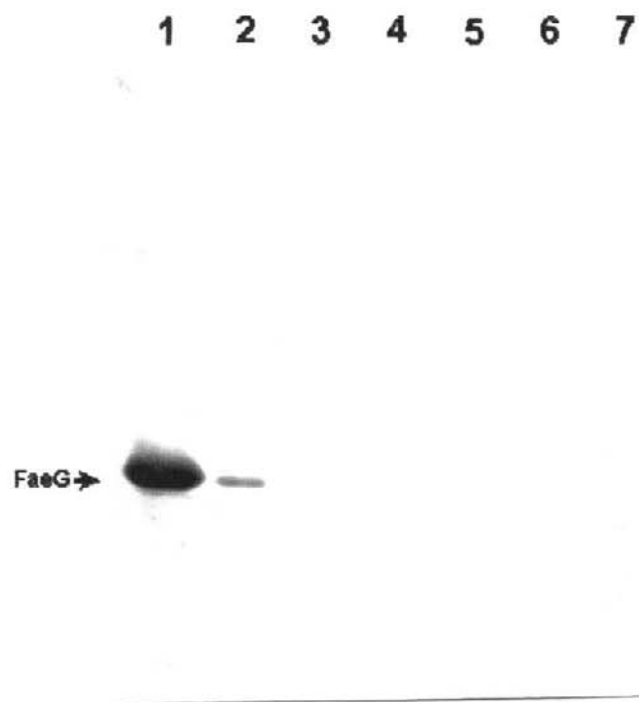


Figura 12. "Western blot" das proteínas separadas por gel de poliacrilamida-SDS reconhecidas por anti-soro anti-faeG policlonal absorvido.

- | | |
|---|--|
| 1- Proteínas de superfície de DH5 α (pFM205) | 5- Proteínas totais de DH5 α (pSM4) |
| 2- Proteínas totais de DH5 α (pFM205) | 6- Proteínas de superfície de DH5 α |
| 3- Proteínas do sobrenadante de DH5 α (pSM4) | 7- Proteínas totais de DH5 α |
| 4- Proteínas de superfície de DH5 α (pSM4) | |

5. DISCUSSÃO

A sequência nucleotídica do gene *faeG* (K88ab) determinada por Gaastra *et al.*, 1981, (Figura 3) foi analisada através do programa DNAsis (Pharmacia LKB) para se detectar a localização dos sítios de restrição de modo a ser escolhida a melhor estratégia de clonagem dentro dos recursos do Laboratório de Biologia Molecular Bacteriana, do Departamento de Microbiologia e Imunologia, UNICAMP. Numa primeira etapa, a clivagem do plasmídeo pFM205 foi realizada com as enzimas de restrição *BstEII* e *HincII*. O gene *faeG* possui um sítio *BstEII* único, anterior a região codificadora da sequência peptídeo sinal, e um sítio único *HincII*, próximo à extremidade 3'OH (Figura 3). Nesta estratégia, o fragmento *faeG* digerido conteria 673-pb dos 855-pb possíveis e incluiria a região codificadora da sequência peptídeo sinal. Entretanto, o fragmento quando digerido, demonstrou possuir um tamanho muito próximo a outra sequência de aproximadamente 640-pb, o que tornou tecnicamente muito difícil sua purificação a partir de excisão da banda no gel de eletroforese, sem que houvesse contaminação pelo outro fragmento de DNA.

Em trabalho anterior, realizado com variantes K88ac e K88ad (Thiry *et al.*, 1989), foi determinada a existência de dois sítios *DraI*, um anterior a região codificadora da sequência peptídeo sinal e um segundo, após o códon de terminação. Como existe grande homologia entre as variantes da fimbria K88, foi estudada a possibilidade de se utilizar esta enzima *DraI* para digestão do plasmídeo pFM205 de modo a ser obtido um fragmento *faeG* que possuísse um tamanho adequado para o isolamento através da purificação por gel de agarose.

Esta estratégia teria uma outra vantagem, devido a enzima *DraI* ser formadora de extremidades abruptas, tornando desta forma desnecessária a utilização da enzima Klenow DNA polimerase. Portanto, um ensaio de digestão do plasmídeo pFM205 foi realizado com enzimas *DraI*, *HincII* e *EcoRI* em reações simples, duplas e triplas para se determinar a ocorrência dos sítios *DraI*. A enzima *EcoRI* possui apenas dois sítios dentro do plasmídeo pFM205, um pertencente ao plasmídeo pBR322 original e outro interno a sequência *faeG*. Deste modo, a enzima *EcoRI* foi utilizada para se detectar o fragmento *faeG* correto como mostra a Figura 6, linhas 11 e 13. O plasmídeo pBR322 foi submetido as mesmas condições para facilitar a detecção de fragmentos que não pertencessem ao operon da fimbria K88ab.

Pelo resultado apresentado no item 4.1 determinou-se que, ao contrário de suas outras variantes, o gene da fimbria K88ab não apresenta os dois sítios para *DraI*, um em cada extremidade da sequência *faeG*, pois não foi observado um fragmento de aproximadamente 950-pb, quando digerido com *DraI*, que desaparecesse ao ser acrescentada a enzima *EcoRI* (Figura 6, linhas 9 e 13). Porém, a existência de um sítio para *DraI* anterior a sequência do peptídeo sinal foi determinada (Figura 6, linhas 9, 11 e 13), e optou-se pela digestão do plasmídeo pFM205 com duas enzimas geradoras de extremidades abruptas, *DraI* e *HincII*, originando um fragmento de 778-pb facilmente purificável por corte de gel de agarose (Figura 7, linhas 2 e 3). Esquematicamente, esta estratégia está demonstrada na Figura 13

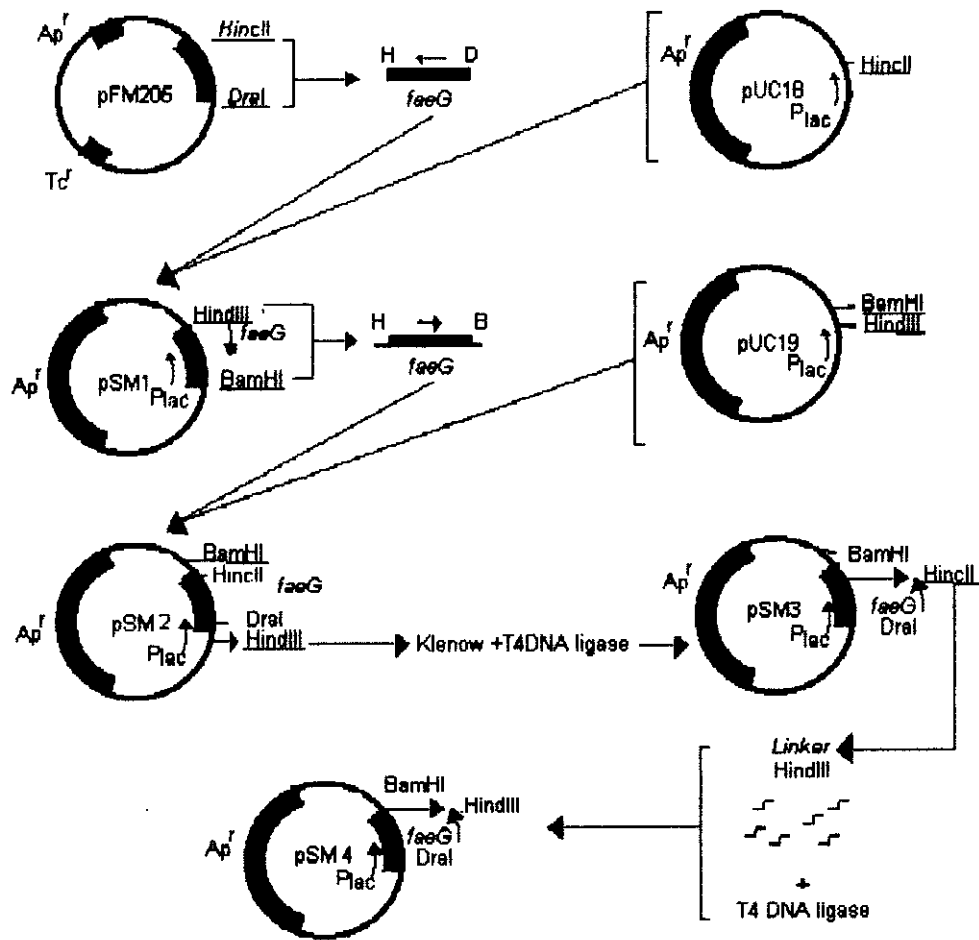


Figura 13. Modelo esquemático demonstrando a estratégia utilizada na construção dos plasmídios pSM1, pSM2, pSM3 e pSM4 na clonagem do fragmento de 778-pb que codifica a subunidade principal da fimbria K88ab

O fragmento purificado foi, então, clonado no vetor pUC18, linearizado em *HincII* e desfosforilado por fosfatase alcalina. Entretanto, pela análise plasmidial das colônias *lac* verificamos que, de alguma forma, só foram obtidos plasmídios com o fragmento de 778-pb inserido em orientação invertida em relação ao promotor *lac*, conforme demonstrado pela digestão com a enzima de restrição *PstI* (resultado não apresentado) e por sequenciamento de nucleotídios (Figura 9). Como o esperado era que houvessem probabilidades iguais de ocorrerem inserções em ambas orientações, visto que em uma ligação entre extremidades abruptas teoricamente não existe preferência entre as mesmas, foi com certa surpresa que observamos apenas a inserção do fragmento em orientação invertida. Optou-se, devido a estes resultados, pela correção da orientação através de uma nova clivagem, desta vez no plasmídio pSM1 com as enzimas *BamHI* e *HindIII*, e clonagem no pUC19 nestes mesmos sítios. A digestão com estas enzimas favorece a retirada do sítio de policlonagem ("polilinker") com o inserto e inversão do fragmento de 778-pb, devido a ordem de ocorrência dos mesmos sítios no vetor pUC19 (Figura 5). A eficiência de ligação esperada era alta, pois os dois sítios utilizados possuíam extremidades coesivas, e de fato entre os transformantes, um plasmídio (pSM2) foi obtido e digerido com enzimas de restrição *BamHI-HindIII*, apresentando o mesmo fragmento de 805-pb (Figura 10, amostra 5).

De acordo com o estudo minucioso das sequências nucleotídicas dos vetores utilizados na clonagem e do gene *faeG*, caso não tivesse ocorrido nenhuma alteração pela manipulação gênica, seria necessária a correção do quadro de leitura da sequência gênica do inserto para que o gene *faeG* pudesse ser expresso a partir do promotor *lac* do pUC19. Esta correção foi realizada pela deleção do sítio *HindIII* da região de policlonagem através da atividade polimerásica da enzima Klenow. A análise de extração plasmidial de colônias transformantes e a digestão enzimática *BstEII-BamHI* e *HindIII* demonstrou que o plasmídio pSM3 apresenta a deleção adequada (Figura 10, linhas 6 e 10).

Este plasmídeo pSM3 foi utilizado para ser inserido no sítio *HincII*, localizado na extremidade 3'OH do fragmento de 778-pb (*faeG*), um "linker" *HindIII* único, de modo a facilitar a clonagem de sequências de interesse, visto que este sítio tem como vantagem sobre a enzima *HincII* o fato de custar menos e de ser clivada originando extremidades coesivas, deste modo facilitando muito a inserção de sequências, especialmente se forem de pequeno tamanho. O plasmídeo pSM4 construído, após análise com enzimas de restrição *BstEII*-*BamHI*, entretanto, parece apresentar multímeros de "linker" *HindIII*, a julgar pelo tamanho do fragmento inserido ser pouco maior que os apresentados nos plasmídios construídos anteriormente (Figura 10, linhas 7 e 12).

O plasmídeo pSM4 está pronto para receber uma sequência que codifique uma proteína pouco imunogênica, como a da toxina STap. Esta sequência será inserida através dos sítios *HindIII* e *BamHI* do plasmídeo pSM4, e caso seja necessário, o quadro de leitura de códons poderá ser corrigido pela deleção do sítio *HindIII*. No entanto, a análise das sequências nucleotídicas envolvidas indicam não haver a necessidade, a menos que tenha ocorrido algum tipo de mutação pela manipulação gênica.

No entanto, para ser utilizada como proteína carreadora, é necessário o estudo de expressão protéica. Com esta finalidade foi produzido um anti-soro a partir da subunidade principal da fímbria K88ab (*FaeG*) purificado através da excisão do gel desnaturante de poliácridamida. Este anti-soro, após ser absorvido, foi utilizado na diluição de 1:1000 em ensaios de "western blot" frente as proteínas de superfície e totais dos controles negativo DH5 α e positivo DH5 α (pFM205) (Figura 12). O anti-soro absorvido reconheceu fortemente a proteína correta (*FaeG*). Portanto os resultados apresentados nas Figuras 11 e 12 confirmam o reconhecimento da proteína *FaeG* no controle positivo DH5 α (pFM205), apesar de observarmos bandas inespecíficas nesta extração, assim como do reconhecimento de outras bandas a partir das amostras pSM4 e DH5 α (proteínas de superfície) (Figura 12)

Este reconhecimento parece ser inespecífico. O aparecimento de reações inespecíficas pode ser devido a problemas no bloqueio de sítios inespecíficos através do uso leite desnatado na técnica de "western blot". Contudo, a maior parte do gene *faeG*, responsável pela codificação da subunidade principal da fímbria K88ab, foi clonado na orientação correta em relação ao promotor *lac*, apesar de não termos observado reconhecimento de bandas na extração de proteínas totais, de superfície e de sobrenadante pelo anti-soro anti-FaeG policlonal absorvido produzido.

A nível genético, como não foi sequenciado o fragmento de 778-pb inserido nos vetor pUC18 (pSM1) em sua totalidade, especialmente a extremidade 5'p, pode ter ocorrido alguma mutação devido a manipulação, impedindo assim a expressão através da modificação do quadro de leitura gênica.

Por outro lado, o gene *faeG* foi clonado sem códon de terminação de transcrição e, portanto, o transcrito pode ser inviável devido ao seu grande tamanho. A sequência foi inserida com parte de sua região promotora e esta região pode, de alguma forma, estar interferindo com o reconhecimento da região promotora *lac*.

A síntese e acúmulo do produto protéico é um processo complexo e de múltiplos passos e pode ser influenciado por vários aspectos, tais como: aumento de número de cópias gênicas, aumento do controle da taxa de transcrição, aumento da taxa de tradução, maior estabilidade das proteínas produzidas, estabilidade dos plasmídios recombinantes, estabilidade do RNA mensageiro, e muitos outros (Venetianer, 1991).

O entendimento da ação destes fatores é de grande importância para o sucesso, não apenas do desenvolvimento de vacinas, mas de todo e qualquer produto que venha a ser produzido pela tecnologia do DNA recombinante. Este trabalho, portanto, não possui um fim em si mesmo, mas está relacionado com outros que estão sendo desenvolvidos e que ainda serão iniciados, com o objetivo de se compreender os mecanismos de patogenicidade bacteriana para animais e obter um sistema carreador de epítopos antigenicos eficiente na estimulação de anticorpos contra proteínas naturais pouco imunogênicas.

6. PERSPECTIVAS

- A continuidade deste trabalho necessita, primeiramente, do sequenciamento completo do fragmento clonado no plasmídio pSM4, para ser determinada a ocorrência de mutações que possam interferir na expressão de uma proteína híbrida.
- O fragmento inserido deve ser clivado em *HindIII* para retirar possíveis multímeros de "linker" *HindIII*, e deve ser acrescentada a sequência gênica ativa da toxina STap com o códon de terminação de transcrição. Esta sequência já foi sintetizada por oligonucleotídeos e possui sítios *HindIII* e *BamHI* em suas extremidades. A partir desta fusão gênica, a proteína produzida pode ter sua expressão monitorada por eletroforese em gel de poliácridamida-SDS, e determinação da localização exata por "western blot" através do anti-soro produzido.
- O gene híbrido pode ser transferido para um vetor de expressão que possua outro promotor, por exemplo *lac*, de modo a aumentar a produção da proteína, como foi demonstrado num estudo onde se obteve uma hiperexpressão do gene da toxina ST2 de *Escherichia coli* (Dwarakanath, 1989). Este gene pode também ser transferido para linhagens atenuadas de *Salmonella typhimurium*, que apresentam a vantagem de estimular uma resposta imunológica humoral e celular, mesmo para proteínas não exportadas, como já foi observado para a proteína β -galactosidase (Brown *et al.*, 1987).
- A capacidade imunogênica deve ser avaliada "in vivo", primeiramente com modelos animais (camundongos ou ratos) e posteriormente com os hospedeiros naturais (suínos).

7. RESUMO

A bactéria *Escherichia coli* é o microrganismo anaeróbico facultativo predominante da flora normal de mamíferos e aves, desempenhando papel importante na manutenção da fisiologia intestinal (Drasar & Hill, 1974). Entretanto, algumas linhagens podem apresentar fatores de virulência tornando-se muitas vezes patogênicas ao hospedeiro.

O grupo de *Escherichia coli* enterotoxigênica é um dos agentes infecciosos principais nas diarreias humanas e de animais, provocando cerca de um terço dos casos em leitões recém-nascidos (Soderling & Mollby, 1978).

A patogenicidade destas amostras está ligada a produção de diferentes fatores de virulência, como por exemplo, fímbrias e toxinas. Uma das fímbrias mais comuns encontradas em *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) para suínos é a K88 (F4). Dentre as toxinas associadas a esta infecção, a termo-estável e pouco imunogênica ST-I, predomina.

A mortalidade aliada à perda de peso dos animais sobreviventes respondem por altos prejuízos econômicos no Brasil e no exterior.

A tecnologia do DNA recombinante tem sido utilizada nos principais núcleos de pesquisa em desenvolvimento de vacinas, para se obter produtos seguros e de alta eficiência imunológica. A construção de carreadores antigênicos e a utilização de agentes molecularmente atenuados são dois dos enfoques mais promissores dessa linha de pesquisa.

Neste trabalho, o gene da subunidade principal da fímbria K88ab (*faeG*) de *Escherichia coli* foi clonado no vetor pUC19 próximo ao promotor *lac*, para ser utilizado como carreador de sequências antigênicas de interesse. Modificações moleculares foram necessárias para correção do código de leitura e inserção de sítio de clonagem HindIII.

O anti-soro policlonal anti-FaeG produzido com a subunidade principal da fimbria K88ab apresentou boa especificidade quando analisado por "western blot", sem entretanto reconhecer a expressão do gene *faeG* clonado.

A utilização de outros promotores e a inserção de uma sequência nucleotídica codificadora da toxina ST-I, apresentando códon de terminação, estão entre os próximos passos a serem realizados para que nossos objetivos sejam concretizados.

8. SUMMARY

As the predominant species among the facultative anaerobic normal gut flora of mammal and avian, *Escherichia coli* plays an important role in maintaining normal gut physiology (Draser & Hill, 1974). However, some strains can express virulence factors as an adaptive behaviour to intraspecific competition and be host-pathogenic.

The group of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is the main infection agent in humans and animals diarrhea, causing more than thirty percent of cases in neonatal piglets around world (Soderling & Mollby, 1978).

These strains are pathogenic because of the expression of different virulence factors, like fimbriae and toxins. One of the most common fimbrial antigen present in porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is K88 (F4). The main toxin produced by this type of *Escherichia coli* is the poor immunogenic heat-stable toxin (ST-I).

Recombinant DNA technology have been used in many centers of vaccine development around world to produce a secure and a highly immunologic efficient vaccine. Construction of antigenic carriers and molecular attenuated strains are promising research lines

Escherichia coli K88ab structural gene was cloned in pUC19 vector beside *lac* promoter to be used as antigenic epitopes carrier. Molecular modifications were necessary for reading frame correction and cloning sites insertion.

Polyclonal antiserum anti-FaeG was produced with main subunit K88ab being inoculated in rabbits. This serum presented high specificity with original antigen in western blot. However, they didn't recognize cloned *faeG* gene expression.

Use of another promoter and ST-I gene insertion with stop codon are next steps in this project.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACRES, D. S.; ISAACSON, R. E.; BABICK, L. A. & KAPITANY, R. A. 1979. Immunization of calves against enterotoxigenic colibacillosis by vaccination dams with purified K99 antigen and whole cell bacterins. **Infect. Immun.** 25: 121-126.
- BAK, A. L.; CHRISTIANSEN, G.; CHRISTIANSEN, C.; STENDERUP, A.; ORSKOV, I. & ORSKOV, F. 1972. Circular DNA molecules controlling synthesis and transfer of the surface antigen (K88) in *Escherichia coli*. **J. Gen. Microbiol.** 73: 373-385.
- BERTIN, Y.; GIRARDEAU, J. P.; VARTANIAN, M. D. & MARTIN, C. 1993. The ClpE protein involved in biogenesis of the CS31A capsule-like antigen is a member of a periplasmatic chaperone family in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol. Letters** 108: 59-68.
- BERTSCHINGLER, H. U. & POHLENZ, J. 1984. Coliform mastitis. In: Disease in Swine, 5th ed., cap. 46, pp. 491-496, Iowa State University Press.
- BETTLEY, M. J.; MILLER, V. L. & MIKELANOS, J. J. 1986. Genetic of bacterial enterotoxins. **Ann. Rev. Microbiol.** 40: 577-608.
- BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acid Res.** 7: 1513-1523.
- BLUM, H.; BIER, H. & GROSS, H. J. 1987. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Eletroforesis** 8: 93-99.
- BROWN, A.; HORMAECHE, C. E.; DEMARCO DE HORMAECHE, R.; WINTHER, M.; DOUGAN, G.; MASKELL, D. J. & STOCKER, B. A. D., 1987. An attenuated *aroA* *Salmonella typhimurium* vaccine elicits humoral and cellular immunity to cloned β -galactosidase in mice. **J. Infect. Dis.** 155: 86-92.
- CHAN, S. K. & GIANNELLA, R. A. 1981. Amino acid sequence of heat-stable enterotoxin produced by *E. coli* pathogenic for man. **J. Biol. Chem.** 256: 7744-7746.

- CHATFIELD, S. N.; FAIRWEATHER, N.; CHARLES, I.; PICKARD, D.; LEVINE, M.; HONE, D.; POSADA, M.; STRUGNELL, R. A. & DOUGAN, G., 1992. Construction of a genetically defined *Salmonella typhi* Ty2 aroA, aroC mutant for the engineering of a candidate oral typhoid-tetanus vaccine. **Vaccine**, **10**: 53-60.
- CHATFIELD, S. N.; STRUGNELL, R. A. & DOUGAN, G., 1989. Live *Salmonella* as vaccines and carriers of foreign antigenic determinants. **Vaccine** **7**: 485-598.
- CLEMENTS, J. D.; EL-MORSHIDY, 1984. Construction of a potential live oral bivalent vaccine for typhoid fever and cholera-*Escherichia coli*-related diarrhea. **Infect. Immun.** **46**: 564-569.
- CLEMENTS, J. D.; LYON, F. L.; LOWE, K. L.; FARRAND, A. L. & EL-MORSHIDY, 1986. Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella enteridis* containing a recombinant plasmid which codes for production of the B subunit of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin. **Infect. Immun.** **53**: 685-692.
- CLEMENTS, J. D.; YANCEY, R. J. & FINKELSTEIN, R. A. 1980. Properties of homogenous heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** **29**: 91-97.
- CONTREPOIS, M. & GIRARDEAU, J. P. 1985. Additive protective effects of colostral antipili antibodies in calves experimentally infected with enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** **50**: 847-849.
- DALLAS, W. S. & FALKOW, S. 1980. Amino acid sequence homology between *cholerae* toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin. **Nature** **288**: 499-501.
- de GRAAF, F. K. 1990. Genetics of adhesive fimbriae of intestinal *Escherichia coli*. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** **151**: 29-53.
- de GRAAF, F. K.; KRENN, B. E. & KLASSEN, 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. 1982. Production, purification and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from the calf enteropathogenic *Escherichia coli* strains B41M. **Infect. Immun.** **36**: 751-753.

- DRASAR, B. S. & HILL, M. J. 1974. Human intestinal flora. The distribution of bacterial flora in the intestine. London, Academic Press, pp. 36-43.
- DWARAKANATH, P.; VISWESWARIAH, S. S.; SUBRAHMANYAM, Y. V. B. K.; JAGANNATHA, H. M. & BALGANESH, T. S. 1989. Cloning and hyperexpression of a gene encoding the heat-stable toxin of *Escherichia coli*. **Gene** **81**: 219-226.
- DYKES, C. W.; HALLIDAY, I. J.; HOBDEN, A. N.; READ, M. J. & HARFORD, S. 1985. A comparison of the nucleotide sequence of the A subunit of heat-labile enterotoxin and *cholerae* toxin. **FEMS Microbiol. Letters** **26**: 171-174.
- EVANS, D. G. & EVANS, D. J. 1978. New surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFAI) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O6 and O8. **Infect. Immun.** **21**: 638-647.
- EVANS, D. G.; SILVER, R. P.; EVANS, D. J.; CHASE, D. G. & GORBACH, S. L. 1975. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. **Infect. Immun.** **12**: 656-667.
- FAIRBROTHER, J. M.; LARIVIERE, S. & LALLIER, R. 1986. New fimbrial antigen F165 from *Escherichia coli* serogroup O115 strains isolated from piglets with diarrhea. **Infect. Immun.** **51**: 10-15.
- FIELD, M.; GRAF, L. H.; LAIRD, W. J. & SMITH, P. L. 1978. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cGMP concentration, and ion transport in small intestine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **75**: 2800-2804.
- FORMAL, S. B.; BARON, L. S.; KOPECKO, D. J.; WASHINGTON, O.; POWELL, C. & LIFE, C. A., 1981. Construction of a potential bivalent vaccine strain: introduction of *Shigella sonnei* form I antigen genes into the galE *Salmonella typhi* Ty21a typhoid vaccine strain. **Infect. Immun.** **34**: 746-750.
- FRANCIS, D. H. & WILLGOHS, J. A. 1991. Evaluation of a live avirulent *Escherichia coli* vaccine for K88⁺, LT⁺ enterotoxigenic colibacillosis in weaned pigs. **Am. J. Vet. Res.** **52**: 1051-1055.

- FRANTZ, F. C.; JASO-FRIEDMAN, L. & ROBERTSON, D. C. 1984. Binding of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to rat intestinals cells and brush border membranes. **Infect. Immun.** **43**: 622-630.
- FRANTZ, J. C. & ROBERTSON, D. C. 1981. Immunological properties of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins: development of radioimmunoassay specific of heat-stable enterotoxins with suckling mouse activity. **Infect. Immun.** **33**: 193-198.
- GAASTRA, W. & de GRAAF, F.K. 1982. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Microbiol. Rev.**, **46**: 129-161.
- GAASTRA, W.; MOOI, F.R.; STURJE, A.R. & de GRAAF, F.K. 1981. The nucleotide sequence of the genes encoding the K88ab protein subunit of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS. Microbiol. Lett.** **12**: 41-46.
- GARIEPY, J.; JUD, A. & SCHOOLNIK, G. K. 1987. Importance of disulfide bridges in the struture and activity of *Escherichia coli* enterotoxin ST-Ib. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **84**: 8907-8911.
- GARIEPY, J.; LANE, A.; FRAYMAN, F.; WILBUR, D.; ROBIEN, W.; SCHOOLNIK, G. K. & JARDETZKI, O. 1986. Struture of the toxin domain of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin ST-I. **Biochem.** **25**: 7854-7866
- GARIEPY, J. & SCHOOLNIK, G. K. 1986. Design of a photoreactive analogue of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin ST-Ib: use in identifying its receptor on rat brush border membranes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **83**: 483-487.
- GATTI, M. S. V.; SERAFIM, M. B.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; BRITO, J. R. F. & BARCELOS, D. E. S. N. 1985. Fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênicas para suínos no Brasil. **Rev. Microbiol.** **16**: 21-30.
- GIANELLA, R. A.; DRAKE, K. W. & LUTRELL, M. 1981. Development of a radioimmunoassay for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin:comparision with the suckling mouse bioassay. **Infect. Immun.** **33**: 186-192

- GILL, D. M.; & RICHARDSON, S. H. 1980. Adenosine diphosphate-ribosylation cyclase catalysed by heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* **33**: 677-682.
- GREEN, B. A.; NEILL, R. J.; RUYECHAN, W. T. & HOLMES, R. U. 1983. Evidence that new enterotoxin of *Escherichia coli* which activates adenylate cyclase in eucariotic target cells is not plasmid mediated. *Infect. Immun.* **42**: 393-390.
- GUERRANT, R. L.; HUGHES, J. M.; CHANG, B.; ROBERTSON, D. C. & MURAD, F. 1980. Activation of intestinal guanylate cyclase by heat-stable enterotoxin of *E. coli*. Studies of tissue specificity, potential receptors, and intermediates. *J. Infect. Dis.* **142**: 220-228.
- GUINÉE, P. A. M. & JANSEN, W. H. 1979. Detection of enterotoxigenicity and attachment factors in *Escherichia coli* strain of human, porcine and bovine origin: a comparative study. *Zentralb. Bacteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. Reihe A.*, **243**: 245-247.
- GUTH, B. E. C.; TWIDDY, E. M.; TRABULSI, L. R. & HOLMES, R. K. 1986. Variation in chemical properties and antigenic determinants among type II heat-labile enterotoxin of *E. coli*. *Infect. Immun.* **54**: 529-536.
- GUZMAN, C. A.; WALKER, M. J.; ROHDE, M. & TIMMIS, K. N., 1991. Direct expression of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* aroA. *Infect. Immun.* **59**: 3787-3795.
- HINSON, G. & WILLIAMS, P. H. 1989. Adhesins of pathogenic *Escherichia coli*. In: HOPWOOD, D. A. & CHARTER, K. E. Genetics of Bacterial Diversity, cap. 14, pp.287-307, Academic Press limited, London, U.K.
- HOLMES, R. K.; TWIDDY, E. M. & PICKETT, C. L. 1986. Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of *E. coli*. *Infect. Immun.* **53**: 464-477.
- HOLMGREN, J. 1973. Comparison of the tissues receptors for *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins by means of gangliosides and natural cholerae toxoid. *Infect. Immun.* **8**: 851-859.

- HOLMGREN, J.; FREDMAN, P.; LINDBALD, M.; SVENNERHOLM, A. M. & SVENNERHOLM, L. 1982. Rabbit intestinal glycoprotein receptor for *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin lacking affinity for cholerae toxin. **Infect. Immun.** **38**: 424-43.
- HONDA, T.; ARITA, M. & MIWATANI, T. 1984. Characterization of new hydrophobic pill of human enterotoxigenic *Escherichia coli*: a new colonization factor. **Infect. Immun.** **43**: 959-965.
- HONE, D.; ATTRIDGE, S.; van den BOSCH, L. & HACKETT, J. 1988. A chromosomal integration system for stabillization of heterologous genes in *Salmonella* based vaccine strains. **Microbial Pathog.** **5**: 407-418.
- HONE, D.; MORONA, R.; ATTRIDGE, S. & HACKETT, J., 1987. Construction of defined galE mutants of *Salmonella* for use as vaccines. **J. Infect. Dis.** **156**: 167-174.
- HUGHES, J.M.; MURAD, F.; CHANG, B. & GUERRANT, R.L. 1978. Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. **Nature**, **271**: 755-756.
- ISAACSON, R. E. 1985. Development of vaccines for bacterial disease using recombinant DNA technology. **Avian Dis.** **30**: 28-36.
- KAPER, J. B. & LEVINE, M. M. 1988. Progress towards a vaccine against enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Vaccine** **6**: 197-199.
- KAUFMAN, P. E. 1981. Production and evaluation of antibody to the heat-stable enterotoxin from a human strain of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.** **42**: 611-614.
- KENNEDY, D. J.; GREENBERG, R.N.; DUNN, J. A.; ALBERTHY, R.; RYERSE, J. S. & GUERRANT, R. L. 1984. Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STb on the intestine of mice, rats, rabbits and piglets. **Infect. Immun.** **46**: 639-646.
- KLEMM, P. 1981. The complet aminoacid sequence of the K88 antigen, a fimbrial protein from *Escherichia coli*. **Eur. J. Biochem.** **117**: 617-627.

- KLEMM, P. 1986. Two regulatory *fim* genes , *fimB* and *fimE*, control the fase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. **EMBO J.** 5: 1389-1393.
- KLEMM, P. & EDEGAARD, L. 1990. Fimbrial of *Escherichia coli* as carrier of heterologous antigenic sequences. **Res. Microbiol.** 141: 1013-1017
- KLIPSTEIN, F. A.; ENGERT, R. F. & CLEMENTS, J. D. 1982. Development of a vaccine of cross-linked heat-stable and heat-labile enterotoxins that protects against *Escherichia coli* producing either enterotoxins. **Infect. Immun.** 37: 550-557.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of strutral proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685.
- LEE, C. H.; MOSELEY, S. L.; MOON, H. W.; WHIPP, S. C.; GYLES, C. L. & SO, M. 1983. Characterization of the gene encoding heat-stable toxin II and preliminary molecular epidemiological studies of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin II producers. **Infect. Immun.** 42: 264-268.
- LEVINE, M. M. 1984. *Escherichia coli* infections. In: Bacterial Vaccines, cap. 7 pp. 187-235, London, Academic Press.
- LEVINE, M. M. 1987. *Escherichia coli* that causes diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroaderent. **J. Infect. Dis.** 155: 377-389.
- LEVINE, M. M.; KAPER, J. B.; BLACK, R. E. & CLEMENTS, M. L. 1983. New Knowledge of pathogenesis of bacterial enteric infeccion as aplyed to vaccine development. **Microbiol. Rev.** 47: 510-550.
- MATHEWSON J. J.; JOHNSON, P. C.; DU PONT, H. L. SATTERWHITE, T. K. & WINDSOR, D. K. 1986. Pathogenicity of enteroaderent *Escherichia coli* in adult volunteers. **J. Infect. Dis.** 154: 524-527.
- MATHEWSON, J. J.; JOHNSON, P. C.; DU PONT, H. L.; MORGAN, D. R.; THORTON, S. A.; WOOD, L. V. & ERICSSON, C. D. 1985. A newly recognized cause of traveller's diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli* . **J. Infect. Dis.** 151: 471-475.

- MOOI, F. R. & de GRAAF, F.K. 1985. Molecular biology of fimbriae from enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, **118**: 119-138.
- MOOI, F. R.; de GRAAF, F.K. & van EMBDEN, J.D.A. 1979. Cloning, mapping and expression of the genetic determinant that codifiqued for the K88ab antigen. **Nucleic Acid Res.**, **6**: 849-865.
- MOOI, F. R.; HARMS, N.; BAKKER, D. & de GRAAF, F.K. 1981. Organization and expression of genes involved in the production of the K88ab antigen. **Infect. Immun.**, **32**: 1155-1163.
- MOOI, F. R.; WOUTERS, C.; WIJFJES, A. & de GRAAF, F.K. 1982. Construction and characterization mutants impaired in the biosynthesis of the antigen. **J. Bacteriol.**, **150**: 512-521.
- MOON, H. W. 1981. Protection against enteric colibacillosis in pigs suckling orally vaccinated dams: evidence for pili as protective antigens. **Am. J. Vet. Res.** **42**: 173-177.
- MOON, H. W.; ROGERS, D. J. & ROSE, R. 1988. Effects of an orally administered live *Escherichia coli* pillus vaccine on duration of lacteal immunity to enterotoxigenic *Escherichia coli* in swine. **Am. J. Vet. Res.** **49**: 2068-2071.
- MORGAN, R. L.; ISAACSON, R. E.; MOON, H. W.; BRINTON, C. C. & TO, C. C. 1978. Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic *Escherichia coli* induced diarrheal disease by vaccination dams with purified 987p or K99 pili: protection correlates with pillus homology of vaccine and challenge. **Infect. Immun.** **22**: 771-777.
- MOSELEY, S.L.; HARDY, J.W.; ECHEVERRIA, P. & FALKOW, S. 1983. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **39**: 1167-1174.

- NAGY, B.; MOON, H. W. & ISAACSON, R. E. 1976. Colonization of porcine small intestine by *Escherichia coli* : ileal colonization and adhesion by pig enteropathogens that lack K88 antigens by some capsular mutants. **Infect. Immun.** **13**: 1214-1220.
- NAGY, B.; MOON, H. W.; ISAACSON, R. E.; ITO, C. C. & BRINTON, C. C. 1978. Immunization of suckling pigs enteric enterotoxigenic *Escherichia coli* infection by vaccination dams with purified pili. **Infect. Immun.** **21**: 269-274.
- NIELSEN, N. O. 1984. Edema disease. In: Disease in Swine, 5th ed., cap. 45, pp. 478-490, Iowa State University Press.
- NORGREN, M.; NORMAK, S.; LARK, N.; O'HANLEY, P.; SCHOOLNIK, G.; FALKOW, S.; SVENBORG-EDEN, C.; BAGA, M. & UHLIN, B. E. 1984. Mutation in *Escherichia coli* cistrons affecting adhesion to human cells do not abolish Pap pili fiber formation. **EMBO J.** **3**: 1159-1165.
- ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; SMITH, H.W.; & SOJKA, W.J. 1975. The establishment of K99, a thermo-labile, transmissible *Escherichia coli* K antigen, previously called "Kco", possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. **Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B.**, **83**: 31-36.
- ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; SOJKA, W. J. & WITTING, W. 1964. K antigens K88^{ab} (L) and K88^{ac} (L) in *Escherichia coli* . A new O antigen: O147 and a new K antigen: K88 (B). **Acta. Pathol. Microbiol. Scand.** **62**: 439-477.
- OUDEGA, B.; de GRAFF, M.; de BOER, L. ; BAKKER, D.; VADER, C. E. M.; MOOI, F. R. & de GRAAF, F. K. 1989. Detection and identification of faeC as a minor component of fimbriae of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, **3**: 645-652.
- PEDERSEN, P. A ; ANDERSEN, L. N. 1991. Deletion and duplication of specific sequences in the K88^{ab} fimbrial subunit protein from porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Mol. Gen. Genet.**, **229**: 285-291.
- PICKETT, C. L.; TWIDDY, E. M.; BELISLE, B. W. & HOLMES, R. K. 1986. Cloning of genes that encode a new heat-labile enterotoxin of *E. coli*. **J. Bacteriol.** **165**: 348-352.

- POIRIER, T. P.; KEHOE, M. A.; & BEACHEY, 1988. Protective immunity evoked by oral administration of attenuated *aroA Salmonella typhimurium* expressing cloned streptococcal M protein. **J. Exp. Med.** **168**: 25-32.
- PORTER, P.; KENWORTHY, R. & ALLEN, W. D. 1974. Effect of oral immunization with *Escherichia coli* antigens on postweaning enteric infection in the young pig. **Vet. Rec.** **95**: 99-104.
- RUNNELS, P. L.; MOSELEY, S. L. & MOON, H. W. 1987. F41 pili as protective antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* that produce F41, K99 or both pilus antigens. **Infect. Immun.** **55**: 555-558.
- RUTTER, J. M. & JONES, G. W. 1973. protection against enteric disease caused by *Escherichia coli* - a model for vaccination with a virulence determinant? **Nature** **242**: 531-532.
- SAARILAHTI, H. T.; PALVA, E. T.; HOLMGREN, J. & SANCHEZ, J. 1989. Fusion of genes encoding *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and outer membrane protein OmpC. **Infect. Immun.** **57**: 3663-3665.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2ed. New York, Cold Spring Harbor Press
- SCHÖDEL, F. & WILL, H., 1989. Construction of a plasmid for expression of foreign epitopes as fusion proteins with subunit B of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Infect. Immun.** **57**: 1347-1350.
- SCOTLAND, S. M. 1988. Toxins. **J. Appl. Bacteriol.** **5**: 1055-1295.
- SHIMONISHI, Y.; HIDAKA, Y.; KOIZUMI, M.; HANE, M.; AIMOTO, S.; TAKEDA, T.; MIWATANE, T. & TAKEDA, Y. 1982. Mode of disulfide bond formation of a heat-stable enterotoxin (STh) produced by a human strain of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEBS Letters** **215**: 165-170.
- SHIPLEY, P. L.; GYLES, C. L. & FALKOW, S. 1978. Characterization of plasmids that encode for the K88 colonization antigen. **Infect. Immun.** **20**: 559-560.

- SMITH, H. H. & GYLES, G. L. 1976. The relationship between two apparently different enterotoxin produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. **J. Med. Microbiol.** **3**: 387-401.
- SMITH, H. W.; & PARSELL, L. 1975. Transmissible substrate utilizing ability in Enterobacteriaceae. **J. Med. Microbiol.** **87**: 129-140.
- SMITH, N. W. & SACK, R. B. 1973. Immunologic cross-reactions of enterotoxins from *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. **J. Infect. Dis.** **127**: 164-170.
- SODERLING, O. & MOLLBY, R. 1978. Studies on *Escherichia coli* in pigs. V. Determination of enterotoxigenicity and frequency of O group and K88 antigen in strains from 200 piglets with neonatal diarrhoea. **Zentralb. Veterinärmed. Reihe.** **25**: 719-728.
- SOJKA, W. J. 1965. *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. Review series n°7. Commonwealth Bureau of Animals Health, Welbridge.
- SOJKA, W. J.; WRAY, C. & MORRIS, J. A. 1978. Passive protection of lambs experimental enteric colibacillosis by colostral transfer of antibodies from K99- vaccinated ewes. **J. Med. Microbiol.** **11**: 493-499.
- STEVENSON, A. J. 1963. Coliform infection in the young pig and a practical approach to the control of enteritis. **Vec. Rec.** **75**: 1241-1246.
- STEVENSON, G. & MANNING, P. A. 1985. Galactose epimeraseless (GalE) mutant G30 of *Salmonella typhimurium* is a good potential live oral vaccine carrier for fimbrial antigens. **FEMS Microbiol. Letters.** **28**: 317-321.
- STRUGNELL, R. A.; MASKELL, D.; FAIRWEATHER, N.; PICKARD, D.; COCKAYNE, A.; PENN, C. & DOUGAN, G., 1990. Stable expression of foreign antigens from the chromosome of *Salmonella typhimurium* vaccine strains. **Gene.** **88**: 57-63.
- TACKET, C. O.; MANEVAL, D. R.; LEVINE, M. M. 1987. Purification, morphology, and genetics of a new fimbrial putative colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* O159:H4. **Infect. Immun.** **55**: 1063-1069.

- THIRY, G; CLIPPE, A; SCARCEZ, T. & PETRE, J. 1989. Cloning of DNA sequences encoding foreign peptides and their expression in the K88 pili. **Appl. Environ. Microbiol.**, **55**: 984-993.
- THOMAS, L. V.; CRAVIOTO, A ; SCOTLAND, S. M. & ROWE, B. 1982. New fimbrial antigen type (E8775) that may represent a colonization factor in *Escherichia coli* in humans. **Infect. Immun.** **35**: 1119-1124.
- THOMPSON, M. R. & GIANELLA, R. A. 1985. Revised amino acid sequence for a heat-stable enterotoxin produced by an *Escherichia coli* strain (18D) that is pathogenic for humans. **Infect. Immun.** **47**: 834-836.
- TITE, J. P.; GAO, X. M.; HUGHES-JENKINS, C. M.; LIPSCOMBE, M.; O'CALLAGHAN, D.; DOUGAN, G. & LIEW, F. Y. , 1990. Anti-viral immunity induced by recombinant nucleoprotein to the immune system using attenuated *Salmonella typhimurium* as a live carrier. **Immunol.** **70**: 540-546.
- van DIE, I.; van MEGEN, I.; HOEKSTRA, W & BERGANS, H. 1989. Molecular organization of the genes involved in the production of fimbrial, causing manose resistant hemagglutination of a uropathogenic *Escherichia coli* O6:K2:H1:F7 strains. **Mol. Gen. Genet.** **194**: 528-533.
- van DOORN, J.; OUDEGA, B ; MOOI, F. R. & de GRAAF, F. K. 1982. Subcellular localization of polypeptides involved in the biosynthesis of K88 fimbriae. **FEMS Microbiol. Letters** **13**: 99-104.
- VENETIANER, P. 1991. Possibilities of increasing the expression of cloned foreign genes in *Escherichia coli*. **Acta Biotechnol.** **11**: 129-133.
- VIEIRA, J. & MESSING, J. 1982. The pUC plasmids, and M13mp-7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with syntetic universal primer. **Gene** **19**: 259-268.
- WEIKEL, C. S.; NELLANS, H. N. & GUERRANT, R. L. 1986. *In vivo* and *in vitro* effects of a novel enterotoxin STb, produced by *E. coli*. **J. Infect. Dis.** **153**: 893-901.

- WHIPP, S.; MOON, H. W. & ARGENZIO, R.A. 1981. Comparision of enterotoxic activities of a heat-stable enterotoxin from class 1 an class 2 *Escherichia coli* of swine origen. **Infect. Immun.**, **31**: 245-251.
- WILSON, M. R. 1984. Enteric colibacillosis. In: Disease in Swine, 5th ed. , cap. 44, pp. 471-477, Iowa State University Press.
- WILSON, R. A. & FRANCIS, D. H. 1986. Fimbriae and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with colibacillosis. **Am. J. Vet. Res.** **47**: 213-217.
- YAMAMOTO, T.; GORJOBORI, T. & YOKOTO, T. 1987. Evolutionary origin of pathogenic determinants in enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* 01. **J. Bacteriol.** **169**: 1352-1357.
- YANO, T.; LEITE, D. S.; CAMARGO, I. J. B. & PESTANA DE CASTRO, A. F. 1986. A probable new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. **Microbiol. Immunol.** **30**: 495-508.