

BC/16167

IB/81301

81301

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

PAULO EDUARDO MORETTI

Este exemplar corresponde a Redação Final da Tese defendida pelo candidato Paulo Eduardo Moretti e aprovada pela Comissão Julgadora. Campinas, 17/02/92.



ESTUDOS BIOLÓGICOS E GENÉTICOS DE LINHAGENS DE
Escherichia coli ISOLADAS DE BOVINO COM DIARREIA

Tese apresentada ao Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do Título de Mestre em Ciências na área de Genética de Microrganismos.

Orientador: Prof.Dr. TOMOMASA YANO

Co-Orientador: Prof.Dr. WANDERLEY DIAS DA SILVEIRA

UNIDADE	I 81135
N.º CHAMADA	M 9176
V. _____	EX. _____
TOMBO BCI	16164
PROC.	218192
C ☐	D ☒
PRECO	R\$ 20.000,00
DATA	29/03/92
N CPD	_____

Este trabalho foi realizado no Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP com subvenção da FAPESP e FINEP.

Antes de tudo, agradeço ao Criador do Universo e Causa Primeira de todas as coisas, pela Vida, pela Consciência e por mais esta oportunidade de Progresso.

HOMENAGEM ESPECIAL

Agradeço aos pais Elza e Arnaldo Moretti pelo constante apoio moral, espiritual e material recebidos no transcorrer deste trabalho, sem os quais sua realização não teria sido possível. Agradeço, especialmente, seu incessante incentivo e confiança em mim depositados e sua presença em todos os momentos. A eles, com amor, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Tomomasa Yano pela orientação, pela amizade e constante incentivo no transcorrer deste trabalho, e, principalmente, pela confiança em mim depositada.

Agradeço ao particular amigo e co-orientador deste trabalho, Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira, pela orientação e pela excelente acolhida em seu laboratório, bem como pela sua amizade, dedicação e companheirismo. Agradeço, ainda, sua participação como membro da pré-banca e banca examinadora desta tese de Mestrado.

Agradeço ao Prof. Dr. José Luiz Pereira, do Departamento de Ciência dos Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, pela sua participação como membro da pré-banca e banca examinadora desta tese de Mestrado.

Agradeço à Prof. Dra. Marlene Braide Serafim pela sua participação na pré-banca desta tese de Mestrado, bem como pelo uso das dependências, equipamentos e materiais de seu laboratório sempre que se tornou necessário.

Agradeço ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, DD. Diretor da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz" - USP, pelas primeiras oportunidades de treinamento científico e no ensino universitário.

Agradeço à DD. professora do Instituto de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Sra. Neusa Aparecida Soares, que, pelo excelente nível de suas aulas e pelo entusiasmo que transmitia pela Genética levou-me a decidir, quando ainda no segundo ano do curso universitário, pelo trabalho científico nesta área.

Agradeço ao Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro e ao Prof. Dr. Fawzi Ahmed Moustafa Dawood, pelas facilidades concedidas no uso das dependências do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, para a realização deste trabalho.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular Bacteriana, do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, Cleide Marques Ferreira, Eneida Abreu Parizotto, Fabiana Fantinatti, Marcelo Brochi, Paulo Afonso Nogueira, Sérgio de Mendonça e Vanessa Sperandio, pela colaboração constante, amizade, companheirismo e auxílio no transcorrer deste trabalho, bem como, pelo excelente relacionamento que tem marcado nossa convivência.

Agradeço aos professores e amigos do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, Dr. Domingos da Silva Leite, Dr. Edgard Zanolli, Dra. Lucila Costallat Ricci e Dra. Maria Silvia Viccari Gatti, pela amizade e colaboração e excelente convivência.

Agradeço aos demais professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, Dra. Clarisse Weis Arns, Dra. Dagmar Ruth Stach Machado, Dr. Humberto de Araújo Rangel, Dr. Irineu José Barsanti de Camargo, Dra. Julia Keiko Sakurada, Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos, Dr. Paulo Maria Ferreira Araújo e Dra. Wirla Maria Silva Cunha Tamashiro, pelo amável relacionamento.

Agradeço aos professores do Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP, Dra. Yoko Bomura Rosato, Dr. Cláudio Luiz Messias, Dr. Ivanhoé Rodrigues Baracho, Dr. Octávio Henrique de Oliveira Pavan, Dr. Renato Bonatelli Júnior e Dr. Rolf Dieter Illg pela colaboração e amizade.

Agradeço aos amigos do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, Ana Stella Menegon Grossoli, Fabrícia Paula de Faria, Josias Rodrigues, Marcina Garcia, Maria Amélia de Jesus Piton, Mirtis Maria Giaciani, Natalícia Hifumi Hara e Tereza Cristina Lima Silva pela amizade, colaboração e excelente convivência.

Agradeço aos funcionários e amigos do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, Isildinha Aparecida Greggio Colli, Geneci Fernandez David, Manoel Bernardes da Silva e Paula Salek de Siqueira Porto Silva, pela amizade, colaboração e auxílio técnico.

Agradeço aos demais funcionários e amigos do Departamento de Microbiologia Imunologia da UNICAMP, Célia Aparecida Almeida Chaves, Cleide Aparecida Gomes Barbosa Brandt, Dorival Vitório da Cunha Jr., Evandro Luiz Rodrigues, Guilherme Vieira, Ismália Menegon Doné, João Garcia de Andrade e Lucia Helena Vicentin, pela amizade, pelo amável relacionamento e colaboração recebida.

Agradeço aos funcionários e amigos da Secretaria do Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP, Ana Rita Christ Quintana, Célia Aparecida Ribeiro Rosa Quiadetto, Patrícia Lopes Euzébio, Silvia Helena Costa Crivelenti e Teresinha Vieira Araújo Ribeiro do Vale, e pelo amável relacionamento e colaboração recebida.

Agradeço ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP, na pessoa de sua coordenadora Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Hofling, pelas facilidades concedidas no uso das instalações e equipamentos do Centro.

Agradeço ao Prof. Dr. Aureo Tatsumi Yamada, do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo auxílio técnico no preparo de telas para microscopia eletrônica.

Agradeço aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP, Antonia Maria Ferreira Lima, Adriane Cristina Sarti Sprongis, Maria Tereza de Paula e João Roberto Malheiros Bauer, pelo auxílio e orientação na manipulação de equipamentos e serviços de fotografia, bem como pela excelente

atenção e acolhida que sempre caracterizaram nossos trabalhos no Centro.

Agradeço ao Sr. Méd. Vet. João Takashi pela colaboração no fornecimento de culturas de células Vero.

Agradeço aos irmãos Luiz Fernando Moretti, Tereza Pinto de Souza Moretti pela convivência familiar, amizade e incentivo e, também, às minhas sobrinhas Priscila e Marcela que, pelo seu encanto, são a alegria de nossa casa.

Agradeço aos tios e amigos Maria de Lourdes Crivelari, Rodolpho e Lúcia Bueno, pela excelente convivência, pela colaboração e incentivo constantes e sobretudo, pelo carinho e amizade que sempre demonstraram.

Agradeço aos primos e irmãos Antônio Carlos Moretti, Flávia Garbogini Moretti e José Wilson Moretti, pela amizade e incentivo constantes.

Agradeço aos particulares amigos Joana Regina Fonseca, Iván Eduardo Gatica Rispoli, Ítalo Alberto Gatica Rispoli, Marinéia de Lima Gatica e Don Luis Alberto Gatica Mora, pela amizade de tantos anos e incentivo constante.

Agradeço ao amigo Eng. Civ. Ítalo Alberto Gatica Rispoli, pelo uso, das dependências de seu escritório de engenharia para a edição e impressão deste trabalho.

Agradeço ao amigo Oséas Rocha Lima pelos trabalhos de arte na confecção de 5 Figuras neste trabalho.

Agradeço, mui especialmente, à minha querida amiga Rosane Miguel Baccan (in memoriam) pela amizade, pelo seu constante incentivo, pelo seu carinho e, sobretudo, pelos constantes exemplos de confiança e coragem que marcou sua estadia entre nós.

ABREVIACÕES

Ap: ampicilina

C: graus centígrados

cm: centímetros

Cm: cloranfenicol

DMI: Departamento de Microbiologia e Imunologia

DNA: Acido desoxirribonucléico

EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica clássica

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica

g: gramas ou aceleração da gravidade

Gm: gentamicina

Km: canamicina

Lab.: laboratório

l: litro

LT: enterotoxina termo-lábil

LT-I: enterotoxina termo-lábil "I"

nm: nanômetro

mM: micromolar

mm: milímetros

Mdal: megadaltons

M: molar

MHMR: microhemaglutinação manose-resistente

no.: número

N: normal

r.p.m.: revoluções por minuto

SDS: Dodecil sulfato de sódio

Sm: estreptomicina

ST: enterotoxina termo-estável

STa: enterotoxina termo-estável "a"

Tc: tetraciclina

TLC: toxina letal a camundongos adultos

ug: microgramas

ul: microlitros

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas. Cidade Universitária
"Zeferino Vaz", Barão Geraldo, Campinas, SP.

UPEC: *Escherichia coli* uropatogênica

VT: verocitotoxina

ÍNDICE

1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	4
3. Materiais e Métodos	65
3.1. Linhagens bacterianas	65
3.2. Meios de cultura	65
3.2.1. Agar MacConkey	66
3.2.2. BHI	66
3.2.3. TSA	66
3.2.4. LB	66
3.2.5. LA	67
3.2.6. SOC	67
3.2.7. Agar Nutriente	68
3.2.8. Penassay	68
3.2.9. Meio Mínimo	69
3.2.10. CAYE	70
3.2.11. CFA	70
3.2.12. Minca	71
3.2.13. Agar Sangue	72
3.2.14. Eagle	73
3.3. Soluções e tampões	76
3.3.1. Solução de cloreto de sódio 3 M	76
3.3.2. Solução de cloreto de sódio 0,15 M	77
3.3.3. Solução de cloreto de cálcio 0,1 M	77
3.3.4. Solução de fosfato de potássio dibásico 1 M	77

3.3.5. Solução de fosfato de potássio monobásico 1 M	78
3.3.6. Solução de glicose a 20 %	78
3.3.7. Solução de hidróxido de sódio 10 N	78
3.3.8. Solução de ácido clorídrico 1 N	78
3.3.9. Solução de ácido cítrico a 5%	79
3.3.10. Solução salina formolada a 0,5 %	79
3.3.11. Solução Azul de Evans a 2 %	79
3.3.12. Solução alcólica de azul de bromotimol a 1,5 %	80
3.3.13. Reagente de Kovacs	80
3.3.14. Tampão PBS 0,05 M	80
3.3.15. Tampão trietanolamina	81
3.3.16. Solução Alsever	81
3.3.17. Soluções de drogas antimicrobianas	82
3.3.17.1. Ácido nalidíxico	82
3.3.17.2. Ampicilina	82
3.3.17.3. Canamicina	82
3.3.17.4. Cloranfenicol	83
3.3.17.5. Estreptomicina	83
3.3.17.6. Gentamicina	83
3.3.17.7. Tetraciclina	83
3.3.18. Soluções para extração de plasmídios	84
3.3.18.1. Solução de acetato de sódio 3 M	84
3.3.18.2. Solução de SDS a 10 %	84
3.3.18.3. Solução I	84
3.3.18.4. Solução II	84
3.3.18.5. Solução III	85

3.3.19. Soluções para eletroforese em gel de agarose	85
3.3.19.1. Tampão TEB	85
3.3.19.2. Solução de RNase	86
3.3.19.3. Solução de ressuspensão	86
3.3.20. Solução estoque de brometo de etídio a 1 %	87
3.3.21. Solução corante de brometo de etídio	87
3.3.22. Soluções para ensaios de microscopia eletrônica	87
3.3.22.1. Solução de parlódio a 0,5 %	87
3.3.22.2. Solução de uranila a 2 %	88
3.4. Antissoro anti-K99	88
3.5. Coleta e manutenção de sangue humano e animal	90
3.5.1. Sangue humano, de cobaio e galinha	90
3.5.2. Sangue de carneiro, boi e cavalo	91
3.5.3. Sangue de carneiro desfibrinado	91
3.6. Pesquisa da existência de variabilidade genética nas culturas originais das linhagens de <i>E. coli</i> estudadas .	91
3.7. Manutenção de culturas bacterianas	92
3.8. Detecção da expressão do antígeno "K99"	93
3.9. Detecção da expressão do antígeno EAF44	95
3.10. Detecção da produção de hemolisina	95
3.11. Detecção da produção e caracterização de colicinas ...	95
3.12. Determinação do nível de resistência a drogas anti- microbianas	97
3.13. Obtenção de mutantes resistentes a drogas anti- microbianas	98
3.13.1. Mutantes resistentes ao ácido nalidíxico	98

3.13.2. Mutantes resistentes à estreptomicina	99
3.14. Reações de hemaglutinação	100
3.15. Titulação da capacidade hemaglutinante do antígeno EAF44	103
3.16. Detecção da produção de enterotoxinas STa e LT-I	104
3.17. Detecção da produção de verocitotoxina (VT)	107
3.18. Detecção de produção de toxina letal a camundongos ...	109
3.19. Determinação de perfis plasmídicos	111
3.20. Estimativa de pesos moleculares	114
3.21. Microscopia eletrônica	115
3.22. Conjugações bacterianas	117
3.23. Pesquisa do determinante genético do antígeno "K99" ..	119
3.24. Mobilização plasmídica	121
3.25. Determinação de Grupos de Incompatibilidade	123
3.26. Mutagênese mediada por transposons	126
3.27. Transformações bacterianas	128
3.32. Eliminação plasmídica	131
4. Resultados	135
4.1. Detecção da produção de hemolisina	135
4.2. Detecção da produção de colicina	135
4.3. Caracterização do tipo de colicina produzido	136
4.4. Níveis de resistência a drogas antimicrobianas	136
4.5. Determinação do meio de expressão do antígeno "K99" ...	137
4.6. Pesquisa do determinante genético do antígeno "K99" ...	137
4.7. Hemaglutinação em lâmina de vidro	137
4.8. Microhemaglutinação manose-resistente	140

4.9. Titulação da capacidade hemaglutinante do antígeno EAF44	140
4.10. Produção de enterotoxina STa	141
4.11. Produção de enterotoxina LT-I	141
4.12. Produção de verocitotoxina	141
4.13. Detecção da produção de toxina letal a camundongos ...	143
4.14. Determinação de perfis plasmídianos	143
4.15. Estimativa dos pesos moleculares dos plasmídios estudados	145
4.16. Microscopia eletrônica	145
4.17. Mobilização plasmidiana	145
4.18. Determinação de Grupos de Incompatibilidade	146
4.19. Mutagênese mediada por transposons	147
4.20. Transformações bacterianas	147
4.21. Eliminação plasmidiana	148
5. Discussão	165
6. Resumo	191
7. Summary	195
8. Bibliografia	199

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Perfis plasmídicos das linhagens bacterianas estudadas	149
Figura 2. Presença do plasmídeo pMY111 nas linhagens de <i>E. coli</i> BF44 e <i>E. coli</i> BV	150
Tabela 1. Linhagens bacterianas	151
Tabela 2. Linhagens de <i>E. coli</i> K12 utilizadas para determinação de tipos de colicinas produzidos	152
Tabela 3. Linhagens de <i>E. coli</i> K12 C600 portando plasmídios pertencentes a Grupos de Incompatibilidade conhecidos	153
Tabela 4. Antimicrobianos utilizados para crescimento bacteriano sob pressão seletiva	154
Tabela 5. Transconjugantes obtidos para pesquisa da localização genética do antígeno "K99"	155
Tabela 6. Caracterização do tipo de colicina produzido pelas linhagens bacterianas estudadas	156
Tabela 7. Níveis de resistência a drogas antimicrobianas apresentados pelas linhagens bacterianas estudadas	157
Tabela 8. Detecção da expressão do antígeno "K99"	158
Tabela 9. Propriedades hemaglutinantes, manose-resistente, das linhagens bacterianas estudadas	159
Tabela 10. Detecção da produção de enterotoxina STa	160

Tabela 11.	Detecção da produção de toxina letal a camundongos (TLC)	161
Tabela 12.	Detecção de produção de toxina letal a camundongos (TLC) em linhagens de <i>E. coli</i> cultivadas em meio mínimo e TSB	162
Tabela 13.	Pesos moleculares estimados dos plasmídios estudados	163
Tabela 14.	Visualização de fímbrias via microscopia eletrônica	164

1. INTRODUÇÃO

A enterobactéria *Escherichia coli*, um dos constituintes da microbiota intestinal normal humana e de várias espécies animais, vem sendo, há décadas, amplamente utilizada em pesquisa básica e, principalmente, nos campos da genética molecular e da tecnologia do DNA recombinante. O fato se deve a toda uma gama de facilidades de estudos e manipulações que esta bactéria oferece. Sua manipulação e manutenção em culturas de laboratório é bastante simples devido às suas mínimas exigências nutricionais, podendo crescer numa ampla faixa de temperatura e oferecendo facilidades para estudos biológicos, genéticos e moleculares. A bactéria *E. coli* pode ser utilizada em determinados casos para a expressão de material genético exógeno, representando um grande potencial de realizações no campo da biotecnologia.

Algumas linhagens de *E. coli*, no entanto, apresentam mecanismos de patogenicidade ou **fatores de virulência** que as capacitam a causar quadros infecciosos diversos, como gastroenterites, infecções urinárias, septicemia ou meningite, incluindo a possibilidade de morte, em se tratando de crianças ou animais recém-nascidos.

Linhagens de *E. coli* enteropatogênicas são capazes de colonizar o epitélio intestinal de seres humanos onde, por meio de mecanismos diversos, provocam um quadro patológico que se manifesta sob a forma de diarréia aquosa e profusa ou disenteria, em crianças e adultos. Linhagens de *E. coli*

denominadas enterotoxigênicas, colonizam o epitélio do intestino delgado, aderindo-se a este por meio de fimbrias ou fatores de aderência, geralmente de estrutura fimbriana, e produzem toxinas que têm a propriedade de reverter o fluxo normal de absorção-secreção do intestino, provocando um acúmulo de fluido na luz intestinal, causando uma diarreia aquosa. O quadro diarréico é notadamente severo em humanos e animais recém-nascidos, ainda susceptíveis a esses patógenos, podendo ocorrer a morte do indivíduo afetado.

Além das consequências advindas de quadros infecciosos ocasionados por *E. coli* em humanos recém-nascidos que por si só justificam esforços no estudo dos mecanismos de patogenicidade dessas bactérias, deve-se, também, considerar a importância de tais quadros infecciosos em animais de importância econômica.

Em animais recém-nascidos, a *E. coli* representa um dos principais agentes infecciosos provocando mortalidade em rebanhos de animais domésticos como bovinos, suínos e aves, provocando prejuízos suficientes para justificar o estudo dos seus mecanismos de patogenicidade.

O conhecimento da natureza química, do modo de ação e das propriedades sorológicas dos fatores de virulência em *E. coli*, bem como dos mecanismos que controlam sua expressão, é de grande importância para a compreensão desses mecanismos de patogenicidade.

A pesquisa dos fatores de virulência em *E. coli* pode levar ao desenvolvimento de mecanismos de combate a processos

infecciosos em andamento e especialmente ao desenvolvimento de vacinas que atuarão preventivamente. Uma vacina age contra um agente infeccioso específico, ou ainda, contra um mecanismo particular de virulência de um determinado patógeno, e, como no caso de linhagens patogênicas de *E. coli*, novos fatores de virulência vêm sendo descritos, é importante o desenvolvimento de novas vacinas. Para tanto, contudo, é necessário o estudo desses novos fatores de virulência.

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de descrever as características biológicas e genéticas de fatores de virulência, presentes em amostras de *E. coli* isoladas de bovino com diarreia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli*, da família *Enterobacteriaceae*, é um bacilo gram-negativo, anaeróbio facultativo, membro da microbióta intestinal normal do homem, de mamíferos e aves (DRASAR & HILL, 1974; HISON & WILLIAMS, 1989). Essa bactéria foi isolada pela primeira vez por Escherich em 1885 (Apud GONZALEZ & BLANCO, 1987).

Até o final do século passado, a *E. coli* era tida como essencialmente não patogênica, quando foi, então, detectada tanto nas fezes de crianças doentes como nas de crianças saudas. Em 1897, Lesage (Apud GONZALEZ & BLANCO, 1987) observou que o soro de uma criança enferma aglutinava amostras de *E. coli* isoladas de outras crianças com diarreia, numa mesma epidemia, mas não aglutinava amostras de *E. coli* isoladas de indivíduos saudas. Esse fato tornou claro a existência de estruturas presentes nas amostras patogênicas que as diferenciavam das demais, não patogênicas.

Para que uma bactéria possa iniciar um processo infeccioso e desenvolver um quadro patológico, esta necessita possuir certos atributos especiais de virulência ou fatores de virulência.

Fatores de virulência facultam linhagens de *E. coli* a iniciar um processo infeccioso através de mecanismos como

colonização, invasão, e produção de toxinas (LEVINE, 1987).

Existem diferentes tipos de linhagens de *E. coli* que são conhecidas como responsáveis pela ocorrência de diarreia em crianças e adultos (DONTA et alli, 1977; EVANS et alli, 1977); GUERRANT et alli, 1975; MORRIS et alli, 1976; SACK et alli, 1977; TOLEDO et alli, 1983). Existem, também, linhagens de *E. coli* que causam doenças como disenterias, septicemias, meningites e infecções urinárias (HANSON et alli, 1988; LEVINE, 1985; LEVINE, 1987; O'BRIEN & HOLMES, 1987).

Para que uma infecção se estabeleça é necessário que haja uma interação entre o patógeno e o hospedeiro, a nível celular e molecular. Portanto, é necessário que na superfície da célula bacteriana existam estruturas que reajam com sítios específicos presentes nas membranas das células de determinados tecidos do hospedeiro, permitindo a adesão das bactérias, sua multiplicação *in loco* e colonização do tecido. É também necessário, que o sistema imunológico do hospedeiro não interfira no processo inicial da infecção.

As *E. coli* patogênicas ao homem e animais encontram-se classificadas em grupos que possuem características próprias que os diferenciam entre si (LEVINE, 1985; LEVINE, 1987) quanto às suas características de virulência, seus mecanismos de ação, processos de colonização, antígenos de superfície que apresentam e quanto ao quadro clínico manifestado pelo hospedeiro (ECHEVERRIA et alli, 1982; EVANS et alli, 1975; EVANS et alli, 1977; LEVINE, 1980; MERSON et alli, 1979; ØRSKOV et alli, 1976;

REIS et alli, 1980).

Essas bactérias encontram-se agrupadas em classes com características próprias, cada uma associada a sorogrupos particulares definidos pelo antígeno somático "O" do lipopolissacáride da membrana externa da bactéria (LEVINE, 1987).

Sorologicamente, o antígeno somático O, representa o polissacarídio O-específico do lipopolissacarídio da parede celular de todas as *E. coli* de colônia lisa. Aproximadamente 171 antígenos O já foram identificados. São termo-estáveis e não são inativados por aquecimento a 100^O ou 121^O C (GRAASTRA & deGRAAF, 1982; ØRSKOV & ØRSKOV, 1977; LEVINE, 1987). O papel destes antígenos em processos infecciosos não está claro. Supõe-se que determinados antígenos somáticos possam conferir certas vantagens às linhagens patogênicas que os possuam, no tocante à expressão de seus mecanismos de virulência (EVANS et alli, 1977).

Outra classe importante de antígenos de superfície de *E. coli* é a dos antígenos flagelares "H". Estes são proteínas termo-sensíveis, sendo inativados a 100^O C (GRAASTRA & deGRAAF, 1982). São conhecidos 56 antígenos H em *E. coli* (LEVINE, 1987).

Os antígenos O e H constituem o sistema de classificação O:H, o qual é empregado na caracterização dos sorogrupos de linhagens patogênicas de *E. coli*. A sorogrupagem tem sido importante na determinação das *E. coli* enteropatogênicas clássicas (EPEC) (LEVINE, 1987) e auxilia na definição dos outros grupos.

Além destas duas classes de antígenos, uma terceira, a

dos antígenos capsulares "K", faz parte do sistema internacional de sorotipagem de *E. coli*. Os antígenos capsulares são projeções fibrosas compostas de polissacarídeos que envolvem o antígeno somático O em algumas, mas não todas, linhagens de *E. coli*. Na microscopia eletrônica, o antígeno K aparece como um denso emaranhado de projeções fibrosas e são similares ao glicocálix em outras bactérias. Existem, aproximadamente, 70 grupos K. Vários outros grupos não identificados provavelmente ocorrem e alguns podem representar novos antígenos ainda não incluídos no esquema internacional de sorotipagem. O papel destes antígenos em processos patológicos não está claro e supõe-se que auxiliem protegendo a bactéria contra os mecanismos imunológicos do hospedeiro (ACRES, 1985; GRAASTRA & deGRAAF, 1982; ØRSKOV & ØRSKOV, 1977; LEVINE, 1987).

Entre as *E. coli* patogênicas existem linhagens associadas a infecções intra-intestinais e linhagens associadas a infecções extra-intestinais.

2.2. *E. coli* ASSOCIADAS A INFECÇÕES EXTRA-INTESTINAIS

Entre as *E. coli* associadas a infecções extra-intestinais encontram-se as *E. coli* causadoras de meningites e as *E. coli* uropatogênicas (UPEC).

As *E. coli* causadoras de meningites afetam crianças recém-nascidas numa frequência de 1 entre 2000 a 4000 nascimentos (LEVINE, 1984). Essas bactérias invadem a circulação sistêmica e,

atingindo as meninges, provocam a doença, muitas vezes com consequências fatais (LEVINE, 1984). Esse grupo de *E. coli* distribue-se nos sorogrupos 01, 07, 018 e 075 (LEVINE, 1982).

As *E. coli* uropatogênicas (UPEC) formam o grupo das *E. coli* causadoras de infecções urinárias, cistites e pielonefrites, podendo ser dividido em dois sub-grupos, associados a antígenos de aderência específicos: (1) UPEC causadoras de infecções no trato urinário (*E. coli* cistíticas) e (2) UPEC causadoras de infecções renais (*E. coli* pielonefríticas) (LEVINE, 1984). Destes sub-grupos, 70 % das linhagens de UPEC isoladas de casos de pielonefrite e 55 % das isoladas de casos de cistite pertencem aos sorogrupos 01, 02, 04, 07, 016, 018 e 075 (LEVINE, 1984).

2.3. *E. coli* ASSOCIADAS A INFECÇÕES INTRA-INTESTINAIS

As *E. coli* associadas a infecções intra-intestinais são causadoras de diarreias ou disenterias, em humanos ou animais. Dentre estas encontram-se as *E. coli* enteropatogênicas clássicas (EPEC), as *E. coli* enteroinvasivas (EIEC), as *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), as *E. coli* verocitoxigênicas (VTEC) e o importante grupo das *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) (LEVINE, 1987). Existe, ainda, um novo e controverso grupo de *E. coli* associadas a diarreia em humanos, o das *E. coli* enteroaderentes (EAEC) (MATHEWSON et alli, 1985; MATHEWSON et alli, 1986; VIAL et alli, 1988), cujas características particulares não estão bem

2.3.1. E. coli ENTEROPATOGÊNICAS CLASSICAS

As E. coli enteropatogênicas clássicas (EPEC) são enteropatógenos importantes sendo a causa mais comum de diarreia infantil em países subdesenvolvidos (SACK, 1975; TRABULSI, 1981). Estão geralmente associadas a surtos epidêmicos (MORRIS et alii, 1976; TOLEDO et alii, 1983) ou à diarreia infantil endêmica (GURWITH et alii, 1978). O quadro clínico manifesta-se como uma diarreia aguda, aquosa, com vômitos e febre.

As EPEC são capazes de colonizar o intestino delgado do hospedeiro aderindo-se firmemente às células epiteliais intestinais, com destruição das microvilosidades mas sem invadirem o epitélio intestinal ou produzirem toxinas conhecidas (KNUTTON et alii, 1987a; KNUTTON et alii, 1987b; LEVINE, 1987).

Os sorogrupos relacionados a EPEC são: O20, O44, O55, O86, O111, O114, O119, O124, O126, O127, O142 e O158 (GONZALEZ & BLANCO, 1987).

2.3.2. E. coli ENTEROINVASIVAS (EIEC)

As E. coli enteroinvasivas (EIEC) são importantes agentes causais de diarreia infantil e disenteria (presença de muco, sangue e leucócitos nas fezes) em países subdesenvolvidos (LEVINE, 1987; TAYLOR et alii, 1986; TAYLOR et alii, 1988) e em adultos, em países desenvolvidos (LEVINE, 1987). O paciente apresenta fortes cólicas abdominais e febre. Essas bactérias destroem a borda ciliada das células epiteliais do intestino

grosso, invadindo-as, causando morte celular, ulceração e inflamação intestinal (FORMAL & HORNICK, 1978; LEVINE, 1987; WRANGLER et alli, 1988).

2.3.3. E. coli ENTEROHEMORRÁGICAS

As E. coli enterohemorrágicas (EHEC) causam um quadro clínico semelhante ao causado por linhagens de EIEC, com exceção da ausência de febre e de leucócitos nas fezes (LEVINE, 1987).

Estas bactérias são produtoras de duas citotoxinas: a verocitotoxina 1 (VT1) e a verocitotoxina 2 (VT2). Estas citotoxinas, sorologicamente distinguíveis, têm um forte efeito citotóxico em culturas de células Vero.

A VT1 ou "Shiga-like toxin" (SLT-I), apresenta grande semelhança com a toxina de *Shigella*, podendo ser inativada com o mesmo antissoro (O'BRIEN & HOLMES, 1987). A VT2 (SCOTLAND et alli, 1985) ou SLT-II (STROCKBINE et alli, 1986) não reage com anticorpos anti-toxina de *Shigella* e apresenta efeitos citotóxicos, similares aos da VT1, também em culturas de células Vero e HeLa.

As verocitotoxinas interferem na síntese protéica inativando a subunidade ribossômica 60S (O'BRIEN & HOLMES, 1987).

Os sorogrupos de EHEC são: O4, O5, O26, O45, O91, O103, O111, O121, O125, O145 e O157 (BOOP et alli, 1987; KARMALI et alli, 1985; LEVINE et alli, 1987; SMITH et alli, 1987; WADE et alli, 1979; WILSON & BETTELHEIM, 1980). Dentre estes, os tipos

mais importantes encontram-se nos sorotipos O26:H11 e O157:H7, os quais apresentam produção de verocitotoxinas codificadas por bacteriófagos, mas não produzem enterotoxinas ST ou LT (LEVINE et alli, 1987; SMITH et alli, 1983).

HUANG et alli (1987) reportaram a existência de um bacteriófago portando os genes estruturais para a produção de VT1 em *E. coli* e que apresentava sequências de DNA homologas às do fago lambda.

A existência das verocitotoxinas foi relatada pela primeira vez por KONOWALCHUK et alli (1977) que ao examinarem linhagens de *E. coli* provenientes de crianças com diarreia, observaram que algumas amostras liberavam um produto citotóxico termo-lábil com atividade sobre culturas de células Vero e que não estava relacionado com as enterotoxinas termo-estável (ST) ou termo-lábil (LT) de *E. coli*. Esses autores denominaram esta toxina de "verotoxin", verocitotoxina (VT).

Outros autores observaram que a maioria das linhagens de *E. coli* pertencentes ao sorotipo O26:H11 produzem verocitotoxinas (SCOTLAND et alli, 1980; SMITH et alli, 1983; WADE et alli, 1979; WILSON & BETTELHEIM, 1980). Linhagens de *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O26 são comuns no Brasil (MURAHOSCHI & TRABULSI, 1981).

A produção de VT também ocorre em outros sorotipos de EHEC como O113:H21, o O111:H- e notadamente, o sorotipo O157:H7 que parece ser um tipo importante entre as EHEC (JOHNSON et alli (1983).

Vários autores relataram o envolvimento de linhagens de EHEC produtoras de VT a surtos de colite hemorrágica em adultos (JOHNSON et alli, 1983; RATNAM et alli, 1988) e crianças KARMALI et alli (1983).

Existem evidências de que linhagens de EHEC produtoras de VT estejam associadas a quadros de uremia hemolítica fatal em crianças, com a presença de VT nas fezes e anticorpos anti-VT no soro dos pacientes (KARMALI et alli, 1983).

Vários autores (O'BRIEN e LAVECK, 1983; O'BRIEN et alli, 1982; O'BRIEN et alii, 1983) trabalhando com uma linhagem de *E. coli* produtora de VT, a *E. coli* H30, comprovaram que filtrados de sobrenadantes de culturas dessa linhagem, à semelhança dos filtrados de cultivo da linhagem de *Shigella dysenteriae* 60R (tipo 1), apresentavam efeitos citotóxicos em células HeLa, eram enterotóxicas em alças ligadas de intestino de coelho e letais para camundongos adultos inoculados por via intraperitoneal.

O'BRIEN & LAVECK (1983) purificaram a verocitotoxina produzida pela linhagem de *E. coli* H30 e verificaram que esta tinha características moleculares muito parecidas às da citotoxina da linhagem de *Shigella dysenteriae* 60R. A essas semelhanças aliava-se o fato de que a toxina de *Shigella* é também uma verocitotoxina e que o antissoro específico anti-toxina de *Shigella* neutralizava o efeito citotóxico da VT produzida por linhagens de *E. coli* O157:H7 isoladas de surtos de colite hemorrágica.

A VT sintetizada pela *E. coli* H30 é uma proteína

oligomérica constituída por uma subunidade "A" de 31,5 Kdal e quatro subunidades "B" de 4,0 Kdal cada. A toxina excretada por linhagens de *Shigella dysenteriae* 60R também possui uma subunidade "A" de 31,5 Kdal e seis subunidades "B", o que a torna maior que a VT produzida pela *E. coli* H30, 58,0 e 48,0 Kdal, respectivamente.

Vários outros estudos demonstraram que a VT apresenta propriedades biológicas e antigênicas estreitamente relacionadas às da toxina produzida por *Shigella dysenteriae* (MARQUES et alli, 1986; MOHAMMAD et alli, 1985; PAI et alli, 1986; SHERWOOD, 1985).

RATNAM et alli (1988) verificaram que dentre 174 linhagens de *E. coli* pertencentes ao sorotipo O157:H7, de isolados humanos de surtos de colite hemorrágica, síndrome urêmico-hemolítica, diarreia não-sangüinolenta e de portadores assintomáticos nos Estados Unidos e no Canadá, a grande maioria (97 %) eram susceptíveis aos antibióticos comumente usados, todas produziam verocitotoxina, 70 % apresentavam aderência localizada ou difusa a células HEp-2 e Henle 407. Nestas linhagens, foram encontrados três perfis básicos de plasmídios, com pesos moleculares variando de 68,7 a 1,8 Mdal.

Linhagens de EHEC do sorotipo O157:H7 possuem dois prováveis fatores de virulência: (1) uma adesina fimbriana cuja síntese está codificada num plasmídio de 60 Mdal e uma verocitotoxina codificada por um bacteriófago. Quando leitões foram infectados experimentalmente com essas linhagens ou com suas derivadas nas quais o plasmídio de 60 Mdal havia sido

eliminado, ou ainda, com células de *E. coli* K12 portadoras do plasmídio de 60 Mdal, aqueles que receberam os dois primeiros tipos de bactérias tiveram diarreia e seus intestinos apresentaram lesões típicas provocadas pela adesão bacteriana, com destruição do epitélio do colon. As linhagens de *E. coli* K12 não foram virulêntas (TZIPORI et alli, 1987). Esses dados sugerem que o antígeno fimbriano codificado pelo plasmídio não é essencial para a virulência daquelas bactérias mas, é possível que tenha alguma função nos passos iniciais da colonização.

Outras características como produção de colicinas e hemolisinas têm sido observadas em linhagens de EHEC.

SILVA et alli, (1983) observaram um pequeno número de linhagens produtoras de colicinas distribuídas em três sorogrupos clássicos de EPEC O26, O111 e O119. Esses autores salientam que a produção de colicinas, em linhagens de EPEC isoladas em São Paulo, é característica destes três sorogrupos. Os mesmos autores salientam que apesar do caráter hemolítico ser aparentemente raro em linhagens de EPEC, esta ocorre prevalentemente em linhagens pertencentes ao sorogrupo O26.

Cabe, aqui a observação de que linhagens do sorogrupo O26, ora classificado como um dos sorogrupos representativos de EHEC, comumente apresentam produção de verocitoxina e que o caráter hemolítico aparentemente se encontra associado ao verocitotoxigênico, neste caso. Talvez seja por isso que aqueles autores (SILVA et alli, 1983) observaram uma prevalência do caráter hemolítico em linhagens de *E. coli* pertencentes ao

sorogrupo 026.

WILLIAMS et alli (1978), relataram que, em uma linhagem de *E. coli* do sorogrupo 026 foi observado um plasmídio codificando colicina V e, concomitantemente, mediando a adesão ao epitélio intestinal humano.

A produção de colicina V foi observada em linhagens de *E. coli* isoladas de sangue, urina e fezes de pacientes com infecção urinária (DAVIES et alli, 1981).

Em bovinos, há um grupo de linhagens de *E. coli* associadas à diarreia e produtoras de verocitotoxina (VT). Essas linhagens, denominadas de *E. coli* verocitotoxigênicas (VTEC), têm sido estudadas por vários autores (MOHAMMAD et alli, 1985; YANO, 1986; YANO et alli, 1986b; YANO et alli, 1988).

YANO (1986) demonstrou a existência de uma antígeno fimbriano, EAF44, produzido por uma linhagem de VTEC, que provavelmente representa um novo fator de colonização em *E. coli*.

Em suínos, vários autores (MARQUES et alli, 1987; THOMPSON & LINGGOOD, 1987) relataram que linhagens de *E. coli* produtoras de VT estavam associadas à doença do edema (DE), sugerindo que a VT pode estar relacionada com esta doença. Esses autores observaram que, nem todas as linhagens pertencentes a sorotipos reconhecidamente relacionados à doença do edema em porcos (0141:K85, 0139:K82 e 0138:K81) produziam VT.

2.3.4. E. coli ENTEROADERENTES E ENTEROADERENTES-AGREGATIVAS

E. coli enteroaderentes (EAEC) (MATHEWSON et alli, 1985; MATHEWSON et alli, 1986) ou E. coli enteroaderentes-agregativas (EA-AggEC) (VIAL et alli, 1988) formam um grupo controverso de linhagens de E. coli associadas a um tipo simples de diarreia humana, sem a presença de sangue e/ou leucócitos nas fezes (MATHEWSON et alli, 1985; MATHEWSON et alli, 1986). Pertencem a sorogrupos não-clássicos, não tipáveis ou do tipo rugoso, identificadas pelas suas características de adesão a células HEp-2, do tipo agregativo, distinto da adesão localizada ou difusa apresentado por linhagens de EPEC clássicas.

Essas bactérias não produzem enterotoxinas termo-estável (ST) ou termo-lábil (LT), nem citotoxinas como a VT.

2.3.5. E. coli ENTEROTOXIGÊNICAS (ETEC)

O grupo das E. coli enterotoxigênicas (ETEC) é o grupo mais importante entre as E. coli causadoras de diarreia em humanos e animais.

Este grupo é caracterizado pela produção de dois tipos de enterotoxinas funcionalmente relacionadas: a enterotoxina termo-estável (ST) e/ou a enterotoxina termo-lábil (LT). A produção destes dois tipos de enterotoxinas é codificada por plasmídios denominados plasmídios Ent (SMITH & HALLS, 1967; SMITH & GYLES, 1970).

A ação dessas enterotoxinas ocorre ao nível das células epiteliais do intestino delgado de seres humanos e animais, e causam uma diarreia aguda, aquosa e profusa, por alterarem o equilíbrio hidrossalino da mucosa intestinal.

Uma outra característica importante das ETEC é a produção de fímbrias espécie-específicas que mediam adesão destas bactérias a células epiteliais intestinais com subsequente colonização da mucosa do intestino delgado.

Em seres humanos, as ETEC são importantes agentes etiológicos de diarreias, tanto em crianças como em adultos, apresentando distribuição mundial (DONTA et alli, 1977; GIULIANO et alli, 1978; GIULIANO et alli, 1978b; GORBACH & KHURANA, 1972; GURWITH & WILLIAMS, 1977; LEE & KEAN, 1978; MAGALHÃES et alli, 1981; MERSON et alli, 1979; REIS et alli, 1979; SACK, 1975; SACK et alli, 1977; SAHORE et alli, 1974; SIMÕES et alli, 1977).

No Brasil essas bactérias têm sido isoladas de crianças com diarreia em várias localidades do país (GIUGLIANO et alli, 1978a; GIUGLIANO et alli, 1978b; LOUREIRO et alli, 1983; MAGALHÃES et alli, 1981; REIS et alli, 1979; SIMÕES et alli, 1977).

Em animais de interesse econômico como bovinos, suínos e ovínos, infecções causadas por ETEC afetam principalmente animais recém-nascidos ou de poucos dias de vida, causando sérios prejuízos econômicos (ACRES, 1985; GYLES & BARNUM, 1969; SACK, 1975).

As linhagens de ETEC encontram-se distribuídas em um

número restrito de sorogrupos, os principais sendo 06, 08, 015, 025, 0,63, 078, 0115, 0128, 0148, 0159 (ØRSKOV et alli, 1976; MERSON et alli, 1979; REIS et alli, 1980), sendo que os principais sorogrupos de ETEC de origem animal são: 08, 09, 020 e 0101 (EVANS et alli, 1977; SODERLIND & MOLLBY, 1979).

Além de serem isoladas de fezes de indivíduos com diarreia, linhagens de ETEC podem ser encontradas em água de rio (REIS et alli, 1980), água potável, poluída e em esgoto (SATO et alli, 1983), e em alimentos (REIS et alli, 1980b; SCALETISKY et alli, 1982). A água, portanto, pode ser um veículo importante na transmissão de ETEC. Contudo, a principal fonte de disseminação de enterobactérias para o homem são os alimentos, principalmente carne e derivados (REIS et alli, 1980; SCALETISKY et alli, 1982; FALCÃO et alli, 1982), uma vez que linhagens de ETEC não são prevalentes sobre outros tipos de bactérias encontradas na água (SATO et alli, 1983).

2.4. ENTEROTOXINAS PRODUZIDAS POR ETEC

Os primeiros dados sobre os mecanismos de ação das ETEC provêm de SMITH & HALLS (1967). Esses autores verificaram que sobrenadantes de cultivo, filtrados, de amostras de *E. coli* isoladas de suíno com diarreia, produziam acúmulo de fluidos em alças ligadas de intestino de destes animais. O fato dos sobrenadantes provocarem esse fenômeno era uma clara evidência da presença de toxinas nos meios de cultura, excretadas pelas

amostras examinadas. Ainda esses autores, verificaram que a atividade dessa enterotoxina não era inativada por aquecimento a 100 °C, durante 30 minutos, pelo que, aqueles autores a denominaram enterotoxina termo-estável (ST).

Posteriormente, foi estabelecido que o motivo da resistência da enterotoxina ST ao calor era devido à existência de seis resíduos de cisteína, em sua molécula, que permitem o estabelecimento de pontes de dissulfeto, às quais conferem quando resistência à temperatura e à hidrólise enzimática (CHANG & GIANNELLA, 1981).

Dois anos depois, GYLES & BARNUM (1969), também usando técnica da alça ligada de intestino de porcos, demonstraram a existência de um outro tipo de enterotoxina, produzidas por linhagens de *E. coli* de origem suína, cuja atividade era inativada por aquecimento a 60 °C, por 30 minutos. Essa nova enterotoxina foi denominada, por esses autores, de enterotoxina termo-lábil (LT).

SACK et alli (1971) estudando amostras de *E. coli* isoladas de pacientes sofrendo de um tipo de diarreia semelhante à cólera, só que bem menos intensa, demonstraram que tais amostras produziam um enterotoxina termo-lábil, de natureza protéica, que de modo semelhante à toxina colérica, causava acúmulo de fluidos em alças ligadas de intestinos de coelhos.

Vários outros autores (GEARY et alli, 1982; GILL et alli, 1981; HONDA et alli, 1981) demonstraram que a enterotoxina termo-lábil (LT) isoladas de linhagens de *E. coli* de origem

humana era semelhante às LT produzidas por linhagens de *E. coli* de origem suína. Um outro aspecto digno de nota era o fato de que essa enterotoxina apresentava identidade sorológica com a toxina colérica (RICHARDS & DOUGLAS, 1978; SACK, 1975; DYKES et alli, 1985; YAMAMOTO, 1987).

A produção de uma enterotoxina termo-estável (ST) por linhagens de *E. coli* causadoras de diarreia em humanos, praticamente idêntica àquelas produzidas por linhagens de ETEC de origem suína foi demonstrada por vários autores (DEAN et alli, 1972; TAKAO et alli, 1983; CHANG & GIANNELLA, 1981).

Linhagens de ETEC, tanto de origem humana como animal, produzem um ou outro tipo de enterotoxina, ou menos frequentemente, ambas. Apesar dessas enterotoxinas serem muito semelhantes entre si nas diversas origens, as ETEC humanas e animais possuem características adesivas próprias como será visto mais adiante.

As enterotoxinas termo-estáveis (ST) ocorrem em duas classes distintas, STa e STb, sendo peptídios de baixo peso molecular (1,5 a 3,0 Kdal) (WHIPP et alli, 1981; ALDERETE & ROBERTSON, 1988; STAPLES et alli, 1980; TAKEDA et alli, 1979). Devido ao baixo peso molecular, essas enterotoxinas não são imunogênicas, induzindo resposta imune somente quando conjugadas a outras proteínas (ALDERETE & ROBERTSON, 1978; BURGUESS et alli, 1978; GYLES, 1971; SACK, 1975).

A enterotoxina STa é encontrada em formas variantes em linhagens de ETEC de origem suína (STp) e humana (STh) com

pequenas alterações em sua sequências de aminoácidos (CHANG & GIANNELLA, 1981; DREYFUS et alli, 1983; TAKAO et alli, 1983).

O mecanismo de ação da enterotoxina STa não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que tem a propriedade de alterar o equilíbrio hidrossalino da mucosa intestinal por ativar a enzima guanilato ciclase a nível de membrana dos enterócitos. A atividade dessa enzima eleva os níveis do nucleotídeo cíclico guanidina monofosfato (GMPc) nas células epiteliais da mucosa intestinal, levando a uma série de eventos, ainda não perfeitamente determinados, que ocasionam uma inversão da dinâmica de absorção-secreção de fluidos na luz intestinal. Este fenômeno causa uma hipersecreção de fluidos para a luz intestinal, resultando num quadro de diarreia aguda, aquosa e profusa (FIELD et alli, 1978; HUGUES et alli, 1978).

A produção da enterotoxina STa, por uma linhagem de *E. coli*, pode ser demonstrada pelo clássico teste do camundongo recém-nascido, desenvolvido por DEAN et alli (1973).

O primeiro passo para o estabelecimento da genética dessas enterotoxinas foi dado por SMITH & GYLES (1970) que, trabalhando com linhagens de *E. coli* de origem suína, demonstraram que ambas as enterotoxinas eram codificadas por genes localizados em plasmídios conjugativos, podendo, portanto serem transferidos para outras bactérias.

O gene responsável pela síntese da enterotoxina STa encontra-se num transposon inserido num plasmídio de 57 Mdal (SO et alli, 1979; LATHE et alli, 1980; SO & MCCARTHY, 1980).

A expressão da enterotoxina STa parece estar sobre controle do modelo clássico da repressão catabólica uma vez que sua síntese é reprimida pela glicose e a adição de AMP cíclico exógeno anula a repressão (ALDERETE & ROBERTSON, 1977).

A enterotoxina STb, constituída de 48 aminoácidos e com peso molecular de 5104 daltons (WHIPP, 1990) tem uma estrutura química completamente diferente da STa uma vez que, os genes que as codificam não têm sequências homólogas (SO et alli, 1979).

A enterotoxina STb não está bem caracterizada e seu mecanismo de ação não está estabelecido (GATTI, 1983; GYLES, 1971), e parece não estar relacionada com patogenicidade em seres humanos (ECHEVERRIA et alli, 1984).

Plasmídios portadores de genes para a síntese da enterotoxina STa são muito diferentes entre si, com pesos moleculares variando de 30 a 80 Kdal e raramente contêm genes para resistência a antibióticos (STIEGLITZ et alli, 1980; WACHSMUTH et alli, 1976). O fato da enterotoxina STa ser codificada por um transposon pode explicar essa variabilidade de plasmídios transportando os genes para essa enterotoxina.

As enterotoxinas termo-lábeis (LT), também ocorrem em dois tipos: a LT-I e a LT-II.

A enterotoxina LT-I é química e imunologicamente semelhante à toxina colérica (CT), sendo neutralizada pelo antissoro anti-CT. As enterotoxinas LT-I, por sua vez, ocorrem em dois sub-tipos: um, de origem suína (LTp) e outro de origem humana (LT_h), cuja diferença reside num único resíduo de

aminoácido (DYKES et alli, 1985; YAMAMOTO et alli, 1987).

O modo de ação das enterotoxinas LT-I e LT-II são semelhantes ao da enterotoxina STa; a diferença está na enzima ativada pelas enterotoxinas LT, a adenilato ciclase, e quanto ao nucleotídio cíclico envolvido com a alteração do equilíbrio hidrossalino do intestino delgado, a adenina monofosfato (AMPc) (CHANG et alli, 1987).

A enterotoxina LT/I tem um peso molecular entre 85 e 90 Kdal, sendo composta por dois tipos de subunidades: LT-A e LT-B (CLEMENTS & FINKELSTEIN, 1979; DALLAS & FALKOW, 1979; KUNKEL & ROBERTSON, 1979; TAKEDA et alli, 1981) cujo arranjo molecular é igual ao da toxina colérica (CT), ocorrendo como um oligômero composto por cinco subunidades LT-B e uma LT-A (GILL & CLEMENTS, 1981). Estima-se que as subunidades LT-A e LT-B tenham pesos moleculares entre 25 a 30 Kdal e 11,0 a 11,5 Kdal, respectivamente (KUNKEL & ROBERTSON, 1979; DALLAS & FALKOW, 1979). As subunidades de LT e CT apresentam sequências comuns de aminoácidos (DALLAS & FALKOW, 1980; SPICER et alli, 1981). A subunidade LT-A, da mesma forma que a subunidade A de CT, é composta por dois fragmentos, A1 e A2, sendo que o fragmento A1, cujo peso molecular é estimado em 21,0 a 23,5 Kdal, tem uma atividade enzimática que ativa a enzima adenilato ciclase presente nos enterócitos, desencadeando a hipersecreção de água e eletrólitos para a luz intestinal (GILL & RICHARDSON, 1980).

O pentâmero formado pelas subunidades LT-B reagem com reseptores específicos localizados nas membranas dos enterócitos

- o gangliosídeo GM1 - liberando a subunidade LT-A para o interior da célula, onde o fragmento A1 reage com a enzima adenilato ciclase (GILL & CLEMENTS, 1981).

O pentâmero LT-B é também responsável pelas propriedades imunológicas da enterotoxina LT e provavelmente, as diferenças antigênicas entre as linhagens de origens humana e suína de ETEC sejam devido ao fato de estas subunidades não serem completamente idênticas (CLEMENTS et alli, 1982).

As subunidades LT-A e LT-B são codificadas por dois genes plasmidiano diferentes: ToxA e ToxB. Esses genes encontram-se bem caracterizados e suas sequências nucleotídicas são conhecidas (CLEMENTS et alli, 1983; DALLAS et alli, 1979; SO et alli, 1978; YAMAMOTO & YOKOTA, 1980; YAMAMOTO & YOKOTA, 1981; YAMAMOTO et alli, 1981).

A região do DNA plasmidiano responsável pela síntese de LT apresenta extensa homologia com a região de DNA cromossômico que codifica a síntese de CT em *Vibrio cholerae* (MOSELEY & FALKOW, 1980).

Os genes responsáveis pela síntese da enterotoxina LT-II estão organizados em uma unidade transcricional similar àquelas da toxina colérica e da enterotoxina LT-I. A análise da sequência nucleotídica do operon da enterotoxina LT-II revelou que o gene codificando a subunidade A da enterotoxina LT-II tem 57 % de homologia com o gene para a subunidade A da enterotoxina LTh-I e 55 % de homologia com o gene para a subunidade A da toxina colérica, sendo que a maior parte desta homologia reside na

região que codifica o fragmento A1, responsável pela ativação da enzima adenilato ciclase (PICKETT et alli, 1987). Esses autores verificaram, também, que o gene que codifica a subunidade B da enterotoxina LT-II não apresentava homologia com os genes para as subunidades B da LT-I e CT.

Plasmídios mediando a síntese da enterotoxina LT são encontrados principalmente em linhagens de ETEC de origem humana com pesos moleculares variando de 48 a 100 Mdal (ELWELL & SHIPLEY, 1980; WACHSMUTH et alli, 1975).

Na espécie humana, têm-se acumulado evidências de que a ocorrência da enterotoxina ST, em linhagens de ETEC relacionadas a casos de diarreia, parece ser preponderante sobre a da enterotoxina LT, sendo, aquela enterotoxina, sempre encontrada em linhagens de ETEC isoladas de fezes de indivíduos com diarreia, enquanto que a enterotoxina LT ocorre tanto em linhagens de ETEC isoladas de fezes de indivíduos doentes como nas isoladas de sadios (REIS et alli, 1979; LEVINE et alli, 1977). Em ETEC bovina parece não ocorrer a produção de LT (ACRES, 1985; MOON et alli (1977). Contudo, a produção de LT tem sido relatada em ETEC de origem suína (GATTI, 1983; GATTI et alli, 1985; OLIVEIRA et alli, 1982).

Vários estudos têm demonstrado que a presença simultânea de ambas as enterotoxinas, ST e LT, em linhagens de ETEC, é bastante infrequente (OLIVEIRA et alli, 1982; MERSON et alli, 1979; REIS et alli, 1980).

O papel da enterotoxina LT, isoladamente, em casos de

diarréia, não está completamente elucidado. REIS et alli (1980) verificaram que, de todas as linhagens ST/LT e ST isoladas em São Paulo, SP, o foram de pacientes com diarréia, enquanto que, linhagens produzindo apenas LT, foram isoladas de pacientes com diarréia, de crianças sadias, de alimentos e de água de rio.

Vários autores têm relatado que na maioria dos casos de diarréia em humanos, causadas por ETEC, não se tem encontrado linhagens produtoras de ST e LT simultaneamente, sendo que a ST está sempre presente em linhagens de ETEC isoladas de fezes de indivíduos com diarréia causada por essas bactérias (LOUREIRO et alli, 1983; MAGALHÃES et alli, 1981). Contudo, GIULIANO et alli (1978) relataram a ocorrência de ETEC em crianças sem sintomatologia, sendo que dentre trezentas e sessenta amostras bacterianas isoladas de setenta e dois lactentes, em um deles isolaram amostras produzindo ambas as enterotoxinas.

Estudos a respeito da etiologia da diarréia infantil endêmica em São Paulo demonstraram a presença de ETEC (LT e LT/ST) em 8,2 % de crianças com diarréia e em 11,4 % de crianças sadias só LT (REIS et alli, 1982).

2.5. FATORES DE COLONIZAÇÃO DE ETEC

Além de produzirem enterotoxinas, as ETEC apresentam outros fatores de virulência que são componentes estruturais das células bacterianas que as capacitam a colonizar, sobreviver e multiplicar-se no intestino delgado, sendo denominados **fatores de**

colonização (SMITH & HUGGINS, 1978). Os fatores de colonização mais importantes são os **pili** ou **fimbrias** que permitem que as bactérias se anexam às células epiteliais intestinais, colonizando, deste modo, o intestino delgado. Essas **fimbrias**, **adesinas**, ou **antígenos de aderência**, são filamentos protéicos delgados que cobrem a superfície da célula bacteriana. Na microscopia eletrônica, aparecem como uma cobertura difusa envolvendo a bactéria. Para cada espécie animal existem grupos de fimbrias diferentes, espécie-específicas representando um papel importante na patogênese da diarreia.

A adesão ocorre quando os sítios de ligação nas fimbrias reagem com sítios receptores específicos localizados na superfície da célula epitelial. A adesão evita que a bactéria seja removida pelos movimentos peristálticos do intestino delgado e é um evento essencial para a colonização (GRAASTRA & deGRAAF, 1982; HOHMANN & WILSON, 1975; SMITH & HALLS, 1977).

Várias destas fimbrias têm sido descritas e caracterizadas, bioquímica e geneticamente, por diversos autores e aqui serão revistos os tipos mais importantes em humanos e animais.

O primeiro fator de colonização descrito em ETEC humana foi a fimbria CFA/I por EVANS et alli (1975). Trabalhando com uma linhagem de ETEC isolada de um caso de diarreia severa, esses autores verificaram que a síntese dessa fimbria era mediada por um plasmídio de 60 Mdal, bastante instável em cultivos de laboratório.

A fímbria CFA/I ocorre em linhagens de ETEC pertencentes aos sorogrupos 015, 025, 063, 078, 0128 e 0153 (associados a casos de diarreia humana) e têm propriedades hemaglutinantes, manose-resistentes, em hemácias humanas, de boi e galinha (CRAVIOTO et alli, 1982; EVANS et alli, 1975; EVANS et alli, 1977; ØRSKOV & ØRSKOV, 1977; REIS et alli, 1980; THOMAS & ROWE, 1972).

A fímbria CFA/I é composta por subunidades de peso molecular estimado em 15.058 daltons, com um diâmetro de 3,2 nm (GAASTRA & deDRAAF, 1982; KLEMM, 1979).

Plasmídios transportando simultaneamente os genes para as sínteses da fímbria CFA/I e da enterotoxina ST, encontram-se amplamente distribuídos em linhagens de ETEC humanas, principalmente naquelas pertencentes aos sorogrupos 025, 063, 078 e 0128, com pesos moleculares variando de 52 a 76 Mdal, sendo que plasmídios com 60 Mdal são os mais freqüentes (McCONNELL et alli, 1981; MURRAY et alli, 1983; REIS et alli, 1980; SMITH et alli, 1979).

Outros autores, contudo (CARON et alli, 1989; CARON & SCOTT, 1990), relataram que os genes que codificam a síntese da fímbria CFA/I localizam-se no cromossomo bacteriano e que sua expressão dependa da presença de um gene regulador presente em um plasmídio de alto peso molecular (CARON et alli, 1989; CARON & SCOTT, 1990).

YAMAMOTO & YOKOTA (1983) demonstraram a existência de dois plasmídios diferentes nos quais existem genes para a síntese

da enterotoxina ST na linhagem de *E. coli* H10407, de origem humana: um, de 60 Mdal, contendo os genes para a síntese da fímbria CFA/I e da enterotoxina ST, e outro, de 42 Mdal, contendo os genes que codificam as sínteses das enterotoxinas ST e LT, simultaneamente. Esses autores demonstraram, ainda, que a linhagem de *E. coli* H10407 possui um terceiro plasmídio, também de 42 Mdal, que promove a transferência dos outros dois por conjugação.

EVANS & EVANS (1978) detectaram um outro fator de colonização associado à enterotoxina LT em linhagens de ETEC de origem humana, ao qual denominaram CFA/II. Este antígeno estava associado aos sorogrupos O6, O15, O25, O63 e O78. Esses autores observaram que a síntese da fímbria CFA/II era mediada por um plasmídio, que apresentava alta instabilidade em cultivos de laboratório.

A fímbria CFA/II é estruturalmente semelhante à CFA/I, com um diâmetro de 3,2 nm (GAASTRA & deGRAAF, 1982), porém não apresenta identidade sorológica com aquela fímbria (EVANS & EVANS, 1978). SMYTH (1982) relatou três diferentes antígenos de superfície, os CS1, CS2 e CS3, associados com a expressão da fímbria CFA/II, com pesos moleculares estimados em 16,3, 15,3 e 14,7 Kdal, respectivamente. Esses antígenos se expressam em diferentes combinações, de acordo com o sorotipo da bactéria (CRAVIOTO et alli, 1982; SMYTH, 1982), formando fenótipos CS1/CS3, CS2/CS3 ou somente CS3 (CRAVIOTO et alli, 1982).

Os componentes CS1 e CS2 são estruturas fimbrianas com

identidades morfológicas, mas não, imunológicas; enquanto que o CS3 é um componente não-fimbriano, fibrilar, com um diâmetro de 2 a 3 nm (SMITH et alli, 1983; SMYTH, 1984).

Vários autores (PENARANDA et alli, 1983; SMITH et alli, 1983), relataram que em várias linhagens de ETEC de origem humana, especialmente naquelas pertencentes aos sorogrupos O6, O8 e O85, a síntese da fímbria CFA/II é codificada por um plasmídio de alto peso molecular que também codifica as sínteses das enterotoxinas ST e LT, simultaneamente. Contudo, (CARON et alli, 1989; CARON & SCOTT, 1990) relataram que os genes que codificam a síntese dos componentes CS1 e CS2 localizam-se no cromossomo bacteriano e que sua expressão dependa da presença de um gene regulador presente em um plasmídio de alto peso molecular.

THOMAS et alli (1982) descobriram uma nova fímbria em ETEC de origem humana que era antigenicamente distinta das fímbrias CFA/I e CFA/II, que foi denominada E8775 ou PCF8775. Esta fímbria tem propriedades hemaglutinantes, manose-resistente, com hemácias de boi, e, a exemplo da fímbria CFA/II, é constituída por três antígenos diferentes: CS4, CS5 e CS6.

Os antígenos CS4 e CS5 são estruturas fimbrianas rígidas com pesos moleculares estimados em 17,0 e 21,0 Kdal, respectivamente, com diâmetro entre 6 e 7 nm e o CS6 é fibrilar, com peso molecular estimado em 14,5 Kdal. O antígeno CS4 ocorre no sorogrupo O25, o CS5 nos sorogrupos O92, O115, e o CS6 nos sorogrupos O25, O27, O92, O115, O148 e O169 (THOMAS et alli, 1985; McCONNELL et alli, 1988).

A fímbria PCF8775, posteriormente renomeada para CFA/IV, está codificada em plasmídios, tendo sido encontrados plasmídios codificando simultaneamente subunidades da fímbria e enterotoxinas nas seguintes combinações: CS5-CS6/ST, CS6/ST e CS6/LT (McCONNEL, 1988). Os mesmos autores relataram que em uma linhagem de ETEC de sorotipo O25:H42, os genes codificando as subunidades CS4 e CS6 estavam num plasmídio separado daquele contendo os genes para a síntese das enterotoxinas ST e LT.

HONDA et alli (1984) descreveram um outro fator de colonização expresso por linhagens de ETEC de origem humana que não tinha identidade sorológica com as fímbrias CFA/I e CFA/II, ao qual denominaram CFA/III. A linhagem de ETEC estudada por esses autores também expressava o antígeno CS6 (McCONNEL, 1986).

Recentemente, AUBEL et alli (1991) relataram um novo fator de aderência, o antígeno 8786, expresso pela linhagem de ETEC humana, a E. coli 8786, que produz somente a enterotoxina termo-estável (ST) e apresenta a propriedade de hemaglutinar unicamente hemácias humanas e de bovino. Esses autores verificaram que a síntese deste novo antígeno é mediada por um plasmídio de 70 Mdal.

Em animais, vários antígenos de aderência de ETEC foram descritos e caracterizados quimica e geneticamente.

O antígeno K88, específico de suínos, foi o primeiro a ser descrito. Este antígeno é uma fímbria composta por subunidades protéicas idênticas, cuja expressão é temperatura-dependente e está codificada em um plasmídio (STIRM et alli,

1966; STIRM et alli, 1967; JONES & RUTTER, 1972; GAASTRA & deGRAAF, 1982).

O envolvimento do antígeno K88 na colonização do intestino delgado de leitões, por células de ETEC que o produzem foi demonstrado por vários autores (BERTSCHINGER et alli, 1972; DREE & WAXLER, 1970; JONES & RUTTER, 1972; WILSON & HOHMANN, 1974).

O antígeno K88 tem propriedades hemaglutinantes, manose-resistentes, com hemácias de cobaio e galinha. As subunidades polipeptídicas que compõe esta fímbria têm um peso molecular de 27540 daltons, formando um filamento com um diâmetro de 2,1 nm (GAASTRA & deGRAAF, 1982).

Esta fímbria ocorre na forma de três variantes antigênicos K88ab, K88ac e K88ad (GUINÉE & JANSEN, 1979).

O fator de colonização K88 foi encontrado em linhagens de ETEC produzindo tanto a enterotoxina ST como a LT (GYLES et alli, 1974; SMITH & GYLES, 1970). Também foram descritas linhagens de ETEC produzindo o antígeno K88 e a enterotoxina LT, apenas (GATTI, 1983).

O gene estrutural do antígeno K88 está localizado num plasmídio transmissível (ØRSKOV & ØRSKOV, 1976). Esses autores sugeriram que esse gene poderia estar localizado num plasmídio não conjugativo que seria mobilizado por outro capaz de promover a transferência de ambos, o que mais tarde foi confirmado por BAK et alli (1972) em estudos de microscopia eletrônica.

Os determinantes genéticos para a utilização da rafinose

(Raf) também se encontram nesse plasmídio (SMITH & PARSELL, 1975) e quando este era transferido para linhagens de *E. coli* K12, dois tipos de plasmídios K88/Raf eram encontrados: o tipo mais comum sendo um plasmídio não conjugativo de aproximadamente 50 Kdal e um segundo tipo, maior e menos frequente, que provavelmente representava um estado cointegrado entre o plasmídio de 50 Kdal e um plasmídio de transferência (SHIPLEY et alii, 1978). SHIPLEY et alii (1981) isolaram e clonaram um fragmento de DNA de 8,2 Kdal do plasmídio K88/Raf pPS100, que expressava o antígeno K88, no plasmídio vetor pBR322 (BOLIVAR et alii, 1977). Esses autores verificaram que o fragmento de DNA de 8,2 Kdal codificava a síntese de cinco polipeptídios cujos pesos moleculares foram estimados em 17,0, 23,5, 26,0, 29,0 e 70,0 Kdal, sendo que o peptídio de 23,5 Kdal correspondia à subunidade da fímbria K88ac.

MOOI et alii (1979) isolaram e clonaram um fragmento de DNA de 4,3 Kdal de um plasmídio codificando o antígeno K88ab que ainda expressava esse antígeno, e, MOOI et alii (1981) determinaram a organização dos genes envolvidos na expressão dessa fímbria. Esses autores demonstraram que o operon do antígeno K88ab é composto por seis cistrons codificando seis polipeptídios de 81, 17, 27, 30, 26 e 29 Kdal, organizados nesta ordem de transcrição, sendo que o polipeptídio de 26 Kdal correspondia à subunidade da fímbria K88ab. Os outros polipeptídios encontrados devem estar envolvidos com funções de processamento, regulação da expressão, regulação da montagem e ancoragem da fímbria.

O antígeno K99 é uma fimbria de natureza protéica composta de subunidades idênticas de polipeptídios de 18,2 Kdal (deGRAAF et alli, 1984), contendo 159 resíduos de aminoácido, deduzidos de sua sequência gênica (ROOSENDAL ET ALLI, 1984). Estruturalmente, a fimbria K99 é um filamento fino, flexível, de cerca 4 nm de diâmetro, ocasionalmente apresentando uma configuração em "zig-zag" (vanEMBDEN et alli, 1980).

A fimbria K99 é geralmente encontrada em linhagens de ETEC isoladas de bezerros, leitões e cordeiros com diarreia (SMITH & LINGGOOD, 1972; MOON et alli, 1977), estando envolvida na adesão de linhagens que a expressam às células do epitélio intestinal destes animais (BURROWS et alli, 1976; HOHMANN & WILSON, 1975; ISAACSON et alli, 1978). Esta fimbria ocorre nos sorogrupos 08, 09, 020, 026, 0101 e 0141 e encontra-se frequentemente associada à produção da enterotoxina STa (EVANS et alli, 1977; SMITH & GYLES, 1970; SMITH & HUGGINS, 1978; SMITH & LINGGOOD, 1972; vanEMBDEN et alli, 1980). O antígeno K99 apresenta propriedades hemaglutinantes com hemácias de cavalo e carneiro (GAASTRA & deGRAAF, 1982; GUINÉE et alli, 1976).

O determinante genético do antígeno K99 localiza-se num plasmídio conjugativo de cerca de 57 Mdal (SMITH & LINGGOOD, 1972; SO et alli, 1976) e sua expressão é influenciada por condições ambientais e fenótipo da bactéria hospedeira.

O antígeno K99 não é produzido em temperaturas abaixo de 30 °C e a glicose e a alanina exercem efeito inibitório em sua expressão (deGRAAF et alli, 1980a; deGRAAF et alli, 1980b; GUINÉE

et alli, 1976; ISAACSON, 1980).

GUINÉE et alli (1976) mostraram que a glicose reprime a expressão do K99 e que adição de AMPc não anula a repressão catabólica mediada pela glicose.

Para se detectar o antígeno K99, *in vitro*, a bactéria produtora deve ser cultivada em meio de cultura adequado para a sua expressão (GUINÉE et alli, 1977).

Em adição à repressão catabólica mediada pela glicose e a temperatura, a expressão do K99 parece ser influenciada pela presença de oxigênio, pelo menos, *in vitro*. ISAACSON et alli, (1978) observaram que o cultivo da bactéria produtora sob forte aeração em meio líquido apropriado antes do plaqueamento em meio de expressão aumenta a detectabilidade do antígeno K99 em linhagens de ETEC K99+.

Os níveis de expressão do antígeno K99 é fortemente influenciado pelo genótipo/sorogrupo da bactéria hospedeira (deGRAAF et alli, 1980b; vanEMBDEN et alli, 1980).

deGRAAF et alli (1980a; 1980b) observaram que, em linhagens selvagens de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) produtoras do antígeno K99, aquelas pertencentes ao sorogrupo O101 expressam esse antígeno em níveis maiores que as pertencentes aos sorogrupos O8, O9, O20.

O operon responsável pela síntese do antígeno K99 encontra-se num fragmento de DNA plasmidiano de 4,5 Mdal (vanEMBDEN et alli, 1980) e é composto por sete cistrons codificando sete polipeptídios de 18,2, 76, 21,5, 21, 26,5, 33,5

e 19 Kdal, organizados nesta ordem de transcrição, sendo que o peptídeo de 18,2 Kdal corresponde à subunidade da fímbria (deGRAAF et alli, 1984).

Posteriormente, BAECKER et alli (1989) contruíram um mapa genético do operon do antígeno K99 que era razoavelmente concordante com o descrito por deGRAAF et alli (1984). Este operon codificava sete polipeptídios de 16, 76, 17, 23, 29 e 16,5 Kdal, organizados nesta ordem de transcrição, com o peptídeo de 17 Kdal correspondendo à subunidade da fímbria. Aqueles autores obtiveram evidências de que os genes necessários para a expressão do antígeno K99 encontram-se divididos em dois operons separados, porém contíguos, regulados por dois promotores independentes. O primeiro promotor está localizado anteriormente à região codificadora do peptídeo de 16 Kdal e o segundo localiza-se na região imediatamente anterior ao gene estrutural do peptídeo de 17 Kdal, ou seja, da subunidade da fímbria K99. Esses mesmos autores verificaram que o fragmento de DNA codificando o antígeno K99 podia ser sub-clonado em dois plasmídios recombinantes compatíveis, ocorrendo complementariedade completa para a síntese desta fímbria.

A fímbria K99 reconhece como receptor específico o gangliosídeo (glicoproteína) ácido N-glicosil-alfa-, 2-3 D-galactose-beta, 1-4 D-glicose-ceramidio (NeuGcLacCer) presentes nas membranas de hemácias de cavalo (GAASTRA & deGRAAF, 1982; SMIT et alli, 1984) e das células epiteliais da mucosa do intestino delgado de porcos (TENENBERG et alli, 1989, Apud ONO et

alli, 1989, provavelmente ligando-se a esses receptores pela extremidade da fímbria (LINDBERG et alli, 1987).

ONO et alli (1989) demonstraram que o epítipo reconhecido pela fímbria K99 é a porção terminal NeuGc do gangliosídeo. Gangliosídeos análogos que são reconhecidos pela fímbria, embora com menor eficiência, são também encontrados nas membranas de hemácias humanas (LINDAHL & WADSTROM, 1981) e de carneiro (FARIS et alli, 1980).

Este reconhecimento pode contribuir para a especificidade de hospedeiro. Linhagens de ETEC K99+ usualmente se aderem às células epiteliais do intestino delgado de bovinos, tendo maior especificidade às células epiteliais do intestino delgado de bezerros recém-nascidos do que àquelas de animais adultos (RUNNELS et alli, 1980). Este fato sugere que a afinidade e a localização das ETEC no intestino delgado está relacionada com a disponibilidade e a localização de gangliosídeos específicos (ONO et alli, 1989).

O F41, relatado pela primeira vez por MORRIS et alli (1980), é um antígeno fimbriano, de natureza protéica formado por subunidades polipeptídicas de 29 Kdal (ANDERSON & MOSELEY, 1988). A expressão desta fímbria tem sido encontrada em combinação com a expressão do antígeno K99 em ETEC bovina e suína (MORRIS et alli, 1983).

Estruturalmente, a fímbria F41 é um filamento de 3,2 nm de diâmetro (deGRAAF & ROODA, 1982; MORRIS et alli, 1980) e o seu determinante genético localiza-se comumente no mesmo plasmídio da

fímbria K99 e sua expressão também é temperatura dependente (ANDERSON & MOSELEY, 1988; GAASTRA & deGRAAF, 1982).

O operon controlando a síntese do antígeno F41 é composto por quatro cistrons codificando quatro polipeptídios de 29, 30, 32 e 86 Kdal, sendo que o peptídio de 29 Kdal corresponde à subunidade da fímbria (ANDERSON & MOSELEY, 1988).

O sequenciamento dos nucleotídios do gene estrutural da subunidade da fímbria revelou extensa homologia entre as regiões codificando as sequências sinais dos antígenos F41 e K88 e nas regiões imediatamente anteriores às dos dois genes estruturais. Uma sonda genética específica para o antígeno K88 hibridiza com alta estringência com todos os fragmentos essenciais para a produção do antígeno F41, exceto com o fragmento que codifica o gene estrutural (ANDERSON & MOSELEY, 1988).

O antígeno 987P, específico de ETEC de origem suína, é um antígeno fimbriano de natureza protéica, constituído por subunidades polipeptídicas de 20 Kd. Estruturalmente é uma fímbria rígida de 7 nm de diâmetro (GAASTRA & deGRAAF, 1982).

Este antígeno ocorre com maior frequência nos sorogrupos O8, O9, O20, O64, O108, O138, O139, O141, O147, O149 e O 157, frequentemente associado à produção da enterotoxina STa (GAASTRA & deGRAFF, 1982; MOON et alli, 1980). GUINÉE & JANSEN (1979) associaram a produção da enterotoxina LT com linhagens de ETEC do sorogrupo O8.

Os primeiros estudos da genética do antígeno 987P indicavam que seu determinante genético estava localizado no

cromossomo bacteriano e que sua expressão estava sob controle do fenômeno da variação de fase (deGRAAF & KLAASEN, 1986; MORRISSEY & DOUGAN, 1986).

Um mapa genético do operon do antígeno 987P construído por deGRAAF & KLAASEN (1986) identifica cinco cistrons que codificam cinco polipeptídios de 17,2, 16,5, 28,5, 81 e 39 Kdal, organizados nesta ordem de transcrição, sendo que peptídio de 17,2 Kdal corresponde à subunidade da fímbria.

Contudo, SCHIFFERLI et alli (1990) relataram um caso em que a síntese do antígeno 987P era mediada por um plasmídio de 35 Mdal, capaz de expressar esse antígeno em uma linhagem de *E. coli* K12.

Posteriormente, KLAASEN et alli (1990) relataram a existência de um transposon bacteriano codificando o enterotoxina ST, contíguo ao DNA do operon do antígeno 987P. Esses autores encontraram evidências de que esse transposon, relacionado com o Tn1681, está envolvido com a ativação do operon deste antígeno.

Recentemente, um novo fator de colonização, o F42, foi descrito em ETEC de origem suína (LEITE, 1986; LEITE et alli, 1988; YANO et alli, 1986b), cuja síntese é mediada por um plasmídio conjugativo de 40,4 Mdal, que também codifica a síntese da enterotoxina STa e contém genes para resistência à canamicina e estreptomicina (SILVEIRA, 1986).

Fímbrias do tipo I também ocorrem em ETEC e, embora se saiba que estas fímbrias mediem a adesão a células epiteliais intestinais, *in vitro*, não se sabe se são expressas nas condições

ambientais naturais existentes no intestino delgado ou se são fatores de adesão importantes, *in vivo* (ISAACSON et alli, 1978).

2.6. RESISTÊNCIA A DROGAS EM ETEC

Resistência a drogas é um fenômeno que ocorre amplamente em ETEC. Linhagens de ETEC, rotineiramente, transportam cinco ou mais tipos distintos de plasmídios, um ou mais, sendo frequentemente um plasmídio R (ELWELL & SHIPLEY, 1980; SILVA et alli, 1981).

O relacionamento entre resistência a drogas e síntese de enterotoxinas foi estudado por vários autores (WACHSMUTH et alli, 1976; SILVA et alli, 1981; SCALETISKY et alli (1982); SCALETISKY et alli, 1983). Usualmente, estas características são codificadas por plasmídios independentes (SILVA et alli, 1981; SCALETISKY et alli, 1983), sendo de baixa frequência a ocorrência de plasmídios codificando simultaneamente resistência a drogas e síntese de um ou outro tipo de enterotoxina.

Plasmídios codificando simultaneamente as sínteses das enterotoxinas ST e LT são encontrados em linhagens de ETEC de origem humana e animal, compartilhando cerca de 87 % de seqüências homólogas quando as linhagens portadoras são de mesma origem e 55 % de homologia quando as linhagens são de origens diferentes (SO et alli, 1985). Estes plasmídios não são comuns e parecem restritos a três sorogrupos: O8, O77 e O78. Seus pesos moleculares variam de 52 a 100 Mdal, não são conjugativos, porém

passíveis de mobilização por plasmídios R (ECHEVERRIA & MURPHY, 1980; SILVA et alli, 1983; WACHSMUTH et alli, 1979). Alguns destes plasmídios apresentam genes para resistência a antimicrobianos como ampicilina (STIEGLITZ et alli, 1980), sulfadiazina e estreptomicina (SILVA et alli, 1983) e à tetraciclina (ECHEVERRIA & MURPHY, 1980).

Até 1981, tais plasmídios haviam sido detectados apenas em duas linhagens de *E. coli*. Uma delas, isolada de suíno com diarreia, continha um plasmídio (pCG86), que simultaneamente determinava a síntese das enterotoxinas ST e LT e codifica resistência a estreptomicina, sulfadiazina, e a tetraciclina (SILVA et alli, 1978). A outra linhagem, de origem humana, continha um plasmídio de 80 Mdal que determinava a síntese da enterotoxina ST e conferia resistência à ampicilina (STIEGLITZ et alli, 1980).

Não existem provas conclusivas de sensibilidade característica a uma droga particular em ETEC que justifique a tomada de medidas profiláticas baseada na administração de antibióticos contra diarreia em suínos e bovinos, o que inclusive teria a desvantagem de selecionar bactérias resistentes ao antibiótico.

O uso abusivo de antibióticos pode responder pelo aumento da resistência a drogas por parte de certos grupos de microrganismos com reflexos na terapêutica humana e animal, principalmente no que diz respeito a bactérias gram-negativas, devido à seleção de linhagens apresentando resistência múltipla a

drogas.

Em vários países, inclusive no Brasil, antibióticos vêm sendo aplicados como aditivos em rações para promover o crescimento de animais e muitas vezes esses antibióticos são os mesmos utilizados no tratamento de doenças em humanos e animais.

2.7. INFECÇÕES EM BEZERROS RECÉM-NASCIDOS CAUSADAS POR *E. coli*

A *E. coli* pode causar duas doenças comuns em bezerros recém-nascidos: a colisepticemia, na qual a bactéria invade a circulação sistêmica e órgãos internos (SMITH & HALLS, 1968) e a colibacilose entérica, na qual a bactéria se localiza na luz e na superfície da mucosa do intestino delgado (SMITH & HUGGINS, 1979).

As características dessas duas patologias são marcadamente diferentes e os tipos de *E. coli* que as causam também diferem. Cada tipo possui atributos particulares de virulência que o diferencia dos outros, bem como do grupo não-patogênico de *E. coli*, que é um dos constituintes da microbiota intestinal normal de bezerros saudáveis. As linhagens de *E. coli* que causam septicemias sobrevivem e se multiplicam no sangue e órgãos internos de bezerros infectados, enquanto que, as linhagens de *E. coli* que causam diarreia são equipadas para sobreviver localizadamente no epitélio do intestino delgado (SMITH & HUGGINS, 1979).

Tanto num caso como no outro, os bezerros se infectam com

E. coli durante ou logo após o nascimento, frequentemente por transmissão fecal-oral. Normalmente, linhagens não-patogênicas de *E. coli* são umas das primeiras espécies bacterianas a infectar o trato gastrintestinal e no fim do primeiro ano de vida, estão presentes por todo o intestino (ACRES, 1985).

2.7.1. COLISEPTICEMIA

A septicemia é um processo não bem elucidado, ocasionado por linhagens invasivas de *E. coli* (LEITE et alli, 1990; LINTERMANS et alli, 1980; MORRIS, 1985; SHIMIZU et alli, 1987).

Três antígenos fimbrianos associados à diarreia e septicemia foram descritos. A fímbria F17, sorologicamente distinta das fímbrias K88, K99, F41 e 987P, que media adesão à mucosa do intestino delgado de bovino (LINTERMANS et alli, 1988) e as fímbrias FY e 31A (GIRARDEAU et alli, 1980, Apud LEITE et alli, 1989; LEITE et alli, 1989; MORRIS, 1987; SHIMIZU et alli, 1987). A ocorrência de linhagens de *E. coli* portadoras de fímbrias FY, no Brasil, foi descrita pela primeira vez por LEITE et alli (1990). Os mecanismos de patogenicidade das linhagens portadoras destas fímbrias não está esclarecido.

Aparentemente, a septicemia causada por linhagens invasivas de ETEC, está correlacionada a uma infecção mista com outra linhagem de ETEC produtora de enterotoxinas. SHIMIZU et alli (1987) em estudos de infecção experimental de bezerros, verificaram que duas linhagens distintas de ETEC, uma expressando

a fímbria 31A e outra expressando a fímbria FY, eram septicêmicas e letais quando associadas a uma linhagem de ETEC produtora de enterotoxina STa.

2.7.2. COLIBACILOSE ENTÉRICA

As principais características da patogênese da colibacilose entérica são: (1) infecção com ETEC, (2) adesão da ETEC às células epiteliais intestinais resultando na colonização do intestino delgado e (3) produção de enterotoxina STa ativa.

Essa sucessão de eventos leva a uma diarreia aguda, aquosa e profusa, culminando em desidratação, acidose metabólica e morte em casos severos.

A infecção se dá durante ou logo após o nascimento, frequentemente por transmissão fecal-oral. (ACRES, 1985).

O rápido estabelecimento da *E. coli* é favorecido por várias características dos bezerros recém-nascidos, incluindo um pH relativamente alto no abomaso, lenta motilidade intestinal e ausência de microbiota competidora. A maioria das células de linhagens de *E. coli* não-patogênicas se encontram suspensas no trato intestinal sendo constantemente propelidas em direção distal pelos movimentos peristálticos e pelo fluxo do conteúdo intestinal. Quando ocorre ingestão de linhagens enterotoxigênicas de *E. coli*, estas se multiplicam e colonizam o intestino delgado, aderindo-se à borda ciliada dos enterócitos (SMITH & HUGGINS, 1978).

A colonização da porção posterior do intestino delgado é o evento central na enteropatogênese. A adesão de células de ETEC à mucosa intestinal é um mecanismo vital na patogênese, evitando que a bactéria seja removida pelos movimentos peristálticos do intestino delgado. Consequentemente, a colonização leva a um significativo aumento do número de células de ETEC, bem como da proporção em que estão aderidas à mucosa intestinal (SMITH & HUGGINS, 1978; SMITH & LINGGOOD, 1972).

A dinâmica da colonização foi estudada em bezerros privados de colostro, onde parece que a colonização tem início na junção íleo-cecal cerca de três horas após a infecção e progride em direção proximal, envolvendo até 60 % do intestino delgado, por volta de dezesseis horas após a infecção (PEARSON & LOGAN, 1979, Apud ACRES, 1985).

A seguinte sequência de eventos foi sugerida para a colonização: as superfícies das células bacterianas e das células epiteliais intestinais são carregadas negativamente, havendo uma tendência natural para uma repulsão mútua. As fímbrias projetam-se da superfície da bactéria, através da zona de repulsão, para alcançarem receptores específicos localizados na superfície das células epiteliais das vilosidades intestinais e iniciarem o processo de adesão. Após a adesão primária, as bactérias se multiplicam formando microcolônias que cobrem a superfície das vilosidades, formando, por vezes, várias camadas de células bacterianas (CHAN et alli, 1982).

O fator de colonização mais importante em ETEC bovina é o

antígeno K99 que ocorre na maioria, se não em todos, os isolados enterotoxigênicos relacionados com diarreia neonatal em bezerros (GUINÉE et alli, 1976; MEYERS & GUINÉE, 1976; MOON et alli, 1976; SMITH & LINGGOOD, 1972). Contudo, enquanto algumas linhagens de ETEC bovina possuem apenas a fímbria K99, outras possuem, associadas a esta, a fímbria F41 (MORRIS et alli, 1978; MORRIS et alli, 1980; MORRIS et alli, 1982; MORRIS et alli, 1983b), o que pode intensificar a colonização e a virulência. Como exemplo, cita-se o caso da linhagem de E. coli B41 que expressa concomitantemente as fímbrias K99 e F41 (MORRIS et alli, 1978; MORRIS et alli, 1980).

Além das adesinas K99 e F41, várias outras adesinas envolvidas no processo infeccioso são conhecidas em E. coli de origem bovina, associadas com diarreia neonatal, como os antígenos FY e 31A (GIRARDEAU et alli, 1980, Apud LEITE, 1989; LEITE et alli, 1989; MORRIS, 1987; SHIMIZU et alli, 1987) e Att25 (POHL et al., 1982, Apud LEITE et alli, 1989).

O antígeno F41 tem sido encontrado em combinação com o antígeno K99 em ETEC bovina (ISAACSON et alli, 1978; MORRIS et alli, 1980; MORRIS et alli, 1982; MORRIS et alli, 1983b), não tendo sido isoladas linhagens de ETEC bovinas com o fenótipo K99-F41+. Contudo, linhagens de ETEC suínas com o fenótipo K99-F41+, já foram isoladas (MORRIS et alli, 1983b).

A fímbria Att25 ocorre associada ao K99 em 12 % das ETEC bovinas e linhagens K99-Att25+ já foram isoladas (POHL et alli, 1982; POHL et alli, 1983, Apud ACRES, 1985).

A importância das adesinas FY e 31A é sugerida em pesquisas realizadas em bezerros, nos quais, através de desafios, linhagens de *E. coli* não-enterotoxigênicas (NETEC) produtoras destes antígenos, foram capazes de produzir diarreia nos animais inoculados (CONTREPOIS et alli, 1985; SHIMIZ et alli, 1987).

No Brasil, LEITE et alli (1989) verificaram a ocorrência de 9,3 % de linhagens de *E. coli* FY+ isoladas de bezerros com diarreia, não estando associadas aos antígenos K99 ou F41. Tais linhagens não produziam enterotoxinas STa ou LT/I ou verocitotoxina (VT), como também verificado por SHIMIZU et alli (1987), no Japão.

Embora o antígeno K99 seja o fator de colonização predominante em ETEC bovina, pode haver, portanto, outros tipos de fatores de colonização, além do F41, ocorrendo associadas ou não a este antígeno, e que podem ser de importância em infecções intestinais em bovino.

Situação similar ocorre em linhagens de ETEC de origem suína nas quais ocorrem diferentes tipos de fímbrias como o próprio K99 (MORRIS et alli, 1983b), o K88, o 987P (NAGY et alli, 1976; NAGY et alli, 1977) e o recentemente descrito F42 (LEITE et alli, 1988).

Fímbrias do tipo I também ocorrem em ETEC bovina e, embora se saiba que estas fímbrias mediem a adesão a células epiteliais intestinais, in vitro, não se sabe se são expressas nas condições ambientais naturais do intestino delgado ou se são fatores de adesão importantes, in vivo (ISAACSON et alli, 1978).

Quando um grande número de células de ETEC coloniza o intestino delgado, uma quantidade suficiente de enterotoxina termo-estável (STa) é produzida para causar diarreia. A STa é liberada da célula bacteriana e se difunde na luz intestinal, ligando-se a sítios receptores específicos presentes nas membranas dos enterócitos. A enterotoxina altera o fluxo normal de íons e água da mucosa intestinal, como mencionado anteriormente, provocando a diarreia.

Em ETEC bovina, ao contrário do que ocorre em ETEC de origem suína, nas quais se encontra a produção da enterotoxinas termo-lábil (LT) (GATTI, 1983; GATTI et alli, 1985; SACK, 1975) e termo-estáveis (STa e STb) (BURGESS et alli, 1978; GATTI, 1983; MOSELEY et alli, 1983; SACK, 1975), somente a enterotoxina STa parece estar envolvida na patogênese da diarreia neonatal (MOON et alli, 1976).

Bezerros infectados com ETEC podem perder de 1 a 2,7 litros de fluido intestinal num período de 24 horas (FISCHER & MARTINEZ, 1975, Apud ACRES, 1985; LOGAN et alli, 1974, Apud ACRES, 1985), com consequente desidratação, perda de peso e morte de grande número de animais infectados entre 48 e 72 horas após o início dos sintomas.

Aparentemente, existe um estreito relacionamento entre a ocorrência de STa e K99, (e em menor extensão, F41) e determinados sorogrupos em ETEC bovina. Como a produção de STa, K99 e de outras fímbrias é controlada por plasmídios transmissíveis (SMITH & GYLES, 1970; SMITH & HUGGINS, 1978; SMITH

& LINGGOOD, 1972; SO et alli, 1976; vanEMBDEN et alli, 1980), isto sugere que células de determinados sorogrupos, notadamente os 08,09, 020, 026 e 0101, apresentam alguma vantagem para a expressão de fímbrias e enterotoxinas, tendo sido sugerido que tais sorogrupos sejam reservatórios daqueles plasmídios (EVANS et alli, 1977).

A natureza transmissível desses plasmídios facilitou estudos da genética da produção de enterotoxinas, de fatores de colonização e na definição do papel de cada fator na patogênese da diarreia. Pela obtenção de mutantes apresentando várias combinações dos fatores de virulência K99 e STa, foi demonstrado que tanto a enterotoxina STa como o antígeno K99 são necessários para causar diarreia (SMITH & HUGGINS, 1978; SMITH & LINGGOOD, 1972). É muito provável que outros tipos de fímbrias atuem como fatores de colonização, isoladamente ou em combinação com a fímbria K99 (MORRIS et alli, 1983b; POHL et alli, 1982, Apud ACRES, 1985; POHL et alli, 1983, Apud ACRES, 1985). Se assim o for, é provável que linhagens de ETEC K99- sejam eventualmente confirmadas como causadoras de diarreia em bezerros recém-nascidos.

Estudos epidemiológicos revelaram que a incidência de ETEC varia amplamente, sendo provavelmente afetada por fatores geográficos, administrativos e sazonais. Infecções causadas por linhagens de ETEC parece ser uma das causas mais comuns de diarreia em bezerros com três a quatro dias de vida, sendo frequente a ocorrência de mortes. Animais infectados são o

principal reservatório de linhagens de ETEC e suas fezes são a maior fonte de contaminação ambiental. A passagem de linhagens de ETEC de animal para animal acarreta um efeito multiplicador, uma vez que cada animal infectado excreta um número consideravelmente maior de células de ETEC do que o que tenha ingerido (ACRES, 1985).

Animais infectados são o principal reservatório de linhagens de ETEC e suas fezes são a maior fonte de contaminação ambiental. A passagem de linhagens de ETEC de animal para animal acarreta um efeito multiplicador, uma vez que cada animal infectado excreta um número consideravelmente maior de células de ETEC do que o que tenha ingerido e bezerros recuperados podem continuar a eliminar a bactéria por vários meses. Bezerros sadios infectados subclínicamente podem excretar quantidades significantes de células de ETEC (ACRES, 1985).

Uma população de ETEC pode persistir num rebanho, fluindo através de animais de todas as idades e animais portadores introduzidos num rebanho não-infectado podem ser a principal causa de surtos naturais de diarreia neonatal. Além disso, a *E. coli* é relativamente resistente às condições naturais, podendo sobreviver por até seis meses em estábulos contaminados com fezes diarreicas (ACRES, 1985).

Para se detectar a presença de ETEC em fezes procedentes de animais com diarreia, o método mais comum é o da coprocultura ou da cultura dos conteúdos intestinais do animal afetado, em laboratório. As amostras de *E. coli* encontradas devem ser

analisadas quanto a características de virulência específicas das ETEC, como a detecção do antígeno K99, através da culturas dessas amostras em meios adequados para a expressão desta fímbria (GUINÉE et alli, 1977), juntamente a detecção da enterotoxina STa, que via de regra é feita pelo clássico teste do camundongo recém-nascido (DEAN et alli, 1975; HARNETT & GYLES, 1983; MOON et alli, 1976). Recentemente, foi desenvolvido um ensaio de hibridização de DNA para a detecção desta enterotoxina (MOSELEY et alli, 1980; MOSELEY et alli, 1982).

Contudo, o isolamento de linhagens com fenótipo K99+STa+ não é prova segura de que a diarreia tenha sido provocada por linhagens de ETEC, uma vez que estas podem ser isoladas de animais sadios.

A perda da susceptibilidades dos bezerros à infecção por ETEC parece ocorrer após duas semanas de vida (BURGESS et alli, 1978), o que sugere o desenvolvimento de mecanismos protetores, como resistência à colonização, resistência à ação de enterotoxinas e/ou a mudança ou ausência de receptores específicos de fímbrias e/ou enterotoxinas, à medida que o animal torna-se mais velho. Estudos in vitro revelaram que linhagens de ETEC K99+ apresentam maior afinidade às células epiteliais do intestino delgado de bezerros recém-nascidos do que àquelas de animais adultos (RUNNELS et alli, 1980), sugerindo que a afinidade e a localização das ETEC no intestino delgado está relacionada com a disponibilidade e localização de receptores específicos (ONO et alli, 1989).

Nos casos de diarreia em bezerros com mais de duas semanas de vida, nos quais linhagens de ETEC tenha sido isoladas, a diarreia é comumente provocada por uma infecção mista de ETEC e rotavírus (MOON et alli, 1976; TZIFORI et alli, 1981, Apud ACRES, 1985). Nestes casos, observou-se que um grande número de células de ETEC encontrava-se aderido à mucosa intestinal infectada pelo vírus, sugerindo que este tenha alterado o epitélio, prolongando o período de susceptibilidade à colonização ou que as células de ETEC estariam se aderindo por outros mecanismos.

2.8. MECANISMOS DE IMUNIDADE À COLIBACILOSE ENTERICA

Existe uma variedade de mecanismos **específicos** e **não específicos** que potencialmente podem impedir infecções bacterianas.

Como mecanismos **específicos** consideram-se aqueles que conferem imunidade mediada por anticorpos: anticorpos anti-adesão, anti-toxinas, bactericidas (interação anticorpo-complemento) ou bacteriostáticos (interação anticorpo-lactoferrina).

Como mecanismos **não-específicos** consideram-se aqueles mediados pela ação de fatores outros que não anticorpos como a lactoferrina e a transferrina, o sistema lactoperoxidase-tiocianato-peróxido de hidrogênio e análogos para sítios receptores de fímbrias e enterotoxinas.

2.8.1. MECANISMOS NÃO-ESPECÍFICOS

O colostro de vacas não-imunizadas fornece alguma proteção contra infecção intestinal mediada por ETEC, contudo não é abrangente e frequentemente falha em proteger bezerros recém-nascidos. LOGAN et alli (1977, Apud ACRES, 1985), demonstraram que o tempo de alimentação com o colostro, relativo ao tempo de infecção, é um fator importante e que o colostro deve ser consumido antes que a infecção ocorra, para que se estabeleça uma barreira imunológica a nível de intestino delgado.

Há, também, uma correlação entre o tempo em que o colostro é ingerido e a quantidade de células de ETEC à qual os animais são submetidos. Estudos demonstraram que a proteção conferida pelo consumo antecipado de colostro não-imune pode ser anulada quando doses relativamente altas de ETEC são administradas experimentalmente (ACRES et alli, 1979; ACRES et alli, 1982; NAGY, 1980). Portanto, práticas de criação que causam consumo tardio ou inadequado de colostro, ou exposição a um ambiente altamente contaminado, prejudicam a ação da proteção natural e favorecem surtos de diarreia neonatal mediada por ETEC (ACRES et alli, 1982).

Os mecanismos de proteção fornecidos pelo colostro de vacas não-imunizadas não estão bem caracterizados. LOGAN et alli (1977, Apud ACRES, 1985) observaram que a alimentação com colostro antes do desafio experimental evitava a diarreia mas que, anticorpos anti-antígeno somático da linhagem desafio,

isolados do colostro e dados separadamente, apenas reduziam a severidade da diarreia mas não a evitavam (LOGAN et alli, 1974, Apud ACRES, 1985), sugerindo que além destes anticorpos outros fatores estavam envolvidos.

Outros autores observaram que uma proporção variável de bezerros era resistente a infecções experimentais mesmo que não fossem detectados anticorpos contra a linhagem desafio no colostro de suas mães (ACRES et alli, 1982), tendo sido aventadas várias explicações para essas observações: (1) falta de sensibilidade dos testes de identificação de anticorpos, (2) presença de anticorpos para antígenos outros que aqueles ensaiados, tais como, fímbrias, cápsulas, enterotoxinas não identificadas, ou outros antígenos bacterianos ou endotoxinas, (3) fatores de proteção não-imunoglobulínicos e (4) ausência geneticamente determinada de receptores para o antígeno K99 em alguns bezerros.

Nas secreções mamárias, ocorrem inibidores bacterianos de natureza não-imunoglobulínica como as proteínas ferroquelantes lactoferrina e transferrina (BROCK et alli, 1983; LAW & REITER, 1977, Apud ACRES, 1985; REITER et alli, 1975, Apud ACRES, 1985) e o sistema lactoperoxidase-tiocianato-peróxido de hidrogênio (LP) (REITER et alli, 1976).

As proteínas ferro-quelantes apresentam um efeito bacteriostático uma vez que o ferro que é um micronutriente essencial ao crescimento bacteriano. A *E. coli*, por sua vez, produz uma proteína ferro-quelante, a enterobactina, que pode

sobrepular a ação da lactoferrina e da transferrina (REITER et alli, 1975).

O sistema LP pode também conferir proteção contra ETEC bovina conquanto todos os três componentes do sistema estejam presentes: a lactoperoxidase, o tiocianato e o peróxido de hidrogênio. Os dois primeiros são fornecidos pelo colostro e pelo leite e o peróxido de hidrogênio é produzido por lactobacilos da microbiota incipiente do animal (REITER et alli, 1976). Os lactobacilos, por sua vez, só se encontram no abomaso do animal após o segundo dia de vida (ACRES, 1985) e portanto, esse sistema não se encontra ativo imediatamente após o nascimento.

Outros fatores não-imunoglobulínicos presentes nas secreções mamárias são análogos estruturais-funcionais de sítios receptores de fímbrias e de enterotoxinas. Esses análogos poderiam ligar-se a fímbrias ou enterotoxinas antes que alcançassem as microvilosidades intestinais, auxiliando na prevenção de infecções causadas por linhagens de ETEC. Em bovinos, as membranas dos glóbulos gordurosos do leite das vacas contêm um receptor mucoproteico (bamp) que bloqueia a adesão de células de ETEC produtoras da fímbria K99 a enterócitos de bezerros in vitro, podendo ter função similar in vivo (PRINGNITZ et alli, 1981, Apud ACRES, 1985). Análogos de receptores para a enterotoxina LT de E. coli foram detectadas em leite humano o que sugere que análogos de receptores para a enterotoxina STa também possam ocorrer no leite bovino (HOLMGREN et alli, 1981).

Outra maneira de se bloquear a aderência bacteriana seria

introduzir no intestino delgado, um excesso de fímbrias ou análogos de fímbrias que se ligariam aos sítios receptores, tornando-os indisponíveis para a adesão de células de ETEC. Isto foi demonstrado em suínos por DAVIDSON & HIRSH (1975) que observaram que a administração de linhagens não-enterotoxigênicas de *E. coli* produtoras da fímbria K88 a leitões, reduzia a severidade da diarreia causada por uma linhagem de ETEC suína produtora dessa fímbria.

2.8.2. MECANISMOS ESPECÍFICOS

Uma vez que os mecanismos de imunidade não-específica não fornecem proteção efetiva contra infecções causadas por ETEC, bezerros recém-nascidos dependem de anticorpos protetores presentes nas secreções mamárias de suas mães para a prevenção de infecções sistêmicas e intestinais provocadas por essas bactérias. Anticorpos presentes no colostro e que são absorvidos do intestino delgado para a circulação sistêmica durante as primeiras vinte e quatro horas de vida, previnem a colisepticemia mas, fornecem pouca ou nenhuma proteção contra a colibacilose. Ao contrário, anticorpos que permanecem na luz intestinal previnem a colibacilose mas não previnem a colisepticemia, não sendo incomum que bezerros sejam protegidos contra colisepticemia mas sejam completamente susceptíveis a diarreia (LOGAN et alli, 1974, Apud ACRES, 1985; SMITH & HUGGINS, 1979).

As propriedades imunizantes dos vários antígenos de ETEC

bovina, tais como antígenos somáticos, capsulares, fímbrias e até mesmo da enterotoxina STa têm sido estudadas. A maioria das evidências relacionadas às propriedades imunogênicas destes antígenos têm sido obtidas em ensaios de vacinação, nos quais vacas prenhes foram vacinadas, subcutânea ou intramuscularmente, no trimestre final da gestação para estimular a formação de anticorpos séricos que são concentrados no colostro antes do parto. Após o parto, permitia-se que os bezerros se alimentassem com colostro, sendo, então, desafiados com linhagens de ETEC por volta das dez a dezoito horas de vida. O grau de proteção foi determinado avaliando-se o relacionamento entre o título de anticorpos no colostro e a ocorrência de diarreia e morte (ACRES et alli, 1979; ACRES et alli, 1982; NAGY, 1980).

As evidências mais seguras da capacidade imunogênica dos antígenos de ETEC provém de estudos usando antígenos fimbrianos bioquimicamente puros, para a vacinação.

Os antígenos K99 e F41 são altamente imunogênicos (deGRAAF & ROORDA, 1982; MOON, 1981; PORTER et alli, 1974; RUTTER, 1975) e podem ser obtidos em quantidades suficientes em ensaios de vacinação. ACRES et alli, 1979 observaram que bezerros aleitados por vacas vacinadas com o antígeno K99 purificado, antes do parto, eram protegidos, enquanto que bezerros aleitados em vacas não vacinadas apresentaram diarreia. A proteção tinha uma correlação positiva com a presença de anticorpos anti-K99 no colostro das vacas vacinadas, embora a linhagem desafio, a *E. coli* B44, fosse portadora tanto do antígeno K99 como do F41.

Vários autores utilizaram diferentes tipos de preparações imunizantes como minicélulas de *E. coli* K99+ purificadas (ACRES et alli, 1979) ou parcialmente purificadas (MORRIS et alli, 1980b; NAGY, 1980) e bacterinas de células intactas (ACRES, 1982; MYERS, 1980), para induzir imunidade contra o antígeno K99.

SHERMAN et alli (1983) verificaram que anticorpos monoclonais anti-K99, produzidos em camundongos, apresentaram um efeito protetor contra ETEC quando, sob condições experimentais, uma solução contendo esses anticorpos era administrada à bezerras. Se uma proteção similar pudesse ser demonstrada em condições de campo, o uso de anticorpos monoclonais poderia ser um método conveniente para prevenir a diarreia.

Quanto aos antígenos somáticos "O" de ETEC, não há evidências conclusivas quanto à sua capacidade imunogênica. Em um estudo, a vacinação com uma linhagem de *E. coli* que compartilhava somente o antígeno somático com a linhagem desafio não forneceu proteção (MYERS et alli, 1978, Apud ACRES, 1985). Similarmente, uma bacterina de célula intacta, preparada com uma cultura de ETEC autoclavada - que tinha destruídos seus antígenos capsulares e fimbrianos mas não os somáticos - também não forneceu proteção (MYERS et alli, 1978, Apud ACRES, 1985).

No caso dos antígenos capsulares "K", tampouco existem evidências conclusivas de que estes desempenhem algum papel protetor. Em um estudo, no qual vacas eram vacinadas com material capsular purificado, os resultados não demonstraram uma diferença significativa na proporção de vacas que eram protegidas contra o

desafio experimental e grupos controle não-vacinados, ou na proporção de bezerros protegidos aleitados por mães com alto título de anticorpos anticapsulares no colostro, quando comparados com mães com baixos títulos desses anticorpos no colostro (MYERS, 1978, Apud ACRES, 1985).

Outros dois estudos empregaram bacterinas de células intactas que conferiram proteção (MYERS, 1978, Apud ACRES, 1985). Contudo, mais uma vez os resultados não foram conclusivos uma vez que as bacterinas utilizadas estimulavam a formação tanto de anticorpos capsulares como somáticos, e, mais uma vez não se pode avaliar a capacidade protetora dos antígenos capsulares isoladamente.

2.9. VACINAS CONTRA ETEC

Uma forma de se controlar a patogênese da diarreia induzida por linhagens de ETEC é interferir na colonização do epitélio intestinal. O desenvolvimento de uma vacina oral eficaz contra ETEC depende da identificação do antígeno protetor apropriado a ser liberado na mucosa intestinal. Imunidade contra ETEC pode ser obtida imunizando-se animais ou com células intactas de *E. coli* portadoras de antígenos fimbrianos específicos ou com preparações purificadas destes (ISAACSON, 1977; ISAACSON et alli, 1980; MOON & McDONALD, 1983; MORGAN et alli, 1978; NAGY et alli, 1978; NAGY, 1980).

Anticorpos adesina-específicos neutralizam as

propriedades de adesão de fímbrias expressas por linhagens de ETEC, evitando sua anexação a receptores específicos e, conseqüentemente, a colonização e a manifestação do quadro clínico (ISAACSON, 1986). Há também evidências de que anticorpos anti-fímbrias possam reverter a adesão, no que seriam úteis tanto para prevenir como para tratar a diarreia (METT et alli, 1975).

Vários estudos foram realizados para verificar o potencial imunizante da enterotoxina STa. Essa enterotoxina, em sua forma nativa, devido ao baixo peso molecular, não é imunogênica, induzindo resposta imune somente quando conjugada a outras proteínas (ALDERETE & ROBERTSON, 1978; BURGUESS et alli, 1978; GYLES, 1971; SACK, 1975). Tentativas de se induzir a formação de anticorpos anti-STa falharam (SMITH & GYLES, 1970; MOON et alli, 1983). Contudo, é possível a obtenção de anticorpos anti-STa quando essa enterotoxina purificada ou sintetizada bioquimicamente é acoplada a carreadores protéicos (ALDERETE & ROBERTSON, 1978; GIANNELLA et alli, 1981; KLIPSTEIN et alli, 1981; KLIPSTEIN et alli, 1983). A capacidade protetora desses anticorpos foi demonstrada em condições experimentais em camundongos recém-nascidos (ALDERETE & ROBERTSON, 1978; FRANCIS et alli, 1982, Apud ACRES, 1985) e em alças intestinais ligadas de rato (KLIPSTEIN et alli, 1981; KLIPSTEIN et alli, 1983).

Várias vacinas comerciais já foram desenvolvidas e usadas no campo com sucesso (ACRES et alli, 1982; MYERS, 1980). Estas vacinas parecem ser seguras e eficazes e não causam reações endotóxicas ou anafiláticas que constituíram um problema com as

primeiras gerações de bacterinas que continham *E. coli* ou outras bactérias gram-negativas misturadas (ACRES, 1985).

Várias linhas de pesquisa para o desenvolvimento de vacinas contra linhagens de ETEC, como vacinas de fímbrias purificadas (ACRES et alli, 1979; ISAACSON, 1986), bacterinas de células intactas (ACRES, 1982; COLLINS et alli, 1988; MYERS, 1980), vacinas vivas com linhagens selvagens de ETEC atenuadas ou geneticamente manipuladas (DUCHET-SUCHAUX, 1988; ISAACSON, 1986; RUNNELS et alli, 1987; SACK, et alli, 1988).

Vários autores têm realizado estudos para a seleção de linhagens de *E. coli* altamente produtoras de fímbrias K99, bem como a otimização das condições de crescimento para a maximização de sua produção (deGRAAF et alli, 1980).

vanEMBDEN et alli (1980) propõem a utilização de linhagens de *E. coli* K12 portadoras de plasmídios recombinantes codificando a fímbria K99. A vacinação com tais linhagens não resultaria na geração de anticorpos contra antígenos não relacionados ao K99 ou contra antígenos codificados por outras regiões dos plasmídios K99 de ocorrência natural.

Uma outra abordagem para se maximizar a produção de um antígeno é a incorporação de um promotor "forte" na região de DNA imediatamente anterior à de sua sequência codificadora. BAECKER et alli (1988) utilizando técnicas de biologia molecular, introduziram o promotor "forte" e induzível do operon para a síntese do aminoácido triptofano na região de DNA imediatamente anterior à do gene estrutural para a síntese da subunidade da

fímbria K99. Esses autores obtiveram um aumento da expressão do antígeno K99 numa ordem 10 vezes maior quando comparada com a expressão do operon K99 controlado pelo promotor original.

Outros autores utilizaram técnicas de biologia molecular para fundir sequências de DNA codificando os determinantes antigênicos das enterotoxinas ST e LT, para a obtenção da expressão de um antígeno duplamente imunogênico (GUZMAN-VERDUZCO & KUPERSZTOCH, 1987).

Uma alternativa para o desenvolvimento de vacinas eficientes contra ETEC bovina é a obtenção dos antígenos K99 e F41 semi-purificados, o que representaria um meio-termo entre os processos sofisticados e dispendiosos para a produção de antígenos purificados e a utilização de bacterinas que, de obtenção simples e barata, podem provocar reações adversas no animal inoculado, como febre, hipotensão e choque endotóxico. Recentemente, foi desenvolvida uma vacina oleosa preparada com os antígenos K99 e F41 semi-purificados (GARCIA, 1992) que, em testes preliminares, apresentou grande eficiência em proteger bezerros recém-nascidos, aleitados em mães vacinadas, desafiados com uma linhagem de E. coli produtora das fímbrias K99 e F41 e de enterotoxina STa. Os resultados dos testes demonstraram que essa vacina não somente promove a produção de anticorpos anti-K99 e anti-F41 em mães vacinadas, como a transmissão passiva destes anticorpos aos bezerros, via colostro.

As consequências de imunizações em larga escala contra as características de virulência de populações naturais de ETEC são

desconhecidas. A vacinação contra antígenos como K99 e F41 ou outros, poderia selecionar novos mecanismos de colonização do intestino delgado. Mais provavelmente, populações de ETEC portadoras de mais de um antígeno de aderência tornar-se-iam mais comuns (ACRES, 1985). Num estudo de quatro anos, SODERLIND *et alli* (1982) verificaram que 50 % das linhagens de ETEC isoladas de leitões com diarreia em rebanhos vacinados contra a fímbria K88, eram produtoras desta fímbria, enquanto que, as outras 50 %, expressavam as fímbrias K99, 987P e outros fatores de aderência não identificados. Por outro lado, em leitões de rebanhos não vacinados, 90 % das linhagens de ETEC eram produtoras da fímbria K88 e 10 % expressavam fímbrias como K99 ou 987P. Estes fatos sugerem que a vacinação contra o antígeno K88 selecionou positivamente linhagens de ETEC produtoras de outros fatores de aderência que não o K88, ou seja, aparentemente a vacinação levou a um aumento da frequência de fatores de virulência anteriormente não tão importantes do ponto de vista epidemiológico. ACRES (1985) sugere que estudos a longo-prazo devam ser realizados para se verificar se a vacinação pode realmente causar alterações neste nível. Esse autor concorda que a imunização possa alterar a estrutura populacional de ETEC, faltando ainda, a determinação do grau em que tais alterações possam ocorrer e sugere que deva haver uma "vigilância" e caracterização contínuas das populações de ETEC e que novos antígenos possam ter que vir a ser incorporados em vacinas se alterações importantes na estrutura populacional de ETEC forem detectadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. LINHAGENS BACTERIANAS

As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho encontram-se na Tabela 1.

As linhagens de *E. coli* utilizadas na detecção e determinação de tipos de colicinas encontram-se na Tabela 2.

As linhagens de *E. coli* portadoras de plasmídios pertencentes a Grupos de Incompatibilidade conhecidos, encontram-se na Tabela 3.

3.2. MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura foram autoclavados a 121 C^o por 20 minutos. Sempre que necessário, o pH dos meios de cultura foi ajustado com uma solução de hidróxido de sódio 10 N ou com uma solução de ácido clorídrico 1 N.

Os meios de cultura desidratados e ágar utilizados foram das seguintes marcas: Peptona, triptona e casaminoácidos (DIFCO), Extrato de carne (BIOBRÁS), Extrato de levedura (BIOBRÁS ou DIFCO), Ágar (POLYSCIENCES ou DIFCO).

3.2.1. AGAR MacCONKEY

O meio Ágar MacConkey utilizado foi da marca DIFCO e preparado de acordo com as especificações do fabricante.

3.2.2. BHI (INFUSÃO DE CÉREBRO E CORAÇÃO)

O meio BHI utilizado foi da marca DIFCO e preparado de acordo com as especificações do fabricante. Após o preparo, o meio foi distribuído em volumes de 5 ml, em tubos de ensaio, autoclavado e armazenado à temperatura ambiente.

Para o preparo de meio BHI sólido, foram adicionados ao meio BHI, 15 g/l de ágar.

3.2.3. TSB (CALDO TRÍPTICO DE SOJA)

O meio TSB utilizado foi da marca DIFCO e preparado de acordo com as especificações do fabricante. Após o preparo, o meio foi distribuído em volumes de 5 ml em tubos de ensaio, autoclavado e armazenado à temperatura ambiente.

Para o preparo de meio TSB sólido (TSA), foram adicionados ao meio TSB, 15 g/l de ágar.

3.2.4. LB (LURIA-BERTANI)

Triptona	10,0	g
Extrato de levedura	5,0	g
Cloreto de sódio	10,0	g
Água destilada	1000,0	ml
pH 7,2		

O meio foi distribuído, em volumes de 5 ml, em tubos de ensaio, autoclavado e armazenado à temperatura ambiente.

3.2.5. LA

Para o preparo deste foram adicionados ao meio LB, 15 g/l de ágar. Quando foi necessária a adição de drogas antimicrobianas ao meio, foi utilizado o ágar DIFCO.

Para o preparo de meio LA semi-sólido foram adicionados ao meio LB, 7 g/l de ágar.

3.2.6. SOC

Triptona	20,0	g
Extrato de levedura	5,0	g
Cloreto de sódio	0,5	g
Água destilada	1000,0	ml
pH 7,1		

Após o preparo e esterilização, foi adicionada ao meio solução de glicose a 20 % para uma concentração final de 20 mM.

3.2.7. AN (AGAR NUTRIENTE)

Peptona	8,0 g
Extrato de carne	5,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000,0 ml

pH 7,2

3.2.8. PENASSAY

Peptona	5,00 g
Extrato de levedura	1,50 g
Extrato de carne	1,50 g
Glicose	1,00 g
Cloreto de sódio	3,50 g
Fosfato de potássio dibásico	3,68 g
Fosfato de potássio monobásico	1,32 g
Água destilada	1000,00 ml

pH 7,4

3.2.9. MEIO MÍNIMO

Solução de sais (2 vezes concentrada):

Fosfato de sódio dibásico	8,24 g
Fosfato de potássio monobásico	1,36 g
Cloreto de amônia	2,00 g
Água destilada	500,00 ml

pH 7,4

Base (2 vezes concentrada):

Agar DIFCO	15,0 g
Água destilada	500,0 ml

A solução de sais e a base foram autoclavadas separadamente. Após a esterilização, à solução de sais do Meio Mínimo, foram adicionadas as soluções de sais de meio Minca (vide item 3.2.12.) e de glicose a 20 % (vide item 3.3.6.), para concentrações finais de 0,1 % e 0,5 %, respectivamente. Esta solução final foi agitada e adicionada à base.

3.2.10. CAYE (EVANS et alli, 1973)

Composição do meio:

Casaminoácidos	20,00 g
Extrato de levedura	5,00 g
Fosfato de potássio dibásico	8,75 g
Cloreto de sódio	2,50 g
Água destilada	1000,00 ml

Solução de sais:

Sulfato de magnésio heptahidratado	5,0 g
Sulfato de ferro	0,5 g
Água destilada q.s.p.	100,0 ml

A solução de sais foi armazenada a 4 °C até o momento do uso.

Após o preparo do meio, foi adicionada a solução de sais para uma concentração final de 1 % e o pH ajustado para 8,5.

3.2.11. CFA (EVANS et alli, 1975)

Composição do meio:

Casaminiácidos	10,0 g
Extrato de levedura	1,5 g
Água destilada	1000,0 ml

Soluções de sais:

Sulfato de magnésio heptahidratado	0,05 g
Água destilada q.s.p.	100,00 ml
Cloreto de manganês	0,39 g
Água destilada q.s.p.	100,00 ml

As soluções de sais foram autoclavadas e armazenadas a 4 C. Estas foram adicionadas ao meio para concentrações finais de 1 % e o pH ajustado para 7,4.

3.2.12. MINCA (GUINÉE et alli, 1977)

Composição do meio:

Casaminoácidos	1,00 g
Fosfato de sódio dibásico	8,24 g
Fosfato de potássio monobásico	1,36 g
Água destilada	1000,00 ml
pH 7,4	

Solução de sais:

Sulfato de magnésio heptahidratado	1,000 g
Cloreto de manganês	0,100 g
Cloreto ferríco hexahidratado	0,013 g
Cloreto de cálcio dihidratado	0,040 g
Água destilada q.s.p.	100,000 ml

A solução de sais foi filtrada em membrana Millipore 0,22⁰ nm e armazenada a 4 C.

Após o preparo e esterilização do meio, foram adicionadas as soluções de sais e de glicose a 20 % (vide item 3.3.6.) para concentrações finais de 0,1 % e 0,15 %, respectivamente.

3.2.13. AGAR SANGUE

Base:

Peptona	10,0	g
Extrato de carne	5,0	g
Cloreto de sódio	5,0	g
Ágar	15,0	g
Água destilada	1000,0	ml

Preparo de placas:

O meio base foi autoclavado e resfriado a aproximadamente 45⁰ C. A seguir, foram adicionados ao meio, sob condições assépticas, sangue desfibrinado de carneiro para uma concentração final de 5 %. O meio foi distribuído em placas de Petri, em volumes de aproximadamente 15 ml.

Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas a 37⁰ C por cerca de 24 horas para teste de esterilidade.

3.2.14. EAGLE

3.2.14.1. Solução de sais I (10 vezes concentrada):

Cloreto de sódio	61,20	g
Cloreto de potássio	3,60	g
Cloreto de magnésio hexahidratado	1,80	g
Vermelho de fenol	0,18	g
Água bidestilada	900,00	ml

A solução foi filtrada em membrana Millipore 0,22 ⁰ nm e armazenada a 4 C.

3.2.14.2. Solução de sais II (10 vezes concentrada):

Fosfato de sódio monobásico	1,99	g
Cloreto de cálcio	2,00	g
Água bidestilada q.s.p.	1000,00	ml

A solução de sais foi filtrada em membrana Millipore 0,22 ⁰ nm e armazenada a 4 C.

3.2.14.3. Solução de aminoácidos I (10 vezes concentrada):

l-arginina monoclóridrato	1,05	g
l-histidina monoclóridrato	0,31	g
l-isoleucina	0,52	g
l-leucina	0,52	g
l-lisina monoclóridrato	0,58	g
l-metionina	0,15	g
l-fenilalanina	0,32	g
l-treonina	0,48	g
l-triptofano	0,10	g
l-valina	0,46	g
Água bidestilada q.s.p.	1000,00	ml

A solução foi armazenada sem esterilização a -20 °C.

3.2.14.4. Solução de aminoácidos II (10 vezes concentrada):

l-cisteína	0,24	g
l-tirosina	0,36	g

Os componentes foram dissolvidos em 200 ml de uma solução de ácido clorídrico 1 N o volume completado para 1000 ml com água bidestilada, e a solução armazenada a -20 °C, sem esterilização.

3.2.14.5. Solução de vitaminas I (10 vezes concentrada):

Colina monoclorohidrato	0,11	g
Inositol	0,02	g
Nicotinamida	0,01	g
Pantotenato de cálcio	0,01	g
Piridoxal monocloridrato	0,01	g
Tiamina monocloridrato	0,01	g
Riboflavina	0,01	g
Água bidestilada q.s.p.	1000,00	ml

A solução foi armazenada a ^o-20 C, sem esterilização.

3.2.14.6. Solução de vitaminas II (10 vezes concentrada):

Biotina	0,01	g
Ácido fólico	0,01	g
Água bidestilada q.s.p.	1000,00	ml

O pH da solução foi ajustado para 7,0 com hidróxido de ^osódio 1 N e a solução armazenada a -20 C, sem esterilização.

3.2.14.7. Preparo final do meio:

Solução de sais I	100,00 ml
Solução de sais II	100,00 ml
Solução de aminoácidos I	100,00 ml
Solução de aminoácidos II	100,00 ml
Solução de vitaminas I	100,00 ml
Solução de vitaminas II	100,00 ml
Glicose	2,77 g
l-glutamina	0,33 g
Bicarbonato de sódio	1,70 g
Caldo fosfato de triptose	2,97 g
Água bidestilada q.s.p.	1000,00 ml

O pH foi ajustado para 7,4 com hidróxido de sódio 1 N e o meio filtrado em membrana Millipore 0,22 µm.

O meio Eagle, preparado segundo RIZZO et alii (1983), foi utilizado para culturas de células Vero nos ensaios de detecção de produção verocitotoxina.

3.3. SOLUÇÕES E TAMPÕES

3.3.1. SOLUÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO 3 M

Cloreto de sódio	170,0 g
Água destilada q.s.p.	1000,0 ml

Após o preparo, a solução foi mantida à temperatura ambiente.

3.3.2. SOLUÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO 0,15 M

A solução de cloreto de sódio 0,15 M foi preparada diluindo-se 20 vezes, em água destilada, a solução de cloreto de sódio 3 M. A solução foi armazenada a 4 C.

3.3.3. SOLUÇÃO DE CLORETO DE CÁLCIO 0,1 M

Cloreto de cálcio	1,1099 g
Água bidestilada q.s.p	100,0000 ml

A solução foi distribuída em volumes de 10 ml em frascos de Erlenmeyer, autoclavada e armazenada a 4 C.

3.3.4. SOLUÇÃO DE FOSFATO DE POTÁSSIO DIBÁSICO 1 M

Fosfato de potássio dibásico	17,418 g
Água destilada q.s.p.	100,000 ml

Após o preparo, a solução foi armazenada a -20 C.

3.3.5. SOLUÇÃO DE FOSFATO DE POTÁSSIO MONOBÁSICO 1 M

Fosfato de potássio monobásico 13,609 g

Água destilada q.s.p. 100,000 ml

Após o preparo, a solução foi armazenada a ^o-20 C.

3.3.6. SOLUÇÃO DE GLICOSE A 20 %

Glicose 20,0 g

Água destilada q.s.p. 100,0 ml

Após o preparo, solução foi filtrada em membrana Millipore 0,22 µm, distribuída em tubos de vidro esterilizados, armazenados a ^o4 C.

3.3.7. SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO 10 N

Hidróxido de sódio 4,0 g

Água bidestilada q.s.p. 100,0 ml

Após o preparo, a solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.3.8. SOLUÇÃO DE ÁCIDO CLORÍDRICO 1 N

Ácido clorídrico 37 %

Água destilada q.s.p. 100 ml

Após o preparo, a solução foi mantida à temperatura ambiente.

3.3.9. SOLUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO A 5%

Ácido cítrico	5,0 g
Água destilada q.s.p.	100,0 ml

Após o preparo, a solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.3.10. SOLUÇÃO SALINA FORMOLADA A 0,5 %

Cloreto de sódio	0,85 %
Formol a 37 %	0,50 %

Um volume de 1,4 ml de formol a 37 % foi adicionado a 5 ml de solução salina 3 M. A solução foi mantida a 4 C.

3.3.11. SOLUÇÃO AZUL DE EVANS A 2 %

Azul de Evans	2,0 g
Cloreto de sódio 0,15 M q.s.p.	100,0 ml

O corante foi dissolvido em solução esterilizada de cloreto de sódio 0,15 M, filtrado em membrana Whatman no. 3 e mantido em frasco escuro, à temperatura ambiente.

3.3.12. SOLUÇÃO ALCOOLICA DE AZUL DE BROMOTIMOL A 1,5 %

Azul de bromotimol 1,5 g
Etanol q.s.p. 100,0 ml

Após o preparo, a solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.3.13. REAGENTE DE KOVACS

Alcool isoamílico 75 ml
Paradimetilaminobenzaldeído 5 g
Ácido clorídrico 25 ml

O paradimetilaminobenzaldeído foi dissolvido no álcool isoamílico, adicionando-se, a seguir, o ácido clorídrico.

3.3.14. TAMPÃO PBS 0,05 M pH 7,4 (Tampão de salina fosfatada)

Solução A: Fosfato de potássio dibásico 1 M

Solução B: Fosfato de potássio monobásico 1 M

O pH da solução B foi ajustado para 7,4 com a solução A. Um volume de 50 ml da solução resultante foi adicionado a 50 ml de solução de cloreto de sódio 3 M. O volume foi completado para 1000 ml, em balão volumétrico, com água destilada e a solução armazenada a 4 °C

3.3.15. TAMPÃO TRIETANOLAMINA

Composição 10 vezes concentrada:

Sulfato de magnésio heptahidratado	1,232	g
Cloreto de cálcio dihidratado	0,200	g
Cloreto de sódio	75,000	g
Trietanolamina	34,700	g
Água destilada q.s.p.	1000,000	ml
pH 7,4		

Todos os componentes foram dissolvidos em 200 ml de água destilada e após sua completa dissolução o pH foi ajustado com uma solução de ácido clorídrico 1 N. O volume foi completado para 1000 ml em balão volumétrico e a solução armazenada a 4 C. No momento do uso a solução foi diluída 10 vezes com água destilada.

3.3.16. SOLUÇÃO ALSEVER

Glicose	2,85	g
Citrato de sódio	0,80	g
Cloreto de sódio	0,42	g
Água destilada q.s.p.	100,00	ml

Após o preparo, o pH foi ajustado com uma solução de ácido cítrico a 5 %. A solução foi filtrada em membrana Millipore 0,22 µm e armazenada a 4 C.

3.3.17. SOLUÇÕES DE DROGAS ANTIMICROBIANAS

Todos as drogas antimicrobianas utilizadas, com exceção do ácido nalidíxico (INLAB) e da Gentamicina (Garamicina, SHERING) foram da marca SIGMA.

Após o preparo, as soluções de antimicrobianos foram distribuídas em tubos de microcentrífuga autoclavados, em volumes de 500 ⁰ul e conservadas a -20 C.

3.3.17.1. ACIDO NALIDÍXICO

Ácido Nalidíxico	250,0	mg
Solução de NaOH 0,2 N q.s.p	10,0	ml

3.3.17.2. AMPICILINA

Ampicilina	250,0	mg
Água bidestilada esterilizada q.s.p.	10,0	ml

3.3.17.3. CANAMICINA

Canamicina	250,0	mg
Água bidestilada esterilizada q.s.p.	10,0	ml

3.3.17.4. CLORANFENICOL

Cloranfenicol	250,0	mg
Metanol	5,0	ml
Água bidestilada esterilizada q.s.p.	5,0	ml

3.3.17.5. ESTREPTOMICINA

Estreptomicina	200,0	mg
Água bidestilada esterilizada q.s.p.	10,0	ml

3.3.17.6. GENTAMICINA

Gentamicina	80,0	mg
Água bidestilada esterilizada q.s.p.	10,0	ml

3.3.17.7. TETRACICLINA

Tetraciclina	125,0	mg
Metanol	5,0	ml
Água bidestilada esterilizada q.s.p.	5,0	ml

3.3.18. SOLUÇÕES PARA EXTRAÇÃO DE PLASMÍDIOS

3.3.18.1. SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO 3 M

Acetato de sódio trihidratado (REAGEN) ... 27,21 g

Água bidestilada q.s.p. 200,00 ml

Após o preparo, a solução foi armazenada a -20°C .

3.3.18.2. SOLUÇÃO DE SDS A 10 %

Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 1,0 g

Água bidestilada q.s.p. 10,0 ml

Após o preparo, solução foi mantida à temperatura ambiente.

3.3.18.3. SOLUÇÃO I (TAMPÃO TRIS-EDTA pH 8,0)

Tris-cloridrato 0,30 g

EDTA 0,37 g

Água bidestilada q.s.p. 100,00 ml

Após o preparo, solução foi autoclavada e mantida a 4°C .

3.3.18.4 SOLUÇÃO II

Hidróxido de sódio 0,2 N

SDS 1,0 %

A solução II foi preparada misturando-se 200 μ l de uma solução de hidróxido de sódio 10 N e 100 μ l de uma solução de SDS a 10 %, completando-se o volume para 1,0 ml com água bidestilada esterilizada. A solução foi mantida à temperatura ambiente.

3.3.18.5. SOLUÇÃO III

Acetato de sódio 3 M	60,5	ml
ácido acético glacial	11,5	ml
Água bidestilada	28,5	ml
pH 4,8		

Após o preparo, a solução foi mantida a 4 C.

3.3.19. SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

3.3.19.1. TAMPÃO TEB (tampão triz-EDTA-borato pH 8,2)

O tampão foi preparado 5 vezes concentrado:

Trizma-base	54,00	g
Acido bórico	27,50	g
EDTA	4,65	g
Água bidestilada q.s.p.	1000,00	ml

Após o preparo, o tampão foi mantido a 4 C. Para o uso, o tampão foi diluído 5 vezes com água bidestilada e mantido a 4 C.

3.3.19.2. SOLUÇÃO DE RNase

RNase A (SIGMA)	100,0	mg
Tris-cloridrato (SIGMA)	18,20	mg
Cloreto de sódio (MERK)	8,50	mg
Água bidestilada q.s.p.	10,00	ml
pH 7,5		

Após o preparo, a solução foi aquecida a 100 °C por 15 minutos, em banho-maria, para a inativação de traços de DNases, distribuída em volumes de 500 ul em tubos de microcentrífuga e armazenada a -20 °C.

3.3.19.3. SOLUÇÃO DE RESSUSPENSÃO

A solução foi preparada 6 vezes concentrada:

Ficoll 400 (PHARMACIA)	7,500	g
Azul de bromofenol (SIGMA)	0,125	g
Xileno cianol FF (SIGMA)	0,125	g
Solução de RNase	0,500	ml
Água bidestilada q.s.p.	50,000	ml

A solução foi distribuída em volumes de 5 ml em frascos escuros e armazenada a -20 °C. A solução de trabalho foi mantida à temperatura ambiente.

3.3.20. SOLUÇÃO ESTOQUE DE BROMETO DE ETÍDIO A 1 %

Brometo de etídio 1,0 g
Água bidestilada q.s.p. 100,0 ml

O brometo de etídio foi dissolvido sob agitação suave e armazenado, em frascos escuros, a 4 C.

3.3.21. SOLUÇÃO CORANTE DE BROMETO DE ETÍDIO

Solução de brometo de etídio 1 % 50,0 ul
Água bidestilada q.s.p. 100,0 ml

Após o preparo, a solução foi armazenada, em frasco escuro, a 4 C.

3.3.22. SOLUÇÕES PARA ENSAIOS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA

3.3.22.1. SOLUÇÃO DE PARLÓDIO A 0,5 %

Parlódio (SIGMA) 0,25 g
Acetato de amila q.s.p. 50,00 ml

O parlódio, foi dissolvido em acetato de amila, em frasco escuro e armazenado a 4 C.

3.3.22.2. SOLUÇÃO DE URANILA A 2 %

Acetato de uranila (J.T BAKER) 2,0 g

Água bidestilada q.s.p. 100,0 ml

Após o preparo, a solução foi filtrada em membrana Millipore ultra GSWPO 1300 e mantida em repouso a 4 C, por 4 dias, antes do uso. A solução foi armazenada a 4 C.

3.4. ANTISSORO ANTI-K99

O antissoro anti-K99, obtido pela imunização de coelhos adultos, foi produzido segundo a metodologia de EDWARDS & EWING (1966). Assim, a linhagem de E. coli B41 foi cultivada em meio TSB, a 37 C, por 16-18 horas. Após esse período, alíquotas de 500 ul da cultura foram semeadas em placas contendo meio Minca. As placas foram incubadas a 37 C, por 16-18 horas. A seguir, foi feita uma suspensão bacteriana, em solução de salina formolada a 0,5 %, contendo 10⁸ unidades formadoras de colônias (UFC)/ml da linhagem de E. coli B41. Os animais foram inoculados por via intravenosa com 500 ul dessa suspensão em intervalos de 4 a 5 dias. A sangria total dos animais foi feita quando o título do soro (obtido por aglutinação em lâmina) foi igual ou maior que 1:20.

O soro foi distribuído em volumes de 500 ul em tubos de microcentrífuga e centrifugado a 12.000 g por 10 minutos. Uma parte do antissoro foi transferido para novos tubos de

microcentrífuga e armazenado a ^o-20 C. A outra parte foi diluída 5 vezes em solução salina 0,15 M esterilizada, distribuído em volumes de 500 ul em tubos de microcentrífuga e conservado a ^o-20 C até o momento do uso. O soro foi absorvido como descrito a seguir.

Um pré-inóculo da linhagem de E. coli J111 foi cultivado em 5 ml de meio BHI, a ^o37 C, por cerca de 5 horas. Após esse período, 50 ul dessa cultura foram transferidos para um tubo contendo 5 ml de meio BHI e o tubo foi incubado a ^o16 C por 48 horas. Em seguida, alíquotas de 100 ul da cultura crescida nessas condições foram semeadas em placas de Petri contendo meio CFA, sendo as placas incubadas a ^o16 C por 48 horas.

Com o auxílio de palitos de madeira esterilizados, raspados da cultura crescida em meio CFA foram transferidos para tubos de microcentrífuga contendo 300 ul de solução salina formolada a 0,5 %. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado e estes foram mantidos a ^o4 C por 48 horas. Após esse período, foi feito um teste de esterilidade dessas suspensões bacterianas transferindo-se uma alíquota de 50 ul de cada suspensão para tubos contendo 5 ml de meio TSB. Os tubos foram incubados a ^o37 C por 16-18 horas. As suspensões foram consideradas isentas de bactérias viáveis quando não se observou crescimento nos tubos.

Após a verificação das condições de esterilidade das suspensões bacterianas em solução salina formolada a 0,5 %, estas foram centrifugadas a 12.000 g por 5 minutos. Após a centrifugação, os sedimentos foram lavados uma vez em solução

salina 0,15 M esterilizada, nas mesmas condições de centrifugação. Os sedimentos foram, então, ressuspensos em 250 ml de solução salina 0,15 M, esterilizada. Essas suspensões de bactérias mortas foram misturadas, em tubos de microcentrífuga, volume a volume ou com o antissoro anti-K99 diluído 1/5 ou sem diluição para sua absorção. A mistura foi mantida a 4 C por 30 minutos, agitando-se os tubos a cada 5 minutos. Em seguida, os tubos foram transferidos para uma estufa 37 C, pelo mesmo período e nas mesmas condições. Esse procedimento foi repetido diversas vezes até que o antissoro não reagisse mais com uma cultura de E. coli J111 cultivada em meio CFA a 16 C, como descrito acima. Os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 5 minutos e os sobrenadantes (antissoro absorvido) transferidos para novos tubos de microcentrífuga e mantidos a -20 C até o momento do uso.

3.5. COLETA E MANUTENÇÃO DE SANGUE HUMANO E ANIMAL

Sangue humano e de diferentes animais foi utilizado como fonte de hemácias utilizadas em experimentos de hemaglutinação.

3.5.1. SANGUE HUMANO, DE COBAIO E GALINHA

Sangue humano, de cobaio e galinha, foram coletados, assepticamente, em volumes de 5 ml, com agulha e seriga descartáveis e imediatamente homogeneizado na mesma quantidade de solução Alsever.

3.5.2. SANGUE DE CARNEIRO, BOI E CAVALO

Sangue de carneiro, de boi e de cavalo foi coletado, em 200 ml de solução Alsever esterilizada, mediante punção da veia jugular. Após a coleta, o sangue foi distribuído, assepticamente, em volumes de 5 ml, em tubos de ensaio. Os tubos foram mantidos a 4 C até o momento do uso, por um período de até 30 dias.

3.5.3. SANGUE DE CARNEIRO DESFIBRINADO

O sangue de carneiro foi coletado conforme descrito no item 3.5.2. sendo vertido em um frasco contendo pérolas-de-vidro, previamente esterilizado. O frasco foi agitado vigorosamente para a desfibrinização do sangue. O sangue desfibrinado foi distribuído em volumes de 5 ml em tubos de ensaio e os tubos armazenados a 4 C por até 30 dias.

3.6. PESQUISA DA EXISTÊNCIA DE VARIABILIDADE GENÉTICA NAS CULTURAS ORIGINAIS DAS LINHAGENS DE E. coli ESTUDADAS

Com a finalidade de se tentar isolar linhagens de E. coli com diferentes padrões de plasmídios a partir de seus estoques originais, as linhagens de E. coli J111 e E. coli 55 foram semeadas, separadamente, em Ágar MacConkey, por esgotamento.

As placas foram incubadas a 37 C por 16-18 horas e a seguir, foram coletadas 10 colônias isoladas, de cada linhagem,

as quais foram inoculadas em tubos contendo meio TSB e incubadas a 37 °C por 16-18 horas. Em seguida, essas culturas foram estocadas (como descrito no item 3.7.) e utilizadas em diversos ensaios no estudo de suas características.

3.7. MANUTENÇÃO DE CULTURAS BACTERIANAS

3.7.1. PREPARO DE TUBOS DE ESTOQUE

No preparo de tubos para estoques de culturas bacterianas, foi utilizado o meio LA semi-sólido. O meio, após o preparo, foi fundido e distribuído em volumes de 5 ml, em tubos de vidro (13 X 100 mm) com tampas rosqueadas guarnecidas com batoques de borracha. Os tubos foram autoclavados e, em seguida, mantidos em posição vertical até a solidificação do meio, após o que foram mantidos em temperatura ambiente até o momento do uso.

3.7.2. ESTOCAGEM DE CULTURAS BACTERIANAS

As culturas bacterianas foram mantidas em estoques feitos de acordo com Sambrook et alii (1989). Em tubos contendo 5 ml meio LA semi-sólido, previamente preparados como descrito no item anterior, foram inoculados 100 µl de uma cultura bacteriana crescida em meio BHI ou TSB. Os tubos foram fechados deixando-se as tampas levemente afrouxadas para permitir a aeração da cultura e incubados a 37 °C por 16-18 horas. Após o crescimento, foram

adicionados aos tubos, cerca de 1 ml de óleo mineral (NUJOL) esterilizado. Os tubos foram firmemente fechados e mantidos à temperatura ambiente.

3.8. DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DO ANTÍGENO "K99"

A expressão do antígeno "K99" foi detectada através de reações de soroaglutinação, em lâmina de vidro, com antissoro anti-K99 absorvido (vide item 3.4.), conforme metodologia descrita a seguir.

3.8.1. DETERMINAÇÃO DO MEIO DE EXPRESSÃO DO ANTÍGENO "K99"

Com a finalidade de se determinar qual o meio de cultura mais adequado para a expressão do antígeno "K99", a linhagem de *E. coli* J111 e as linhagens tranconjugantes foram cultivadas em diferentes meios: Minca, CFA, LA, LG (meio LA suplementado com 2 % de glicose), TSB e BHI.

Como controles, foram utilizadas as linhagens de *E. coli* B41, *E. coli* C600 (B41) e *E. coli* DH5a (B41); as duas últimas transportando o plasmídio que media a síntese do antígeno K99 na primeira.

As linhagens ensaiadas foram cultivadas em meio TSB, a 37 °C, por 16-18 horas. Após esse período, alíquotas de 100 µl das culturas foram semeadas, separadamente, em placas contendo os diferentes meios. As placas foram incubadas a 37 °C, por 16-18

horas. A seguir, a expressão do antígeno "K99" foi ensaiada em reações de soroaglutinação em lâmina, contra o antissoro anti-K99.

3.8.2. REAÇÕES DE SOROAGLUTINAÇÃO

As linhagens bacterianas ensaiadas quanto a capacidade de reagir especificamente com o antissoro anti-K99, foram cultivadas em tubos contendo 2 ml de meio TSB, a 37 C por cerca de 8 horas. A seguir, com o auxílio de uma alça bacteriológica, cada linhagem foi semeada em placas de Petri contendo meio Minca ou CFA. As placas foram incubadas a 37 C por 16-18 horas. Após esse período, com auxílio de palitos de madeira, um raspado de cada cultura foi transferido, isoladamente, para a superfície de uma lâmina de vidro e homogeneizado com 50 ul de solução salina 0,15 M e observou-se a ocorrência, ou não, de uma reação de autoaglutinação, com a lâmina sendo mantida à temperatura ambiente. A seguir, repetiu-se o procedimento, homogeneizando-se um raspado de cada cultura, isoladamente, com 50 ul do antissoro anti-K99 absorvido, sendo a lâmina de vidro mantida à temperatura ambiente por 1 a 2 minutos. A seguir a lâmina foi mantida sobre uma bolsa de gelo por até 4 minutos. Os resultados foram observados nos dois casos.

Em seguida à escolha do meio considerado mais adequado, o crescimento de qualquer linhagem bacteriana com a finalidade de se detectar a expressão do antígeno "K99" através de reações de soroaglutinação foi feito nesse meio.

3.9. DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DO ANTÍGENO EAF44

A expressão do antígeno EAF44 foi detectada através de reações de hemaglutinação-manose resistente com hemácias humanas, conforme metodologia descrita no item 3.17.

3.10. DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE HEMOLISINA

As linhagens de *E. coli* ensaiadas quanto à produção de hemolisina foram cultivadas em tubos contendo 2 ml de meio TSB, a 37 °C por 16-18 horas. Após esse período, essas linhagens foram semeadas, com o auxílio de uma multi-alça, em meio ágar sangue. Como controles positivo e negativo foram utilizadas as linhagens de *Aeromonas* sp. e *E. coli* C600, respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C por 16-18 horas. Após o crescimento, procedeu-se à leitura dos resultados. A formação de regiões de hemólise (halos claros) no local de crescimento de uma determinada colônia indicava a produção de hemolisina.

3.11. DETECÇÃO DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COLICINAS

Para a detecção da produção e caracterização de colicinas, foi utilizado um método baseado no de AZEVEDO & COSTA (1973). As linhagens bacterianas a serem ensaiadas quanto a produção de colicinas foram cultivadas em tubos (13 X 50 mm) contendo 2 ml de meio TSB, a 37 °C por 16-18 horas. Em seguida,

estas foram semeadas com multi-alça em placas de Petri contendo meio LA. Como controles positivo e negativo foram utilizadas as linhagens de E. coli F3 e E. coli C600, respectivamente. As placas foram incubadas nas condições supra citadas. Ao mesmo tempo e nas mesmas condições, foi cultivada em meio TSB, a linhagem de E. coli ROW (22R80), utilizada como padrão de sensibilidade à colicinas. Após o crescimento, as placas foram colocadas invertidas sobre uma bancada e, no interior de suas tampas, foram vertidos cerca de 2 ml de clorofórmio para causar a morte das culturas. Após um período de 30-40 minutos, as placas foram mantidas invertidas e entreabertas em estufa a 37 °C até a completa evaporação do clorofórmio. As colônias crescidas nas placas eram, então, removidas com auxílio de zaragatoas esterilizadas.

A seguir, em tubos contendo 4 ml de meio LA semi-sólido previamente fundido e mantido a cerca de 45 °C, foram adicionados 100 µl da cultura da linhagem de E. coli ROW (22R80). Os tubos foram agitados em vórtex e o meio imediatamente vertido sobre a superfície das placas. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas a 37 °C por 16-18 horas. Após esse período, os resultados foram observados.

A produção de colicina por uma determinada linhagem foi observada como regiões de ausência de crescimento (halos claros) da linhagem indicadora sobre o local anteriormente ocupado pela linhagem ensaída.

A caracterização do tipo de colicina produzido foi feito

utilizando-se como padrões de sensibilidade e resistência a diferentes tipos de colicinas, as linhagens de *E. coli* constantes na Tabela 2. Foram preparadas oito placas de Petri, uma para cada linhagem indicadora, onde foram semeadas as dez culturas provenientes da linhagem de *E. coli* 55 e as linhagens de *E. coli* F3 e *E. coli* C600, como controles positivo e negativo, respectivamente. O procedimento foi o mesmo relatado acima.

3.12. DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE RESISTÊNCIA A DROGAS ANTIMICROBIANAS

Os níveis de resistência a drogas antimicrobianas foram obtidos semeando-se as linhagens bacterianas ensaiadas em placas de Petri contendo meio LA suplementado com diferentes concentrações de um determinado antimicrobiano.

Foram utilizados os antimicrobianos constantes do item 3.3.17., nas seguintes concentrações, em ug/ml: 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 300, 350, 500, 1000 e 2000.

Um experimento inicial foi feito utilizando-se unicamente as concentrações 10, 20 e 50 ug/ml de cada antimicrobiano, e, se necessário, um segundo experimento foi feito utilizando-se concentrações menores e/ou maiores.

Para cada concentração dos diferentes antimicrobianos, foi preparado um tubo de vidro contendo 20 ml de meio LA, autoclavado e resfriado a 45-50 °C em banho-maria, suplementado com uma quantidade da solução do antimicrobiano para se obter a

concentração desejada. O tubo foi agitado e o meio vertido em uma placa de Petri. Após a solidificação dos meios, as placas foram colocadas invertidas e entreabertas em estufa a 37 °C por cerca de 30 minutos para a evaporação do excesso de umidade, sendo em seguida utilizadas.

As linhagens bacterianas ensaiadas foram cultivadas em tubos (13 X 50 mm) contendo 2 ml de meio LB, a 37 °C, por 16-18 horas. As culturas foram semeadas com multi-alça, nas placas previamente preparadas. As placas foram incubadas a 37 °C, por 16-18 horas. Após esse período, procedeu-se à leitura dos resultados.

3.13. OBTENÇÃO DE MUTANTES RESISTENTES A DROGAS ANTIMICROBIANAS

Para a obtenção de mutantes resistentes a antimicrobianos, foram utilizados métodos que selecionaram mutantes espontâneos pré-existent na população.

3.13.1. MUTANTES RESISTENTES AO ÁCIDO NALIDÍXICO

Para a obtenção de mutantes resistentes ao ácido nalidíxico, a linhagem bacteriana ensaiada foi crescida inicialmente em 5 ml de meio LB a 37 °C por 16-18 horas. A seguir, 100 µl dessa cultura foram inoculados, separadamente, em três tubos contendo meio LB suplementados, com 1, 2 ou 5 µg/ml de ácido nalidíxico. Os tubos foram incubados a 37 °C por 16-18

horas. Após esse período, verificava-se em qual dos tubos havia ocorrido crescimento. Um volume de 100 µl da cultura crescida na maior concentração de ácido nalidíxico, foram inoculados, separadamente, em três tubos contendo meio LB suplementado com três outras diferentes e subsequentemente maiores concentrações do antimicrobiano. Os tubos foram incubados a 37 °C por 16-18 horas, após o que, verificava-se a ocorrência de crescimento. Esse procedimento foi repetido até a obtenção de culturas resistentes a 100 µg/ml de ácido nalidíxico. Os níveis de resistência dos mutantes selecionados, foi obtido inoculando-se alíquotas de 50 µl de uma cultura crescida sob pressão seletiva de 100 µg/ml de ácido nalidíxico em tubos contendo meio LB suplementados, separadamente, com o antimicrobiano nas concentrações de 500, 1000 e 2000 µg/ml. O mutante resistente ao ácido nalidíxico foi estocado como descrito no item 3.7.2. e utilizado em ensaios de caracterização biológica e genética.

3.13.2. MUTANTES RESISTENTES À ESTREPTOMICINA

Para a obtenção de mutantes resistentes à estreptomicina foi utilizado um método baseado no de AZEVEDO & COSTA (1973), modificado. A linhagem bacteriana ensaiada foi crescida em 5 ml de meio LB a 37 °C, por 16-18 horas. Após o crescimento, os 5 ml da cultura foram distribuídos assepticamente em tubos de microcentrífuga autoclavados, em volumes de 1 ml cada. A seguir, os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 30 segundos, em

microcentrífuga. Os sobrenadantes foram descartados e as culturas ressuspensas em 100 µl de meio LB. O material de cada tubo foi, a seguir, semeado, separadamente, em placas de Petri contendo meio LA suplementado com 50 µg/ml de estreptomicina.

As placas foram incubadas a 37 °C por 16-18 horas. Após esse período, verificava-se o crescimento de clones resistentes à estreptomicina. Destes, pelo menos cinco foram coletados para se determinar o seu nível de resistência à estreptomicina, como descrito no item anterior e estocados como descrito no item 3.7.2. para ensaios de caracterização biológica e genética.

3.14. REAÇÕES DE HEMAGLUTINAÇÃO

3.14.1. CULTIVO DAS LINHAGENS BACTERIANAS

As linhagens bacterianas ensaiadas quanto às suas propriedades de hemaglutinação, foram cultivadas em meio TSB, a 37 °C por cerca de 8 horas. A seguir, estas foram semeadas em placas de Petri contendo diferentes meios de cultura: MM, Minca, CFA, AN, TSA, BHA, Ágar MacConkey e ágar sangue. Como controles positivos e negativos foram utilizadas as linhagens de *E. coli* TR50, *E. coli* B41 e *E. coli* C600, respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 horas.

3.14.2. PREPARO DAS HEMÁCIAS

Foram utilizadas hemácias humanas (tipos A e O), de boi, carneiro, cavalo, galinha e cobaio.

As suspensões sangüíneas utilizadas (vide item 3.5.) foram homogeneizadas por agitação manual branda, e centrifugadas a 2000 r.p.m., sob refrigeração, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado uma vez em solução salina 0,15 M e mais duas vezes em tampão PBS 0,05 M. Durante esses procedimentos, via de regra, as soluções utilizadas foram mantidas resfriadas a 4 °C.

Em seguida à última lavagem, o sobrenadante foi aspirado e com a papa de hemácias obtida, foram feitas suspensões a 5 %, para hemaglutinação em lâminas de vidro e a 1 %, para hemaglutinação em placas de microtitulação, em tampão PBS 0,05 M suplementado com D-manose numa concentração final de 1 %. Suspensões de hemácias em tampão PBS 0,05 M não suplementado com D-manose foram utilizadas unicamente em reações de hemaglutinação em lâmina de vidro. Durante a realização dos experimentos de hemaglutinação, as suspensões de hemácias foram mantidas sobre uma bolsa de gelo.

3.14.3 HEMAGLUTINAÇÃO EM LÂMINA DE VIDRO

Com o auxílio de palitos de madeira, um raspado de cada cultura crescida nos diferentes meios de cultura, foi

transferido, isoladamente, para a superfície de uma lâmina de vidro e homogeneizado com 50 ul da suspensão de hemácias a 5 % em tampão PBS 0,05 M suplementado de D-manose a 1 % e observada a ocorrência, ou não, de uma reação de hemaglutinação, com a lâmina sendo mantida à temperatura ambiente. A seguir, repetiu-se o procedimento, mantendo-se a lâmina sobre uma bolsa de gelo por alguns minutos.

O procedimento descrito acima foi repetido para cada linhagem estudada, utilizando-se uma suspensão de hemácias a 5 % em tampão PBS 0,05 M na ausência de D-manose.

3.14.4. MICROHEMAGLUTINAÇÃO MANOSE-RESISTENTE (MHMR)

A MHMR foi conduzida de acordo com a metodologia de JONES & RUTTER (1974). As reações foram feitas em placas de microtitulação contendo 96 orifícios de fundo em "U" com volume de 200 ul, distribuídos em 8 fileiras por 12 colunas. No primeiro orifício de cada fileira foram adicionados 100 ul de tampão PBS 0,05 M suplementado com D-manose a 1 % e nos 6 seguintes foram adicionados 50 ul do mesmo tampão. Em seguida, com auxílio de palitos de madeira, um raspado de cada cultura, crescida em cada um dos diferentes meios, foi ressuspensionado, isoladamente, no tampão contido no primeiro orifício de uma das fileiras. Um volume de 50 ul dessa suspensão foram transferidos ao segundo orifício da mesma fileira, diluindo-se, duas vezes a ressuspensão bacteriana. A diluição foi homogeneizada com auxílio de um

micropipetador e 50 μ l desta foram transferidos ao próximo orifício e assim, sucessivamente, até o sétimo, atingindo-se uma diluição de 1/128 da primeira suspensão. Em seguida, foram adicionados em cada um dos orifícios, 50 μ l de uma das suspensões de hemácias a 1 %. Via de regra, foi utilizada uma placa de microtitulação, separadamente, para cada tipo de hemácia.

Esse procedimento foi repetido para cada linhagem ensaiada, crescida em cada um dos diferentes meios. Para cada cultura foram utilizadas duas fileiras de orifícios. Uma fileira de orifícios, em cada placa, foi utilizada para o controle negativo, contendo suspensões de *E. coli* C600, e uma outra fileira foi utilizada como controle de hemácias, contendo apenas, 50 μ l do tampão mais 50 μ l da suspensão de hemácias a 1 %.

As placas foram agitadas brandamente por movimentos circulares sobre uma superfície plana e deixadas à temperatura ambiente por 1 hora, após o que, procedeu-se à leitura dos resultados. Em seguida, as placas foram novamente agitadas e incubadas a 4 °C por 1 hora e novamente foram observados os resultados.

3.15. TITULAÇÃO DA CAPACIDADE HEMAGLUTINANTE DO ANTÍGENO EAF44

A titulação da capacidade hemaglutinante do antígeno EAF44 foi feita através de reações de hemaglutinação de hemácias humanas, em lâmina de vidro, utilizando-se diluições crescentes de suspensões de culturas das linhagens de *E. coli* BF44 e *E. coli*

BF44nx.

As linhagens ensaiadas foram cultivadas em meio LB a 37 C, por cerca de 8 horas e a seguir semeadas em uma placa de meio CFA, que foi incubada a 37 C, por 16-18 horas. A seguir, com um raspado das culturas foram feitas duas suspensões densas em 200 ul de tampão PBS 0,05 M suplementado de D-manose a 1 %, contidos em um tubo de microcentrífuga. A partir dessas suspensões, foram feitas diluições consecutivas (1/2) em tubos de microcentrífuga contendo 100 ul do mesmo tampão, atingindo-se uma diluição de 1/256 das suspensões iniciais.

3.16. DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINAS STa e LT-I

3.16.1. CULTIVO DAS LINHAGENS BACTERIANAS

As linhagens bacterianas ensaiadas quanto à produção de enterotoxinas termo-estável (STa) e termo-lábil (LT-I), foram cultivadas meio LB ou TSB, por 16-18 horas, a 37 C. A seguir, uma alíquota de 100 ul de cada cultura foram inoculados, separadamente, em 10 ml de meio CAYE, em frascos de Erlenmeyer. As culturas foram crescidas sob agitação de 150 r.p.m., a 37 C, por 16-18 horas, em agitador-incubador. A seguir, as culturas foram centrifugadas por 30 minutos, a 5000 r.p.m., sob refrigeração, os sobrenadantes coletados em tubos de vidro e mantidos a 4 C até o momento do uso.

3.16.2. ENTEROTOXINA STa

Na detecção da produção da enterotoxina STa foi utilizado o método do camundongo recém-nascido (DEAN et alli, 1975), através do qual, a produção de STa por uma determinada linhagem bacteriana é detectada pela ocorrência de acúmulo de líquido no interior de intestinos de camundongos recém-nascidos, após a inoculação destes, com o sobrenadante do cultivo dessa linhagem. Após a aplicação do teste, verifica-se o valor da relação peso do intestino/peso da carcaça dos animais inoculados. De acordo com esse método, valores dessa relação iguais ou maiores que 0,085 indicam a produção de STa por parte da linhagem ensaiada.

Um volume de 1 ml do sobrenadante de cada cultura, foi transferido, separadamente, para tubos de ensaio aos quais foi adicionada uma gota da solução Azul de Evans a 2 %. A seguir com auxílio de seringas e agulhas apropriadas, 100 μ l da solução resultante foram inoculados em camundongos recém-nascidos, ou por via intragástrica ou por via oral. No caso do inóculo ser feito por via oral, a agulha foi substituída por uma cânula de plástico. Para cada linhagem ensaiada, foram inoculados, em média, 3 animais.

Após o inóculo, os animais foram agrupados de acordo com a origem do sobrenadante inoculado e mantidos, por um período de 3-4 horas, em placas de Petri ligeiramente entreabertas para possibilitar ventilação adequada.

Após esse período, os animais foram sacrificados com éter

e seus intestinos removidos. Os intestinos e as carcaças (corpos sem intestino) de cada grupo de camundongos foram pesados separadamente e pelos valores obtidos na pesagem, estabeleceu-se a relação peso do intestino/peso da carcaça.

3.16.3. ENTEROTOXINA LT-I

Na detecção da produção da enterotoxina STa foi utilizado o método da imunohemólise radial (YANO et alli, 1982).

Um volume de cerca de 3 ml de sangue de carneiro, previamente preparado como descrito no item 3.5.2., foi centrifugado a 2000 r.p.m., sob refrigeração, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado por três vezes em tampão trietanolamina, a 4 C.

Com a papa de hemácias obtida, foi preparada uma suspensão de hemácias a 5 %, em tampão trietanolamina. Um volume de 2 ml desta suspensão foi adicionada a 20 ml de agarose a 1 %, fundida em tampão trietanolamina e previamente resfriada a 45 C, resultando numa concentração final de 0,5 % de hemácias, no gel. O gel foi imediatamente vertido em uma tampa de placa de microtitulação e após a gelificação, foram feitos orifícios de aproximadamente 3 mm de diâmetro em sua superfície, resultando numa série ordenada de orifícios com volume aproximado de 20 μ l. Nestes orifícios foram adicionados, separadamente, 15 μ l do sobrenadante de cada linhagem bacteriana ensaiada. Em seguida, a placa foi mantida em câmara úmida por um período de 16-18 horas.

A seguir, em cada orifício do gel, foram adicionados 15 ul de uma suspensão de anti-toxina colérica produzida em cavalo e absorvida com hemácias de carneiro. A placa foi mantida em câmara úmida, à temperatura ambiente por um período de cerca de 4 horas e a seguir 10 ml de complemento de coelho, previamente diluído 10 vezes em tampão trietanolamina, foram espalhados sobre toda a superfície da placa. A placa, em câmara úmida, foi incubada a 37^o C por 16-18 horas e após esse período procedeu-se à leitura dos resultados.

A produção da enterotoxina LT-I por uma determinada linhagem bacteriana foi detectada pela formação de regiões de hemólise (halos claros) ao redor do orifício correspondente, no gel.

3.17. DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE VEROCITOTOXINA (VT)

3.17.1. PREPARO DA TOXINA

A produção de verocitotoxina foi ensaiada segundo metodologia de YANO et alii (1988).

As linhagens de *E. coli* ensaiadas quanto à produção de verocitotoxina foram inicialmente cultivadas em meio LB ou TSB por cerca de 8 horas e a seguir, 100 ul de cada cultura foram inoculados, separadamente, em 10 ml de meio Penassay, contidos em frascos de Erlenmeyer. As culturas foram crescidas sob agitação de 150 r.p.m., a 37^o C por 16-18 horas. Após o crescimento, as

culturas foram centrifugadas sob refrigeração, a 5000 r.p.m., por 30 minutos e os sobrenadantes coletados em frascos de vidro. Em seguida, 1 ml de cada sobrenadante foi transferido para tubos de microcentrífuga e centrifugados a 12000 g por 5 minutos, após o que, 800 ul de cada sobrenadante foram recuperados e transferidos para outros tubos do mesmo tipo. A cada um destes sobrenadantes foi adicionada uma solução de gentamicina para resultar numa concentração final de 30 ug/ml.

3. 17.2. PREPARO DAS CULTURAS DE CÉLULAS

Células Vero provenientes de estoques mantidos congelados a ^o-70 C, em nitrogênio líquido, foram rapidamente descongeladas em banho-maria a ^o37 C e transferidas para uma garrafa de cultura de tecido contendo 14 ml de meio Eagle suplementado de soro fetal bovino a 10 %. A garrafa foi incubada a ^o37 C em atmosfera de dióxido de carbono por 48 horas. Após esse período, o meio foi removido e o tapete celular lavado com 3 ml de meio Eagle. A seguir, adicionou-se à cultura 15 ml de meio Eagle e esta foi incubada a ^o37 C em atmosfera de dióxido de carbono até a verificação, em microscópio invertido, da consolidação do tapete celular. Em seguida, o meio foi descartado e a cultura lavada com meio Eagle suplementado com 2 ml de solução de tripsina (ATV). O meio foi descartado e adicionou-se à cultura 0,5 ml do mesmo meio e esta foi incubada por 10 minutos, a ^o37 C, em atmosfera de dióxido de carbono. Após esse período, procedeu-se à verificação

visual, em microscópio invertido, do desprendimento das células do tapete celular, as quais foram ressuspensas em 5 ml de meio Eagle, com auxílio de uma pipeta. A seguir foi feita uma contagem do número de células por ml da suspensão, em câmara de Neubauer. A suspensão foi então diluída com meio Eagle suplementado com soro fetal bovino a 10 %, para um número estimado de $2,5 \times 10^5$ células/ml.

3.17.3. CULTIVO DAS CÉLULAS

Após a estimativa do número de células por ml da suspensão celular, a suspensão foi distribuída em placas de cultura de tecido, com 96 orifícios de fundo chato, em volumes de 100 µl por orifício e a placa foi incubada a 37 °C, em atmosfera de dióxido de carbono, por 24 horas. Após esse período, o meio contido nos orifícios das placas foi descartado e em cada orifício contendo uma cultura de células, foram adicionados 100 µl de meio Eagle (sem soro fetal bovino) mais 100 µl da suspensão bacteriana a ser ensaiada.

As placas foram incubadas a 37 °C, em atmosfera de dióxido de carbono e procedeu-se à leitura dos resultados, em microscópio invertido, com 24 e 48 horas de incubação.

3.18. DETECÇÃO DE PRODUÇÃO DE TOXINA LETAL A CAMUNDONGOS

As linhagens de *E. coli* ensaiadas quanto à produção de

toxina letal a camundongos (TLC) foram: *E. coli* J111, *E. coli* BF44, *E. coli* BV, *E. coli* BF44 (pMY111) e *E. coli* BV (pMY111), sendo, as duas últimas, transconjugantes portando o plasmídeo pMY111 da *E. coli* J111.

Foram realizados cinco ensaios idênticos: em quatro foi utilizado o meio TSB, e num quinto ensaio foi utilizado o MM, como meios para expressão TLC.

Cada linhagem ensaiada quanto à produção de TLC foi crescida em meio LB ou TSB, a 37 °C, por 16-18 horas. A seguir, um volume de 100 µl da cultura foi inoculado em 10 ml de meio TSB, em frasco de Erlenmeyer, e a cultura foi crescida sob agitação de 150 r.p.m., a 37 °C, por 16-18 horas, em agitador-incubador.

Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas a 5000 r.p.m., sob refrigeração, por 30 minutos. Os sobrenadantes foram coletados em tubos de vidro e mantidos a 4 °C até o momento do uso, num período máximo de algumas horas.

Um volume de 500 µl do sobrenadante da cultura de cada linhagem bacteriana ensaiada foi inoculado, separadamente, por via intraperitonal, em camundongos adultos jovens, da linhagem C57 "black", do sexo feminino, com idades variando de 35-50 dias, num lote de, em média, 5 animais por linhagem.

Após o inóculo, os animais foram mantidos em gaiolas com provisão adequada de ração e água, à temperatura ambiente. por um período de 18-24 horas, após o qual foram verificados os resultados iniciais. A observação da reação dos animais inoculados estendeu-se por um período de cinco dias.

3.19. DETERMINAÇÃO DE PERFIS PLASMIDIANOS

A visualização dos perfis plasmidiano das linhagens bacterianas selecionadas para a realização deste trabalho, foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose, segundo SHARP *et alli* (1973), após extração de plasmídios, segundo a técnica de BIRNBOIM & DOLI (1979), modificada.

3.19.1. EXTRAÇÃO DE PLASMÍDIOS

As linhagens bacterianas utilizadas nos ensaios de extração de DNA plasmidiano foram inicialmente cultivadas em 2 ml de meio LB a 37 °C, por cerca de 8 horas e a seguir, 100 µl de cada cultura foram inoculados, separadamente, em 5 ml de meio LB. As culturas foram incubadas a 37 °C por 16-18 horas.

Sempre que uma linhagem fosse portadora de um plasmídio selecionável com algum tipo de antimicrobiano, esta foi cultivada sob pressão seletiva do mesmo (vide Tabela 4).

Após o crescimento, 1,2 ml de cada cultura foi transferido, separadamente, para tubos de microcentrífuga e centrifugados a 12000 g por 30 segundos, em microcentrífuga. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos ressuspensos em 100 µl da solução I (mantida a 4 °C) e os tubos deixados em gelo por 5 minutos.

A seguir, adicionou-se aos tubos, 200 µl da solução II (mantida à temperatura ambiente). Os tubos foram fechados e

agitados brandamente, com repetidos movimentos de inversão, e deixados em gelo por cerca de 3 minutos.

Em seguida, foram adicionados em cada tubo, 150 ⁰ul da solução III (mantida a 4 C). Os tubos foram agitados brandamente por inversão e deixados em gelo por 15 minutos.

Após esse período, os tubos foram centrifugados a 12000 g por 5 minutos e 400 ⁰ul do sobrenadante de cada tubo foi recuperado e transferido para outro tubo do mesmo tipo. A esses 400 ⁰ul de sobrenadante foram adicionados 1000 ⁰ul de etanol absoluto a -20 C. Os tubos foram agitados brandamente por inversão e mantidos a -20 C por uma hora ou por um período de cerca de 18 horas. A seguir, os tubos foram centrifugados a 12000 g por 5 minutos, os sobrenadantes descartados e o interior dos tubos, secados.

Após a completa secagem do interior dos tubos, os sedimentos foram ressuspensos em 40 ⁰ul de solução I. Um volume de 15 ⁰ul dessa ressuspensão foram, então, transferidos para um outro tubo de microcentrífuga, aos quais se adicionou 5 ⁰ul da solução de ressuspensão.

3.19.2. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

3.19.2.1. PREPARO DA MATRIZ DE AGAROSE

Os géis de agarose foram preparados na concentração de 0,6 % em matrizes de 3 mm de espessura. A agarose utilizada foi

de baixa eletroendosmose (SIGMA low EEO).

Para o preparo do molde da matriz de agarose foi utilizada uma placa de vidro retangular, cujas extremidades foram seladas de forma contínua com fita adesiva de maneira a se formar um molde. Este foi colocado sobre uma superfície lisa e plana e um pente de acrílico foi posicionado em uma de suas extremidades menores, cerca de 1 mm acima de sua superfície.

Após o preparo do molde, uma quantidade adequada de agarose foi dissolvida em 20 ml de tampão TEB para uma concentração final de 0,6 % e fundida em forno de microondas. Em seguida, a agarose foi resfriada a cerca de 45 °C e vertida diretamente no molde. O gel foi deixado em repouso por cerca de 30 minutos até a gelificação da matriz de agarose. O pente de acrílico posicionado a 1 mm da placa de vidro permitia a formação de fossos completos ("canaletas") quando da gelificação da agarose.

Após a gelificação, o pente de acrílico e a fita adesiva foram removidos e o gel submerso em uma cuba de eletroforese horizontal, contendo tampão TEB, ligada à corrente elétrica. O gel foi posicionado de forma a permitir uma migração do DNA plasmidiano em direção ao ânodo, uma vez que o DNA, no pH alcalino do tampão TEB tem carga líquida negativa.

3.19.2.2. CORRIDA ELETROFORÉTICA

As amostras de DNA plasmidiano em solução de ressuspensão

foram aplicadas nas canaletas e procedeu-se à corrida eletroforética. Na fase inicial desta, utilizou-se uma corrente elétrica de 15 miliampéres, até a entrada da solução de ressuspensão no interior do gel, após o que, a voltagem foi aumentada e mantida em 90 volts até o término da corrida. O procedimento inicial foi utilizado para se evitar deformações no campo elétrico.

3.19.3. VISUALIZAÇÃO DOS PERFIS PLASMIDIANOS

Após o término da corrida eletroforética, o gel foi transferido para uma cuba contendo solução corante de brometo de etídio a 0,0005 % (vide item 3.3.21.) e mantido por cerca de 30 minutos à temperatura ambiente ou a 4 °C por 18-24 horas. Em seguida, o gel foi transferido para um transiluminador de luz ultravioleta para visualização das bandas de DNA plasmidiano.

A documentação dos resultados foi feita através de fotografias, utilizando-se filme preto e branco asa 100, empregando-se filtro vermelho.

3.20. ESTIMATIVA DE PESOS MOLECULARES

A estimativa dos pesos moleculares dos plasmídios estudados neste trabalho, foi feita pelo método de MEYERS et alli (1976), baseado na relação inversa do peso molecular do plasmídio e sua mobilidade eletroforética.

Os plasmídios utilizados como referência para pesos moleculares foram provenientes das linhagens de *E. coli* P307, portadora de um único plasmídio de 54 Mdal e *E. coli* V517 (MACRINA et alli, 1978), portadora de oito plasmídios com os seguintes pesos moleculares: 32,04; 5,19; 3,48; 3,03; 2,24; 1,69; 1,51 e 1,25 Mdal.

Os logarítimos de base 10 do pesos moleculares dos plasmídios de referência em função dos logarítimos de base 10 das medidas, em centímetros, do espaço percorrido em suas respectivas migrações no gel, foram utilizados em um cálculo de regressão linear que forneceu os coeficientes linear e angular utilizados na estimativa do pesos moleculares dos plasmídios estudados em função de sua migração no gel. A estimativa do peso molecular de cada plasmídio estudado foi feita através da equação da reta $f(x) = a + bx$, onde x é o logarítmo de base 10 da distância de migração no gel, a e b os coeficientes linear e angular, respectivamente, e $f(x)$ o logarítmo de base 10 do peso molecular estimado do plasmídio.

3.21. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Nos estudos de microscopia eletrônica, foi utilizado um microscópio eletrônico de transmissão Carl Zeiss modelo EM 9S2, do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP.

3.21.1. PREPARO DAS TELAS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Foram utilizadas telas de cobre com diâmetro de malha de 400 mesh. As telas sofreram deposição de uma película de parlódio seguida de metalização com carbono. Estas foram preparadas no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP empregando-se o seguinte procedimento: uma gota de uma solução de parlódio a 0,5 % foi colocada sobre água destilada contida em uma cuba e as telas foram depositadas sobre a película formada por 1 a 2 minutos. Em seguida, as telas sofriam metalização com carbono em metalizador HITASHI SHL (HU-46B).

3.21.2. PREPARO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS

Cada amostra bacteriana a ser analisada via microscopia eletrônica foi crescida em meio TSB, a 37 C, por 16-18 horas e separadamente, em meio TSB, a 16 C, por 48-72 horas. A seguir, 100 ul de cada cultura, crescida nas diferentes condições de temperatura, foram semeados, separadamente, em placas de Petri contendo os meios adequados para a expressão dos antígenos de superfície em estudo. Para cada cultura foram semeadas duas placas que foram incubadas, separadamente, ou a 37 C ou a 16 C, de acordo com a condição anterior de crescimento da cultura semeada.

Após cada período de crescimento, a partir de um raspado de cada cultura, foram feitas suspensões bacterianas ralas em

200 μ l de tampão PBS 0,05 M, contidos em tubos de microcentrífuga. Após o preparo de todas as suspensões procedeu-se à coloração negativa com solução de uranila a 2%.

3.21.3. COLORAÇÃO NEGATIVA COM SOLUÇÃO DE URANILA A 2 %

A solução de uranila a 2% foi mantida em repouso, à temperatura ambiente, por pelo menos 30 minutos antes do início do ensaio. A seguir, sobre uma membrana celulósica impermeável (Parafilm), foram depositadas, lado a lado, uma gota da suspensão bacteriana a ser analisada e uma gota da solução de uranila a 2 %. Sobre a superfície da gota da suspensão bacteriana, foi colocada a tela com o lado do filme suporte para baixo. A tela foi mantida sobre a superfície da gota por cerca de 1 minuto. A seguir, a tela foi removida, seca com papel de filtro e transferida, na mesma posição, para a superfície da gota da solução de uranila a 2 %. Após um período de cerca de 1 minuto, a tela foi removida, seca com papel de filtro e levado ao microscópio eletrônico para observação.

3.22. CONJUGAÇÕES BACTERIANAS

As linhagens, doadora e receptora, de *E. coli* a serem conjugadas foram cultivadas, separadamente, em 5 ml de meio LB, sob pressão seletiva (os antimicrobianos utilizados para esse fim e as concentrações utilizadas, encontram-se na Tabela 4), a 37 °C

por 16-18 horas. A seguir, 250 μ l de cada cultura foram transferidos, separadamente, para tubos de microcentrífuga e centrifugados a 12000 g por 30 segundos. Os sobrenadantes foram descartados e as culturas lavadas em 200 μ l de meio LB. A seguir, as duas culturas foram misturadas em 200 μ l de meio LB. Essa ressuspensão foi inoculada em 5 ml de meio LB e incubada a 37 C por 16-18 horas.

Após o período de crescimento da cultura de conjugação, 100 e 10 μ l desta, foram semeados, separadamente, em placas de Petri contendo meio LA ou Ágar MacConkey, suplementado com os antimicrobianos adequados para impedir o crescimento das linhagens parentais, permitindo unicamente o crescimento dos transconjugantes (vide Tabela 4).

As placas foram incubadas a 37 C por 16-18 horas. Após esse período, havendo crescimento de transconjugantes, 5 colônias isoladas foram coletadas e transferidas para meio LB suplementado com os mesmos antimicrobianos utilizados para sua seleção em meio sólido. Após o crescimento, essas culturas foram utilizadas em ensaios de caracterizações biológica e genética. As placas, com o restante dos transconjugantes, foram guardadas a 4 C, para eventual coleta de novas colônias.

3.23. PESQUISA DO DETERMINANTE GENÉTICO DO ANTÍGENO "K99"

3.23.1. CONJUGAÇÕES

Com o objetivo de se tentar determinar a localização do determinante genético do antígeno "K99" produzido pela linhagem de *E. coli* J111, esta foi conjugada com quatro diferentes linhagens de *E. coli*, sendo, duas linhagens de *E. coli* K12 (*E. coli* C600 e *E. coli* DH5a) e duas linhagens selvagens (*E. coli* BF44 e *E. coli* BV). Para testar a capacidade das linhagens de *E. coli* K12 de expressar um antígeno de superfície, estas foram conjugadas com a linhagem de *E. coli* B41.

Os transconjugantes obtidos foram ensaiados quanto à expressão do antígeno "K99" através de reações de soroaglutinação em lâmina, como descrito no item 3.8.2., sendo utilizados como controles positivo e negativos, as linhagens de *E. coli* J111 e as linhagens receptoras, respectivamente.

As linhagens bacterianas utilizadas nos ensaios de conjugação e os respectivos transconjugantes obtidos encontram-se listados na Tabela 5.

3.23.2. TENTATIVAS DE EXPRESSÃO DO ANTÍGENO "K99"

Nas tentativas de obtenção da expressão do antígeno "K99" pelas linhagens transconjugantes de *E. coli* C600 e *E. coli* DH5a foi utilizada uma metodologia baseada na de ISAACSON (1980).

O método consiste no crescimento prévio da linhagem a ser ensaiada quanto à expressão do antígeno, em meio líquido, sob aeração, a 37 °C por 16-18 horas, por três gerações seguidas, antes da semeadura em meio sólido. Os meios líquidos utilizados com esse fim foram o MM, Minca, e o meio TSB com concentração de glicose reduzida de 0,25 % para 0,15 %.

As linhagens ensaiadas quanto à expressão do antígeno "K99", por este método, foram os tranconjugantes *E. coli* C600 (pMY111) e *E. coli* DH5a (pMY111).

As linhagens a serem ensaiadas foram inicialmente cultivadas em 5 ml de meio TSB (glicose 0,15 %), a 37 °C, por cerca de 8 horas. Após esse período, alíquotas de 0,5 ml de cada cultura foram transferidas, separadamente, para frascos de Erlenmeyers contendo 10 ml de um dos diferentes meios líquidos. Os frascos foram incubados a 37 °C, sob agitação de 150 r.p.m., por 16-18 horas, em agitador-incubador.

Em seguida, os transconjugantes foram semeados em placas de Petri contendo meio Minca ou CFA. As placas foram incubadas a 37 °C por 16-18 horas e após esse período, os transconjugantes foram ensaiados quanto à expressão do antígeno "K99", em reações de soroaglutinação como descrito no item 3.8.2.

Em cada experimento foram ensaiados de 5 a 7 transconjugantes de cada linhagem receptora. O reduzido número de amostras testadas foi devido a limitações de material. Como controles positivo e negativos foram utilizadas as linhagens de *E. coli* J111 e as linhagens receptoras, respectivamente.

Numa segunda abordagem, os transconjugantes foram crescidos em meio Minca líquido, como da forma anterior, com a diferença de que as três gerações de crescimento tiveram a duração de apenas duas a três horas, com a finalidade de manter as células na fase exponencial de crescimento, antes da semeadura em meio sólido, que foi feita como descrito acima.

Nas tentativas de obtenção da expressão do antígeno "K99" pelas linhagens transconjugantes de *E. coli* BF44 e *E. coli* BV, estas foram cultivadas em meio Minca líquido por três gerações seguidas de cerca de 16-18 horas a 37 °C, e, a seguir, cultivadas em meio Minca ou CFA por 16-18 horas a 37 °C. Em seguida, os transconjugantes foram ensaiados quanto à expressão do antígeno "K99", em reações de soroaglutinação como descrito no item 3.8.2.

A presença do plasmídeo pMY111 nos transconjugantes ensaiados foi verificada pela manutenção da resistência simultânea à ampicilina, estreptomicina e à tetraciclina e, em alguns casos, através de eletroforese em gel de agarose (vide figura 2).

3.24. MOBILIZAÇÃO PLASMIDIANA

Tentativas de mobilização dos plasmídios pMY551 da linhagem de *E. coli* BVsm para a linhagem de *E. coli* BF44nx e do plasmídeo pMY555 desta última para a primeira foram feitas utilizando-se como mobilizador um plasmídeo de amplo espectro de hospedeiro, o pRP4 (vide Tabela 3). O plasmídeo pRP4 foi

transferido para a linhagem de *E. coli* BVsm e desta para a linhagem de *E. coli* BF44 por conjugação bacteriana.

Cruzamentos recíprocos entre as linhagens de *E. coli* BF44 e *E. coli* BV, utilizando-se o plasmídio pRP4 como mobilizador foram realizados, sendo os transconjugantes selecionados para a presença do mobilizador, em placas de Petri contendo meio LA suplementado com os antimicrobianos adequados (vide item 3.3.17. e Tabela 4).

Em seguida os transconjugantes foram examinados ou para a expressão do antígeno EAF44, no caso da linhagem de *E. coli* BVsm ou para a produção de hemolisina, no caso da linhagem de *E. coli* BF44nx.

A expressão do antígeno EAF44 foi ensaiada através de reações de hemaglutinação manose-resistente, com hemácias humanas, em lâmina de vidro, como descrito no item 3.14. Como controles positivo e negativos foram utilizadas as linhagens de *E. coli* BF44nx e *E. coli* BVsm e *E. coli* C600 (pRP4), respectivamente.

Foram realizados dois ensaios de hemaglutinação, tendo sido examinadas cerca de 100 transconjugantes em cada um.

A produção de hemolisina foi ensaiada, como descrito no item 3.10., pela semeadura, por estrias, dos transconjugantes, em placas de ágar sangue, seguida de incubação a 37 °C por 18-24 horas. Como controles positivo e negativos foram utilizadas as linhagens de *E. coli* BVsm e *E. coli* BF44nx, *E. coli* C600 (pRP4), respectivamente. Foram testados cerca de 100 transconjugantes.

As presenças de quaisquer plasmídios nos transconjugantes

ensaiados, em ambos os casos, foi verificada através de eletroforese em gel de agarose.

3.25. DETERMINAÇÃO DE GRUPOS DE INCOMPATIBILIDADE

Nas tentativas de determinação dos Grupos de Incompatibilidade aos quais pertenceriam os plasmídios presentes nas linhagens de *E. coli* J111 e *E. coli* BV, bem como para sua eliminação, foi empregada uma metodologia baseada na de BRODA (1979).

3.25.1. TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDIOS

Linhagens de *E. coli* C600nx portadoras de plasmídios pertencentes a Grupos de Incompatibilidade conhecidos foram conjugadas com as linhagens de *E. coli* J111 e *E. coli* BVsm. As características desses plasmídios, bem como as linhagens bacterianas que os transportam, encontram-se na Tabela 3.

No caso da linhagem de *E. coli* BVsm foram utilizados todos os plasmídios listados na Tabela 3 e no caso da linhagem de *E. coli* J111 foram utilizados unicamente os plasmídios pRP4, p40a, pR391, pR471 (vide Tabela 3) devido ao fato de serem os únicos disponíveis apresentando resistência à canamicina, em níveis aos quais a linhagem de *E. coli* J111 é sensível.

As conjugações bacterianas e as seleções dos transconjugantes foram feitas como descrito no item 3.22.

O procedimento descrito acima foi empregado com o duplo objetivo de se determinar o Grupo de Incompatibilidade ao qual um determinado plasmídio estudado pertencia e como tentativa de se eliminar um ou mais plasmídios presentes nas linhagens bacterianas em estudo com a finalidade de se verificar o desaparecimento de qualquer uma de suas características biológicas conhecidas, relacionando-a deste modo, com o plasmídio eliminado.

Os transconjugantes obtidos com a transferência dos plasmídios indicadores de Grupo de Incompatibilidade para a linhagem de *E. coli* BVsm, foram utilizados para a transferência destes para a linhagem de *E. coli* BF44nx.

3.25.2. ANÁLISE DOS TRANCONJUGANTES

3.25.2.1. *E. coli* J111

Após as transferências dos plasmídios pRP4, p40a, pR391 e pR471 para a linhagem de *E. coli* J111, esta foi cultivada, em meio LB, sob pressão seletiva de 100 ug/ml de canamicina, a 37 °C por 16-18 horas. Foram realizados mais 6 subcultivos nas mesmas condições. A partir do último subcultivo, a linhagem foi semeada por estrias em uma placa de Petri contendo meio LB suplementado com 100 ug/ml de canamicina. A placa foi incubada a 37 °C por 16-18 horas. Cinco colônias isoladas foram transferidas da placa para tubos contendo 5 ml de meio LB suplementado com 100 ug/ml de

canamicina. Os tubos foram incubados a 37^o C, por 16-18 horas. Após esse período, uma amostra da cultura de cada tubo foi semeada por estria em placas de Petri suplementadas com o antimicrobiano adequado (vide Tabela 4) para selecionar negativamente a amostra que tivesse perdido o plasmídio pMY111.

3.25.2.2. E. coli BF44 e E. coli BV

Após a transferência dos plasmídios listados na Tabela 3, para as linhagens de E. coli BF44 e E. coli BV, os transconjugantes foram cultivados como descrito no item anterior, sob pressão do antimicrobiano adequado para a seleção do plasmídio transferido (vide Tabela 4). Após todo os procedimentos de subcultivos descritos no item anterior, 5 amostras de cada linhagem foram examinadas para a expressão de suas características originais.

As amostras da linhagem de E. coli BF44 foram cultivadas em meio CFA e testadas para a expressão do antígeno EAF44, através reações de hemaglutinação manose-resistente de hemácias humanas, como descrito no itens 3.14.

Como controles positivo e negativo, foram utilizadas as linhagens de E. coli BF44nx e E. coli BVsm.

As amostras da linhagem de E. coli BV provenientes do último subcultivo em meio LB suplementado com droga antimicrobiana, foram semeadas com auxílio de uma multi-alça em placas de ágar sangue e em placas de meio LA isento da droga. As

placas de ágar sangue indicariam a perda da capacidade hemolítica por uma determinada amostra e as placas de meio LA seriam utilizadas em ensaios de detecção da produção de colicina por parte das amostras testadas, visando verificar a perda dessa propriedade por parte de alguma amostra. Os ensaios de detecção da produção de colicina foram feitos como descrito no item 3.11.

3.26. MUTAGÊNESE MEDIADA POR TRANSPOSONS

Nos ensaios de mutagênese bacteriana mediada por transposons foram utilizados os transposons Tn801 presente no plasmídio termo-sensível pMR5 (ROBINSON et alli, 1980), residente na linhagem de *E. coli* HB101 e o TnphoA, presente no plasmídio "suicida" pRT733, residente na linhagem de *E. coli* SM10 λ mdapir (TAYLOR, 1989). O objetivo foi inserir um transposon nos plasmídios residentes nas linhagens de *E. coli* BF44nx e *E. coli* BVnx, visando a aquisição por parte destes, de marcadores selecionáveis em experimentos de conjugação ou transformação bacteriana; ou ainda, relacionar a inserção de um determinado transposon em um determinado plasmídio, com a possível perda de alguma característica biológica conhecida das bactérias em estudo, visando determinar a localização dos genes que a controlam.

3.26.1. TRANSFERÊNCIA DO PLASMÍDIO pMR5

A linhagem de *E. coli* HB101 foi crescida à temperatura ambiente, por 16-18 horas, em 5 ml de meio LB suplementado com 50 ug/ml de canamicina mais 50 ug/ml de ampicilina para seleção do plasmídeo e do transposon Tn801. As linhagens receptoras foram cultivadas em 5 ml de meio LB suplementado de 100 ug/ml de ácido nalidíxico.

Após o crescimento das culturas bacterianas, a linhagem doadora foi conjugada, separadamente, com cada uma das linhagens receptoras, conforme metodologia descrita no item 3.22., porém à temperatura ambiente.

3.26.2. TRANSFERÊNCIA DO PLASMÍDIO pRT733

A linhagem de *E. coli* SM10 λ mbdpir, foi cultivada em 5 ml de meio LB suplementado com 100 ug/ml de ampicilina e as linhagens receptoras foram cultivadas em 5 ml de meio LB suplementado com 100 ug/ml de ácido nalidíxico, a 37 °C, por 16-18 horas.

Após o crescimento das culturas bacterianas, a linhagem doadora foi conjugada, separadamente, com cada uma das linhagens receptoras, conforme metodologia descrita no item 3.22., a 37 °C, por 16-18 horas.

3.27. TRANSFORMAÇÕES BACTERIANAS

Transformações bacterianas foram realizadas com duas finalidades distintas: (1) transferir para uma linhagem de *E. coli* DH5a, ou o plasmídio pMY551, presente na linhagem de *E. coli* BVsm, ou o plasmídio pMY555, presente na linhagem de *E. coli* BF44nx, via co-transformação e (2) transferir para estas duas últimas, o plasmídio pMR5, portador do transposon Tn801.

No caso das linhagens de *E. coli* BF44nx e *E. coli* BVsm, foram utilizadas linhagens transconjugantes de ambas as bactérias, transportando o plasmídio pRP4 que seria utilizado como marcador para seleção dos transformantes.

3.27.1. OBTENÇÃO DO DNA PLASMIDIANO

O DNA plasmidiano usado para a transformação das linhagens receptoras foi extraído como descrito no item 3.19.1. As soluções de DNA plasmidiano foram mantidas, após extração, em tampão TE a -20 °C, até o momento do uso.

Nos casos das linhagens de *E. coli* BV e *E. coli* BF44, as soluções de DNA plasmidiano representavam duas distintas populações dos plasmídios de ambas as bactérias, juntamente com o plasmídio pRP4.

Como controle do ensaio foi utilizado o plasmídio pBR322 (BOLIVAR et alii, 1977) que apresenta alta frequência de transformação.

3.27.2. OBTENÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES

A bactéria receptora foi cultivada a 37 °C, por 16-18 horas, em meio LB. Após esse período, 2,5 ml dessa cultura foram inoculados em 50 ml de meio LB, contidos em um frasco de Erlenmeyer, para resultar numa diluição de cerca de 5 % da cultura.

Em seguida, o frasco foi transferido para um agitador-incubador e a cultura incubada a 37 °C, sob agitação de 150 r.p.m., durante cerca de 1,5 hora, até que a cultura atingisse uma densidade óptica (D.O.) de aproximadamente 0,5, num comprimento de onda de 650 nm.

Após esse período, a cultura foi distribuída em dois tubos de centrifuga esterilizados, em volumes de 25 ml cada. Os tubos foram incubados em gelo por 10 minutos.

A seguir, os tubos foram centrifugados sob refrigeração, a 5000 r.p.m., por 10 minutos, a 4 °C, os sobrenadantes descartados e os sedimentos ressuspensos brandamente em 2,0 ml de solução de cloreto de cálcio 0,1 M, esterilizada, previamente resfriada a cerca de 4 °C. O volume dos tubos foi completado para 20 ml com a mesma solução e estes foram incubados em gelo por 10 minutos.

Após esse período, os tubos foram centrifugados a 5000 r.p.m., por 10 minutos, a 4 °C, os sobrenadantes descartados e os sedimentos ressuspensos em um volume final de 2,0 ml de solução de cloreto de cálcio 0,1 M.

As suspensões bacterianas em cloreto de cálcio 0,1 M foram distribuídas em volumes de 200 ul e transferidas para tubos de ensaio previamente mantidos em gelo. Os tubos foram incubados por 4-5 horas em gelo.

3.27.3. TRANSFORMAÇÃO

Em seguida à incubação em gelo, a cada um desses tubos foi adicionada, separadamente, uma diferente solução de cada DNA plasmidiário, em volumes de aproximadamente 100 ul. Os tubos foram então, incubados em gelo por 45 minutos.

Após esse período, procedia-se a um choque térmico, transferindo-se os tubos do gelo para banho-maria a 37 °C, durante 5 minutos seguido de incubação em gelo por mais dois minutos.

Acrescentou-se em cada tubo 800 ul de meio SOC e estes foram incubados em estufa a 37 °C, por cerca de 1 hora. A seguir, o material foi transferido para tubos de microcentrífuga e centrifugados a 12.000 g por 2 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos ressuspensos em 100 ul de meio LB, os quais foram semeados, sem diluição, em placas de Petri contendo meio LA suplementado com 100 ug/ml de ampicilina, para seleção dos transformantes. As placas foram incubadas a 37 °C, por 16-18 horas e após esse período, os resultados foram observados.

3.28. ELIMINAÇÃO PLASMIDIANA

Tentativas de eliminação do plasmídio pMY111 da linhagem de *E. coli* J111 e do plasmídio pMY551 da linhagem de *E. coli* BV, foram feitas utilizando-se uma metodologia baseada na de TOMOEDA et alii (1968).

3.28.1. CONDIÇÕES DE CULTIVO

Culturas das linhagens de *E. coli* J111 e *E. coli* BV, foram cultivadas em 10 ml de meio Penassay, sob agitação de 150 r.p.m., a 37 °C, por 16-18 horas em agitador-incubador. Em seguida, uma alíquota de 1,0 ml dessas culturas foram transferidas, separadamente, para um frasco de Erlenmeyer contendo 10 ml de meio Penassay suplementado com SDS numa concentração final de 5 %. As culturas foram, então, crescidas nas mesmas condições anteriores.

Após o crescimento das culturas no meio contendo SDS, uma alíquota de 1,0 ml de cada uma foi transferida para outro frasco contendo 10 ml de meio Penassay suplementado de SDS a 5 % e crescida conforme descrito. Esse procedimento foi repedido 7 vezes seguidas em cada caso. As cultura obtidas no sétimo ciclo de crescimento foram utilizadas para os ensaios de detecção de amostras sem a presença do plasmídio.

Em cada caso, a partir de uma alíquota de 1,0 ml da última cultura crescida na presença de SDS a 5 %, foram feitas

diluições decimais em solução salina 0,15 M de forma a se obter o crescimento de cerca de 300 colônias isoladas, em média, em placas de Petri contendo meio LA.

Para a seleção de possíveis amostras sem plasmídeo foram utilizadas duas metodologias diferentes como descrito a seguir.

3.28.2. RÉPLICA EM VELUDO

A superfície do meio de cada placa contendo colônias isoladas foi posto em contato direto com retângulos de veludo, autoclavados, ajustados a um cilindro de madeira, de modo a se transferir uma porção de cada colônia isolada para o veludo. Em seguida, a superfície de uma placa contendo meio LA suplementado com 100 ug/ml de ampicilina foi colocada em contato direto com o veludo, obtendo-se uma "réplica" da placa anterior. As placas foram marcadas numa determinada posição, de modo a se reconhecer na placa "réplica", a posição de correspondente de cada colônia isolada na placa original.

Desta forma, se não houvesse crescimento numa determinada posição na placa contendo meio com ampicilina, uma amostra sem plasmídeo poderia ser isolada, recuperando-se a mesma a partir da colônia crescendo em posição correspondente na placa contendo meio sem o antimicrobiano.

Esse procedimento foi repetido três vezes e o número médio de colônias analisadas em cada ensaio foi de 2000.

A técnica da réplica em veludo foi utilizada somente no

caso da linhagem de *E. coli* J111.

3.28.3. TRANSFERÊNCIA ORDENADA DE COLÔNIAS

A técnica da transferência ordenada de colônias isoladas foi utilizada para as linhagens de *E. coli* J111 e *E. coli* BV. Após o crescimento da última cultura, foram obtidas colônias isoladas de cada uma das linhagens como descrito no item 3.28.1.

3.28.3.1. *E. coli* J111

Após o crescimento de cerca de 300 colônias isoladas em placas de Petri contendo meio LA estas foram transferidas, separada e ordenadamente, com auxílio de palitos de madeira esterilizados, para outra placa contendo meio LA (controle) e para uma placa contendo o mesmo meio suplementado com 100 ug/ml de ampicilina. Para cada posição na placa controle havia uma posição correspondente na placa contendo meio suplementado com o antimicrobiano. Desta forma, se não houvesse crescimento numa determinada posição na placa contendo meio com ampicilina, uma amostra sem plasmídeo poderia ser isolada, recuperando-se a mesma a partir da colônia crescendo em posição correspondente na placa contendo meio sem ampicilina. Como controles positivo e negativo para atividade da ampicilina foram utilizadas as linhagens de *E. coli* J111 e *E. coli* C600, respectivamente.

Esta metodologia foi repetida três vezes e o número de

colônias analisadas a cada ensaio foi de, em média, 500.

3.28.3.2. E. coli BV

Após a obtenção de colônias isoladas, em meio LA, como descrito no item 3.28.1., estas foram transferidas, como descrito no item anterior, para placas de Petri contendo ágar sangue. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 horas e após esse período, procurou-se pelo crescimento de colônias não-hemolíticas.

Esta metodologia foi repetida duas vezes e o número de colônias analisadas em cada ensaio foi de, em média, 500.

4. RESULTADOS

4.1. DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE HEMOLISINA

As culturas obtidas a partir das colônias coletadas em Agar MacConkey no ensaio descrito no item 3.6., foram ensaiadas quanto à produção de hemolisina (vide item 3.10).

Nenhuma das culturas provenientes da linhagem de *E. coli* J111 apresentou o caráter hemolítico. Das dez culturas provenientes da linhagem de *E. coli* 55, uma das culturas apresentou o caráter hemolítico, enquanto que, nenhuma das outras nove apresentou esse caráter mesmo após mais de 48 horas de incubação a 37 °C. As linhagens bacterianas, *Aeromonas* sp e *E. coli* C600, utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente, comportaram-se conforme o esperado.

4.2. DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE COLICINA

As culturas obtidas a partir das colônias coletadas em Agar MacConkey, no ensaio descrito no item 3.6., foram ensaiadas quanto à produção de colicinas (vide item 3.11).

Das dez culturas provenientes da linhagem de *E. coli* J111, nenhuma apresentou produção de colicina, enquanto que, todas as dez culturas provenientes da linhagem de *E. coli* 55 apresentaram o caráter colicinogênico. Essas culturas foram utilizadas posteriormente em ensaios de caracterização do tipo de

colicina produzido.

As linhagens de *E. coli* F3 e *E. coli* C600, utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente, comportaram-se conforme o esperado.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DO TIPO DE COLICINA PRODUZIDO

De acordo com os resultados obtidos com as linhagens de *E. coli* apresentando diferentes padrões de sensibilidade e resistência a diferentes tipos de colicinas (vide Tabela 2), a colicina produzida por todas as linhagens ensaiadas foi do tipo V. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 6.

As linhagens de *E. coli* F3 (produtora de colicina V) e *E. coli* C600, utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente, comportaram-se conforme o esperado.

4.4. NÍVEIS DE RESISTÊNCIA A DROGAS ANTIMICROBIANAS

De todas as linhagens bacterianas estudadas, somente a linhagem de *E. coli* J111 apresentou resistência múltipla a drogas antimicrobianas, sendo que as linhagens de *E. coli* BF44 e *E. coli* BV apresentaram sensibilidade a todos os antimicrobianos ensaiados.

Os resultados destes ensaios e daqueles destinados à obtenção de mutantes resistentes a antimicrobianos, encontram-se na Tabela 7.

4.5. DETERMINAÇÃO DO MEIO DE EXPRESSÃO DO ANTÍGENO "K99"

Os meios de cultura considerados mais adequados para a expressão do antígeno "K99" foram os meios Minca e CFA, nos quais foram observadas as reações mais fortes contra o antissoro anti-K99, em comparação com aquelas obtidas com a linhagem de *E. coli* J111 cultivada nos outros meios testados.

Os resultados dos ensaios para a determinação do meio mais adequado para a expressão do antígeno "K99", por parte da linhagem de *E. coli* J111 e dos transconjugantes obtidos para a pesquisa da localização dos genes que o codificam encontram-se na Tabela 8.

4.6. PESQUISA DO DETERMINANTE GENÉTICO DO ANTÍGENO "K99"

Conjugações bacterianas utilizando a linhagem de *E. coli* J111 como doadora do plasmídio pMY111, foram realizadas com o objetivo de se verificar se o determinante genético do antígeno "K99" localizava-se neste plasmídio.

Nos ensaios de conjugação para transferência do plasmídio pMY111, foram utilizadas quatro diferentes linhagens receptoras: *E. coli* C600nx, *E. coli* DH5a nx, *E. coli* BF44 e *E. coli* BV.

Nos quatro casos, o plasmídio foi rapidamente transferido, sendo que, os transconjugantes foram obtidos em alta frequência (não estimada) com apenas 1 hora de conjugação. Os quatro tipos de transconjugantes obtidos (vide Tabela 5)

apresentaram um padrão de resistência a drogas antimicrobianas idêntico à linhagem de *E. coli* J111, sendo o plasmídeo pMY111 visualizado em todos os transconjugantes, em gel de agarose, como uma única banda de DNA plasmidiano em posições relativas idênticas ao plasmídeo presente na linhagem doadora (vide figura 2). Contudo, em ensaios de soroaglutinação contra o anti-soro anti-K99, nos quais a linhagem de *E. coli* J111 apresentava reações positivas, todos os quatro tipos de transconjugantes apresentaram ausência de reação.

Nos casos em que as linhagens receptoras do plasmídeo pMY111 foram *E. coli* BF44 e *E. coli* BV, estes transconjugantes não apresentaram quaisquer alterações em suas características biológicas conhecidas ou estabelecidas neste trabalho.

Para se testar a capacidade das linhagens receptoras de *E. coli* C600 e *E. coli* DH5a de expressar um antígeno de superfície, estas foram conjugadas com a linhagem de *E. coli* B41, portadora de um plasmídeo transportando o determinante genético para a expressão dos fatores de colonização K99 e F41 (vide Tabela 1). Os transconjugantes obtidos apresentaram o mesmo padrão de resistência a antimicrobianos da linhagem doadora e reagiam positivamente em reações de soroaglutinação frente ao anti-soro anti-K99, o que demonstrava apresentarem uma infraestrutura genética adequado para a expressão deste antígeno.

Frente a estes resultados, o restante dos testes de expressão do antígeno "K99" passou a ser feito com antissoro anti-K99 absorvido, sem diluição.

Os transconjugantes portadores do plasmídio pMY111, testados com antissoro sem diluição, apresentaram os mesmos resultados descritos anteriormente.

Nas tentativas de aumentar o nível de expressão do antígeno "K99" nas linhagens de *E. coli* K12 transconjugantes, pela metodologia baseada na de ISAACSON (1980), todos os resultados, em todos os ensaios realizados, para todos os transconjugantes testados, foram negativos. As linhagens de *E. coli* utilizadas como controles positivo e negativos, apresentaram o comportamento esperado.

4.7. HEMAGLUTINAÇÃO EM LÂMINA DE VIDRO

Das dez culturas provenientes da linhagem de *E. coli* J111, nenhuma apresentou reações positivas de hemaglutinação com nenhum dos tipos de hemácias utilizados, após crescimento em diferentes meios de cultura (vide item 3.14.1), quando ensaidas com suspensões de hemácias em presença de D-manose. Quando o ensaio foi feito na ausência de D-manose, as reações de hemaglutinação foram positivas em todos os casos (vide Tabela 9).

Das dez culturas provenientes da linhagem de *E. coli* 55, as nove não-hemolíticas apresentaram reações positivas de hemaglutinação quando ensaidas com hemácias humanas na presença de D-manose. O tipo de meio de cultura utilizado para o crescimento das linhagens (vide item 3.14.1) não influenciou os resultados, que foram idênticos em todos os casos. Essas

linhagens, quando ensaiadas com outros tipos de hemácias, em presença de D-manose, não apresentaram reações de hemaglutinação, a despeito do meio de cultura utilizado para seu crescimento. Quando essas linhagens foram ensaiadas com suspensões de hemácias na ausência de D-manose, os resultados foram positivos em todos os casos. A única cultura hemolítica, quando ensaiada com suspensões de hemácias em presença de D-manose, e na ausência de D-manose, apresentou resultados negativos e positivos, respectivamente, em todos os casos (vide Tabela 9).

As linhagens de *E. coli* utilizadas como controles positivos e negativo, apresentaram o comportamento esperado.

4.8. MICROHEMAGLUTINAÇÃO MANOSE-RESISTENTE (MHMR)

Nos ensaios de MHMR todas as culturas utilizadas, tanto as provenientes do estoque original da *E. coli* J111 como as provenientes do estoque da *E. coli* 55, apresentaram resultados negativos. As linhagens bacterianas utilizadas como controles positivos e negativos comportaram-se conforme o esperado.

4.9. TITULAÇÃO DA CAPACIDADE HEMAGLUTINANTE DO ANTÍGENO EAF44

Reações de hemaglutinação com diferentes diluições de suspensões de culturas das linhagens de *E. coli* BF44 e *E. coli* BF44nx com hemácias humanas ocorreram de forma imediata e intensa desde as suspensões iniciais até as diluições 1/32 dessas

suspensões, tanto quando a lâmina de vidro utilizada foi mantida à temperatura ambiente, como quando foi mantida sobre uma bolsa de gelo.

4.10. PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA STa

Através do método do camundongo recém-nascido (DEAN et alli, 1975), não foi detectada atividade de enterotoxina STa por nenhuma das linhagens ensaiadas. Os resultados médios de 3 experimentos encontram-se na Tabela 10.

4.11. PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA LT-I

Através do método da imunohemólise radial (YANO, et alli, 1982) não foi detectada atividade de enterotoxina LT I por nenhuma das linhagens ensaiadas. As linhagens de E. coli H10407 e E. coli C600, utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente, comportaram-se conforme o esperado.

4.12. PRODUÇÃO DE VEROCITOTOXINA

Os resultados correspondem a dois ensaios, com duas repetições para cada linhagem.

E. coli J111: o sobrenadante da cultura não apresentou efeitos citotóxicos, nos dois ensaios.

E. coli BF44: o sobrenadante da cultura não apresentou

efeitos citotóxicos, nos dois ensaios.

E. coli BF44nx: o sobrenadante da cultura não apresentou efeitos citotóxicos nos dois ensaios.

E. coli BV: o sobrenadante da cultura apresentou efeitos citotóxicos intensos nos dois ensaios.

E. coli BVsm: o sobrenadante da cultura apresentou resultados idênticos aos da linhagem de *E. coli* BV, nos dois ensaios realizados.

4.13. DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE TOXINA LETAL A CAMUNDONGOS

A produção de uma toxina letal a camundongos (TLC) foi constatada em uma das linhagens estudadas, a *E. coli* BV, pela ocorrência de mortalidade nos os animais inoculados com o sobrenadante de sua cultura. A grande maioria das mortes ocorreu num período de 16 horas após o inóculo. Os animais nos quais a fase agônica pode ser observada, apresentaram extrema prostração física e espasmos musculares. Os animais inoculados com sobrenadantes das outras linhagens ensaiadas permaneceram sadios até 5 dias após o inóculo, quando foram sacrificados.

Um dos ensaios foi feito utilizando-se sobrenadantes de linhagens crescidas em MM e em meio TSB. A produção da toxina não foi influenciada pelo crescimento da linhagem produtora em um meio "pobre" (meio mínimo) ou "rico" (TSB), pelo menos, nestes dois casos.

Os resultados de 4 ensaios, e os obtidos com dois meios

de cultura diferentes encontram-se nas Tabelas 11 e 12, respectivamente.

4.14. DETERMINAÇÃO DE PERFIS PLASMIDIANOS

4.14.1. LINHAGEM DE E. coli J111

A análise eletroforética da linhagem de E. coli J111 revelou a presença de um único plasmídio visualizado como uma banda única no gel de agarose a 0,6 % (vide Figura 1). Para se verificar a possível presença de um outro plasmídio de peso molecular aproximado, foi feita uma análise eletroforética utilizando gel de agarose a 0,5 %, o que confirmou a presença de um único plasmídio na linhagem em estudo (dados não apresentados).

O plasmídio presente na linhagem de *Eschericia coli* J111 recebeu a denominação de pMY111.

4.14.2. LINHAGEM DE E. coli BF44

A análise eletroforética da linhagem de E. coli BF44 revelou a presença de quatro bandas de DNA plasmidiano, sendo uma de alto peso molecular e três de baixo peso molecular. (vide Figuras 1 e 2 e Tabela 13).

4.14.3. LINHAGEM DE E. coli BV

A análise eletroforética da linhagem de E. coli BV revelou a presença de quatro bandas de DNA plasmidiano sendo, duas de alto peso molecular e duas de baixo peso molecular (vide Figuras 1 e 2 e Tabela 13).

4.14.4. PRESENCAS MUTUAMENTE EXCLUSIVAS DE DOIS PLASMÍDIOS NAS LINHAGENS DE E. coli BF44 e E. coli BV.

As análises eletroforéticas das linhagens de E. coli BF44 e E. coli BV revelaram que estas duas linhagens apresentam três bandas plasmidianas em posições relativas idênticas, sendo que, a linhagem de E. coli BF44 apresenta um plasmídio de baixo peso molecular, estimado em 2,4 Mdal (vide Figuras 1 e 2, item 4.15. e Tabela 13), de fluorescência intensa no gel, inexistente na linhagem de E. coli BV. Em contrapartida, a linhagem de E. coli BV apresenta um plasmídio de alto peso molecular, estimado em 103,6 Mdal, inexistente na outra linhagem (vide Figuras 1 e 2, item 4.15. e Tabela 13). Este plasmídio é visualizado, no gel, como a banda de mais fraca fluorescência quando comparada com todas as outras.

Os plasmídios presentes em ambas as linhagens bacterianas receberam as seguintes denominações, na ordem do maior peso molecular para o menor: pMY552, pMY553 e pMY554 (vide Tabela 13).

4.15. ESTIMATIVA DOS PESOS MOLECULARES DOS PLASMÍDIOS ESTUDADOS

A regressão linear feita de acordo com a metodologia citada no item 3.20., forneceu a equação da reta que foi utilizada para a estimativa dos pesos moleculares dos plasmídios estudados neste trabalho. Os valores obtidos para os coeficientes linear e angular, respectivamente, foram: 2,582105 e -2,77684. O coeficiente de correlação obtido na regressão linear foi de .9908342.

Os pesos moleculares estimados para cada plasmídio em estudo, obtidos pela aplicação da equação da reta como descrito no item 3.20., encontram-se na Tabela 13.

4.16. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Os resultados dos ensaios de microscopia eletrônica, para a visualização de estruturas fimbrianas nas superfícies celulares das linhagens de *E. coli* estudadas neste trabalho, encontram-se na Tabela 14.

4.17. MOBILIZAÇÃO PLASMIDIANA

Uma vez que as linhagens de *E. coli* BF44 e *E. coli* BV não apresentaram marcadores selecionáveis para a realização de ensaios de conjugação bacteriana, o plasmídio pRP4 (vide Tabela 3) foi transferido para essas duas linhagens, via conjugação

bacteriana, como descrito no item 3.22.

Os transconjugantes obtidos em ambos os casos, expressavam resistência simultânea à ampicilina, canamicina e a tetraciclina, indicando a presença do plasmídio pRP4.

Conjugações recíprocas foram realizadas como descrito no item 3.22.

Tanto no caso da linhagem de *E. coli* BF44, como no da linhagem de *E. coli* BV, para todos os transconjugantes analisados, não foi observado nenhum caso de co-transferência de plasmídios. Portanto, não foi possível a determinação, por este método, de possíveis características biológicas mediadas pelos plasmídios presentes nas linhagens de *E. coli* analisadas.

4.18. DETERMINAÇÃO DE GRUPOS DE INCOMPATIBILIDADE

Para todos os casos de tentativa de determinação de Grupo de Incompatibilidade, como descrito no item 3.25., em nenhum deles foi obtida a eliminação de qualquer um dos plasmídios residentes nas três linhagens de *E. coli* ensaiadas.

Os resultados obtidos não permitiram, portanto, nem a determinação dos Grupos de Incompatibilidade aos quais pertencem os plasmídios presentes nas linhagens bacterianas ensaiadas, nem o estabelecimento das relações entre esses plasmídios e as características biológicas conhecidas daquelas bactérias.

4.19. MUTAGÊNESE MEDIADA POR TRANSPOSONS

A metodologia para mutagênese do DNA cromossômico ou do DNA dos plasmídios presentes nas linhagens de *E. coli* BF44 e *E. coli* BV não pode ser completada por não terem sido obtidos transconjugantes das linhagens ensaiadas portando ou o plasmídio pMR5 ou o plasmídio pRT733. Esses resultados foram obtidos após várias tentativas de transferência desses plasmídios.

4.20. TRANSFORMAÇÕES BACTERIANAS

As tentativas para a co-transferência dos plasmídios pMY551 da linhagem de *E. coli* BV e do plasmídio pMY555 da linhagem de *E. coli* BF44 para uma linhagem de *E. coli* DH5a apresentaram resultados negativos, não tendo sido obtido nenhum único transformante, em ambos os casos.

As tentativas de se transferir, via transformação bacteriana, o plasmídio pMR5 para as linhagens de *E. coli* BF44 e *E. coli* BV, também apresentaram resultados negativos.

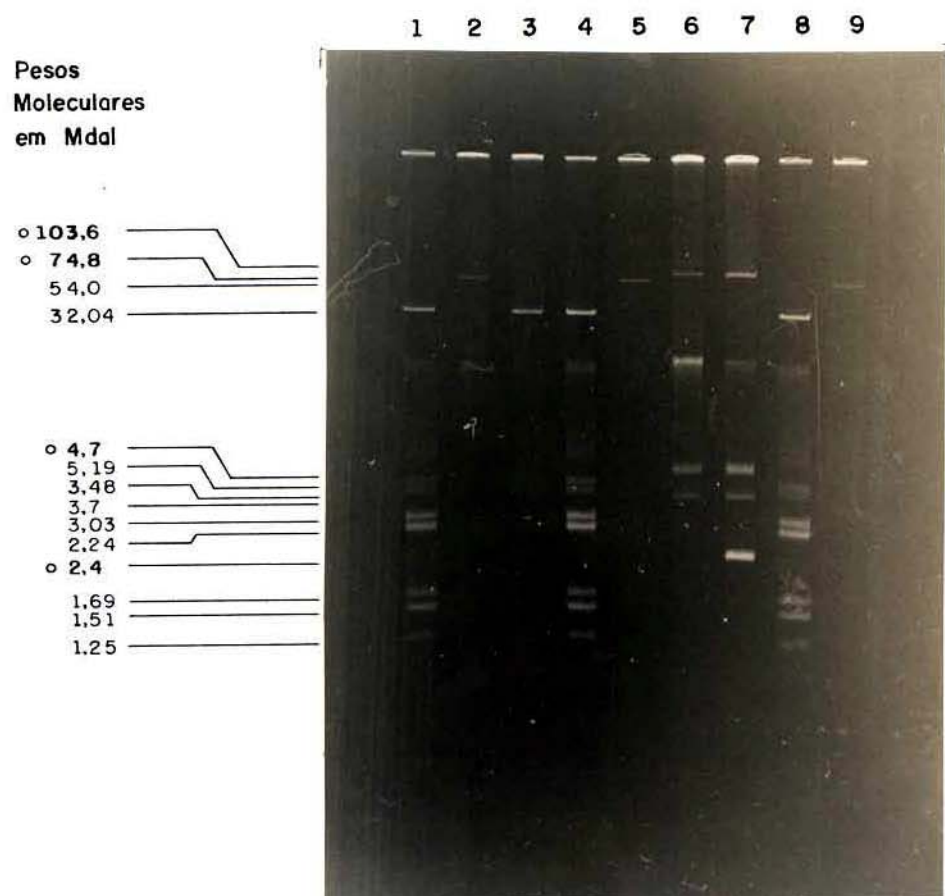
O plasmídio pBR322 usado como controle do experimento foi transferido com sucesso, em alta frequência (não estimada), para as linhagens bacterianas ensaiadas, demonstrando a eficácia da metodologia empregada nos ensaios de transformação.

4.21. ELIMINAÇÃO PLASMIDIANA

As várias tentativas de se eliminar os plasmídios pMY111, da linhagem de E. coli J111 e o plasmídio pMY551, presente na linhagem de E. coli BV, apresentaram resultados negativos.

Nestes casos, ou os métodos utilizados não foram eficientes ou os plasmídios apresentam alta estabilidade nas células bacterianas.

FIGURA 1. PERFIS PLASMIDIANOS DAS LINHAGENS BACTERIANAS ESTUDADAS



LEGENDA

Canaleta

1,4 e 8	<i>E. coli</i>	V517	(32,04 - 5,19 - 3,48 - 3,03 - 2,24 - 1,69 - 1,51 - 1,25)
2,5 e 9	<i>E. coli</i>	P307	(5,4)
3	<i>E. coli</i>	J111	(32)
6	<i>E. coli</i>	BV	(103,6 - 74,8 - 4,7 - 3,7)
7	<i>E. coli</i>	BF44	(74,8 - 4,7 - 3,7 - 2,4)

(○) Valores estimados pelo método de MEYERS *et alli*, (1976).

FIGURA 2. PRESENÇA DO PLASMÍDIO pMY111 NAS LINHAGENS DE *E. coli* BF44 E *E. coli* BV



LEGENDA

Canaleta

1 e 6	<i>E. coli</i>	J111
2	<i>E. coli</i>	BV (pMY111)
3	<i>E. coli</i>	BV
4	<i>E. coli</i>	BF 44
5	<i>E. coli</i>	BF 44 (pMY111)

TABELA 1. LINHAGENS BACTERIANAS

Linhagem	Características relevantes	Origem
<i>E. coli</i> J111	"K99"+, ST-, LT-, VT-, Col-, Ap, Sm, Tc (p)	DMI
<i>E. coli</i> 55	EAF44+, ST-, LT-, VT+, ColV	DMI
<i>E. coli</i> BF44	EAF44+, ST-, LT-, VT-, ColV	DMI
<i>E. coli</i> BV	EAF44-, ST-, LT-, VT+, ColV	
<i>E. coli</i> BF44nx	EAF44+, ST-, LT-, VT-, ColV, Nx (c)	
<i>E. coli</i> BVnx	EAF44-, ST-, LT-, VT+, ColV, Nx (c)	
<i>E. coli</i> BVsm	EAF44-, ST-, LT-, VT+, ColV, Sm (c)	
<i>E. coli</i> C600	lac, leu, thi, thr (c)	APPLEYARD, 1954
<i>E. coli</i> C600nx	lac, leu, thi, thr, Sm	
<i>E. coli</i> DH5a	lac, thi, recA (c)	HANAHAM, 1983
<i>E. coli</i> DH5anx	lac, thi, recA, Nx (t)	
<i>E. coli</i> HB101 (pMR5)	lac, leu, pro, thi, Amp (p), Km, Tc (t) (p)	ROBINSON et al., 1980
<i>E. coli</i> SM101ambdapiR	TnphoA, Amp (p), Km (t)	TAYLOR, 1983
<i>E. coli</i> F3	ColV	DMI
<i>E. coli</i> B41	K99+, F41+, ST+	MORRIS et al., 1978
<i>E. coli</i> H10407	CFA/I+, ST+, LT+	EVANS et al., 1975
<i>E. coli</i> H30	VT+	KONOWALCHUK et al., 1977
<i>E. coli</i> TR50		DMI
<i>Aeromonas</i> sp	Hly+	DMI

(c) genes cromossômicos, (p) genes plasmidianos, (t) genes em transposon

DMI: Depto. Microbiologia e Imunologia/UNICAMP

5. DISCUSSÃO

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de se determinar as localizações dos determinantes genéticos de dois fatores de colonização produzidos por duas diferentes linhagens de *E. coli* não-enterotoxigênicas, isoladas de bezerros com diarreia neonatal, os antígenos "K99" e EAF44, e a dos genes codificando as produções de verocitotoxina (VT), hemolisina e toxina letal a camundongos (TLC), produzidas por uma linhagem de *E. coli* verocitotoxigênica (VTEC).

Inicialmente, a expressão do antígeno "K99" foi ensaiada após cultivo da linhagem de *Escherichia coli* J111 em diferentes meios de cultura com dois objetivos: (1) a determinação do meio mais adequado para a expressão deste antígeno e (2) comparar os resultados com a literatura a respeito da expressão do antígeno K99.

Vários autores têm relatado a influência da composição do meio de cultura sobre a expressão do antígeno K99. O nível da expressão deste antígeno é influenciado pelo meio de cultivo utilizado. Em meios complexos, como o caldo nutriente, a síntese do antígeno K99 é fortemente reduzida e geralmente não detectável por soroaglutinação em lâmina (de GRAAF et alli, 1980). A expressão deste antígeno é fortemente inibida pela glicose (GUINÉE et alli, 1976) e pela alanina (de GRAAF et alli, 1980).

Uma linhagem de *E. coli* B41, produtora do antígeno K99, utilizada para comparação dos resultados obtidos com linhagem de

E. coli J111, expressou o antígeno K99 tanto em meios como o Minca (GUINÉE et alli, 1977) e o CFA (EVANS et alli, 1975), como em meio complexos como o LA e o TSA, porém de maneira fraca. Linhagens transconjugantes de *E. coli* C600 e *E. coli* DH5a transportando o plasmídio K99+ da *E. coli* B41, apresentaram, aparentemente, os mesmos níveis de expressão do antígeno K99, inclusive no meio LA, o mesmo não acontecendo no caso do meio TSB, onde a linhagem de *E. coli* B41 expressava esse antígeno, embora fracamente quando comparado com a expressão nos meios Minca e CFA.

A expressão do antígeno "K99" só se deu no meios Minca e CFA e em reações bem mais fracas com o antissoro anti-K99, quando comparadas com as das linhagens de *E. coli* B41 e seus transconjugantes, *E. coli* C600 (B41) e *E. coli* DH5a (B41).

Este fato pode ter várias explicações: ou se trata de um sistema de regulação de expressão diverso daquele do antígeno K99 ou pode se tratar de uma modificação do nível de expressão por influência do hospedeiro. A linhagem de *E. coli* B41 pertence ao sorogrupo O101 e a linhagem de *E. coli* J111 pertence ao O42 e o sorogrupo parece ter influência no nível de expressão de um determinado antígeno de superfície.

deGRAAF et alli (1980a; 1980b) observaram que, em linhagens selvagens de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) produtoras do antígeno K99, aquelas pertencentes ao sorogrupo O101 expressam esse antígeno em níveis maiores que as pertencentes aos sorogrupos O8, O9, O20.

A linhagem de *E. coli* J111 é portadora de um único plasmídeo (Figura 1), denominado pMY111, que codifica resistência à ampicilina, estreptomicina e à tetraciclina, cujo peso molecular foi estimado em 32 Mdal pelo método de MEYERS et alli (1976). Com o objetivo de se determinar a localização do determinante genético do antígeno "K99" este plasmídeo foi transferido, via conjugação bacteriana, para duas diferentes linhagens de *E. coli* K12, a C600 e a DH5a. Os três marcadores para resistência a drogas antimicrobianas foram transferidos simultaneamente para os transconjugantes obtidos, expressando-se em níveis idênticos aos encontrados na *E. coli* J111.

Uma vez que todos os transconjugantes, *E. coli* C600 (B41) e *E. coli* DH5a (B41), apresentaram resultados negativos em reações de soroaglutinação contra antissoro anti-K99, foram formuladas duas hipóteses: ou o determinante genético do antígeno "K99" não se localizava no plasmídeo e sim no cromossomo bacteriano, ou o nível de expressão deste antígeno nas células de *E. coli* K12 era tão baixo que não podia ser detectado em reações de soroaglutinação, se tratando, possivelmente, de influência dos hospedeiros, como o suposto acima.

Na realidade, vários autores têm observado drásticas reduções nos níveis de expressão de genes plasmidianos originários de bactérias selvagens quando expressos em linhagens de *E. coli* K12.

deGRAAF et alli (1980a; 1980b) observaram que em linhagens de *E. coli* K12 portadoras do plasmídeo mediando a

síntese do antígeno K99, ocorre uma redução nos níveis de expressão dessa fímbria em pelo menos uma ordem de magnitude (podendo ser de 2 a 6 ordens de magnitude) quando comparadas aos níveis de expressão das bactérias selvagens doadoras do plasmídeo. vanEMBDEN et alli (1980), realizando estudos de clonagem e expressão do operon do antígeno K99, verificaram que, quando o plasmídeo de ocorrência natural pRI1991, que transporta os genes que codificam a expressão daquele antígeno em linhagens selvagens de *E. coli* enterotoxigênicas de origem animal (SO et alli, 1976), era transferido de seu hospedeiro natural, a *E. coli* B41, para a *E. coli* K12 C600, o nível de expressão do antígeno K99 era reduzido dezesseis vezes quando comparado com o nível de expressão do hospedeiro original. Contrastantemente, esses autores observaram que o nível de produção do antígeno K99, por diferentes plasmídios recombinantes, em *E. coli* C600 era de 16 a 32 vezes maior que aquele apresentado pelo plasmídeo pRI1991 original em *E. coli* B41. Os autores explicam esse fenômeno pelo fato do peso molecular do plasmídeo pRI1991 ser de 57 Mdal e que plasmídios deste tamanho, usualmente se encontram em uma ou duas cópias por célula bacteriana, enquanto que, os veículos de clonagem por eles utilizados, de baixo peso molecular, são plasmídios multicópia. Portanto, naqueles casos, os altos níveis de produção do antígeno K99 é um efeito de "dose gênica". Quando essas linhagens transformantes de *E. coli* C600 eram examinados ao microscópio eletrônico, fímbrias K99 podiam ser visualizadas em sua superfície. Esses autores tampouco encontraram quaisquer

alterações das propriedades morfológicas, imunológicas ou biológicas no antígeno K99 produzido por aqueles transformantes.

Existe uma linhagem selvagem de ETEC, denominada *E. coli* H1242 que produz cerca de 16 vezes mais a fímbria K99, codificada pelo plasmídio pRI1991, que o faz sua hospedeira original, a *E. coli* B41 (deGRAAF et alli, 1980a; 1980b). Quando vanEMBDEN et alli (1980) transferiram para essa linhagem, um plasmídio recombinante que, em *E. coli* C600, expressava o antígeno K99 na mesma ordem de magnitude encontrada na *E. coli* B41, a produção desse antígeno era aumentada significativamente em 6 ordens de magnitude. Estes fatos tornam claro que fatores particulares do hospedeiro, modificam o nível de expressão de um gene, logo, de todo um operon.

Contudo, mesmo nos casos de redução drástica no nível de expressão, o antígeno K99 era sempre detectável, inclusive por métodos convencionais como soroaglutinação, hemaglutinação e até mesmo em testes de adesão.

Um fato que merece atenção é que de GRAAF et alli (1980a) em estudos de purificação e caracterização do antígeno K99, utilizaram duas linhagens de *E. coli* K12, as linhagens F57 e 1474, transportando o plasmídio pRI1991, ao invés da própria *E. coli* B41.

A opção pela *E. coli* K12 é devido ao fato de que o isolamento do antígeno K99 a partir da maioria das linhagens selvagens é prejudicado pela presença de excessivas quantidades de antígenos capsulares (antígenos O) produzidos por essas

linhagens (ISAACSON, 1980).

A *E. coli* C600 foi utilizada por deGRAAF et alli (1984) em estudos da organização do operon K99, e diferentes linhagens de *E. coli* K12, entre elas a C600, foram utilizadas em estudos de identificação, isolamento, clonagem, expressão e organização do operon do antígeno K88 (MOOI e deGRAAF, 1979), K88ab (MOOI et alli, 1979; MOOI et alli, 1981) e K88ac (SHIPLEY et alli, 1981) e em estudos da organização do operon e montagem da fímbria K88ac (DOUGAN et alli, 1981). SCALETSKY et alli (1983) obtiveram a expressão da enterotoxina LT em duas linhagens *E. coli* K12, a C600 e a MA335, que apresnetam genótipos diferentes.

KARCH et alli (1987), utilizando uma linhagem de *E. coli* K12, demonstraram que um plasmídio residente em uma linhagem de *E. coli* enterohemorrágica do sorogrupo O157:H7, mediava a síntese de uma fímbria que promovia adesão em células intestinais em cultura. A linhagem de *E. coli* K12, transportando esse plasmídio, não só expressava a fímbria, como aderiu a células intestinais em cultura.

Linhagens de *E. coli* K12 têm sido utilizadas, até mesmo, como vacinas vivas experimentais. Uma linhagem de *E. coli* HB101 transportando um plasmídio recombinante codificando o fator de adesão F41, expressava normalmente esse antígeno, in vivo, conferindo inclusive imunogênese protetora (RUNNELS et alli, 1987).

Os dados encontrados na literatura demonstram a eficácia de linhagens de *E. coli* K12, entre estas a C600 e a DH5a, em

expressar genes plasmidianos exógenos: o gene da enzima antranilato sintetase de *Rhizobium meliloti* foi clonado e expresso em *E. coli* K12 deficiente para a síntese de triptofano (BAE et alli, 1989) permitindo que a bactéria crescesse na ausência daquele aminoácido no meio. O gene cromossômico, conferindo resistência ao bicloreto de mercúrio, de *Thiobacillus ferrooxidans*, foi clonado e expresso em *E. coli* DH5a, tornando essa bactéria resistente àquela droga, num nível dez vezes maior que o original (SHIRATORI et alli, 1989). FAIRWHETER et alli (1987) obtiveram a expressão, em *E. coli* K12, de fragmentos não tóxicos da toxina tetânica, codificados por um fragmento de DNA de *Clostridium tetani* clonado em um plasmídio recombinante e outros autores obtiveram a expressão das subunidades S1 e S2 da toxina pertússica (LOCHT et alli, 1987). A *E. coli* K12 é inclusive capaz de expressar um antígeno somático O diferente, como relatado por RYLEY et alli (1987). Esses autores descreveram pela primeira vez a existência de um plasmídio residente numa linhagem de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) que media aderência localizada a enterócitos, resistência múltipla a antimicrobianos e a síntese do antígeno somático O111 dessa bactéria, e, quando esse plasmídio era transferido por conjugação para uma linhagem de *E. coli* HB101, esta expressou todas as características controladas pelo plasmídio, inclusive o antígeno somático O111.

O fato da expressão diferencial de genes plasmidianos, dependente do hospedeiro, entre linhagens de *E. coli* selvagens, aliado ao fato de que, em linhagens de *E. coli* K12, ao menos em

se tratando de plasmídios naturais, os níveis de expressão de genes plasmidiano é bastante reduzido - conquanto que detectáveis por métodos convencionais - levou à hipótese de que, ou o determinante genético do antígeno "K99" estava localizado no cromossomo bacteriano ou, nos transconjugantes transportando o plasmídio pMY111 sua expressão estaria de tal modo reduzida, a ponto de não ser detectável pela metodologia empregada. A partir dessa premissa, foi então, utilizado um método baseado no de ISAACSON (1980), numa tentativa do aumento da expressão do operon do antígeno "K99", e, conseqüentemente, aumento da detectabilidade deste antígeno. Contudo, todas as tentativas foram infrutíferas, não se detectando nunca a presença do antígeno nos transconjugantes.

Com base no fato de que um gene pode ter seu nível de expressão aumentado numa linhagem de *E. coli* selvagem (vanEMBDEN et alli, 1980), como citado anteriormente, o plasmídio pMY111 foi transferido para duas linhagens de *E. coli* selvagens de origem bovina, derivadas da linhagem de *E. coli* verocitotoxigênica 55, (VTEC), que expressa o fator de adesão EAF44 (YANO, 1986; YANO et alli, 1986b.; YANO et alli, 1988). Uma destas linhagens, denominada *E. coli* BF44, é produtora do antígeno EAF44 mas não é produtora da verocitotoxina (VT), e a outra, denominada *E. coli* BV, é produtora de verocitotoxina mas, não expressa o antígeno EAF44, como nenhum outro fator de colonização.

Em ambos os casos, os resultados foram os mesmos obtidos com as linhagens de *E. coli* C600 e *E. coli* DH5a: os

transconjugantes adquiriam resistência simultânea à ampicilina, à estreptomicina e à tetraciclina mas, reagiam negativamente em reações de soroadglutinação contra o antissoro anti-K99. Além disso, esses transconjugantes não apresentaram quaisquer alterações em suas características biológicas conhecidas ou determinadas neste trabalho, as quais serão discutidas mais abaixo.

A análise eletroforética dos quatro tipos de transconjugantes, revelou o plasmídio pMY111, em estado autônomo, visualizado como uma banda única no gel, exatamente na mesma posição relativa ao plasmídio presente na linhagem de *E. coli* J111, sem nenhuma diferença detectável de intensidade de fluorescência em relação àquela do plasmídio residente na bactéria parental.

Estudos de microscopia eletrônica revelaram a presença de estruturas fimbrianas na superfície da *E. coli* J111 e ausência destas estruturas na superfície das células da linhagem de *E. coli* BV, e portanto, esta linhagem e o transconjugante *E. coli* BV (pMY111) foram utilizados em ensaios de microscopia eletrônica, na pesquisa da localização genética dos genes que codificam o antígeno "K99".

As fotomicrografias eletrônicas da *E. coli* BV e da mesma como hospedeira do plasmídio pMY111, revelaram a ausência total de estruturas fimbrianas em suas superfícies, enquanto que a *E. coli* J111, apresentava as estruturas fimbrianas anteriormente observadas.

Esses fatos sugerem que o determinante genético do antígeno "K99" está localizado no cromossomo bacteriano, uma vez que mesmo linhagens selvagens de *E. coli* isoladas de bovino com diarreia, transportando o plasmídeo pMY111, não expressaram aquele antígeno, e, a diferença quanto aos sorogrupos a que pertencem as linhagens selvagens empregadas, por si só não explicaria uma depressão tão drástica na produção do antígeno.

Uma confirmação para esta hipótese seria obtida com a eliminação do plasmídeo pMY111 da célula hospedeira; com a célula livre do plasmídeo reagindo positivamente contra o antissoro anti-K99.

Tentativas de eliminação do plasmídeo pMY111 pelo método de TOMOEDA et alli (1968) e através da transferência, para a linhagem de *E. coli* J111, de plasmídios pertencentes a Grupos de Incompatibilidades conhecidos (BRODA, 1979), foram infrutíferas. O fato do plasmídeo pMY111 ser portador de genes para resistência a três diferentes antimicrobianos simultaneamente, prejudicou grandemente o estudo da determinação do Grupo de Incompatibilidade ao qual o plasmídeo pertence uma vez que os plasmídios disponíveis para esse fim conferiam resistência aos mesmos antimicrobianos que o plasmídeo pMY111, com exceção de quatro deles: pRF4, p40a, pR391 e pR471a, pertencentes aos Grupos P, C, J e L, respectivamente. Estes plasmídios foram mantidos, separadamente, na linhagem de *E. coli* J111, sob pressão seletiva, por várias gerações mas, não ocorreu a eliminação do plasmídeo pMY111. Os resultados apenas demonstram que este plasmídeo não

pertence a nenhum daqueles quatro Grupos de Incompatibilidade e que, provavelmente têm alta estabilidade na célula hospedeira.

Para se tentar "curar" a *E. coli* J111 de seu plasmídio, foi escolhido o método de TOMOEDA et alli (1968) pelo fato de que os outros métodos existentes baseiam-se na ação de agentes altamente mutagênicos como corantes de acridinas e brometo de etídio, e, caso fosse obtida a cura do plasmídio e o antígeno "K99" não mais fosse detectado na nova população de *E. coli* J111 curada, ainda assim não se poderia afirmar que este plasmídio é o responsável pela expressão daquele antígeno, uma vez que poderia tratar-se de uma mutação impedindo sua expressão, a menos que um número significativo de clones "curados" fosse isolado num ou mais experimentos e com o mesmo fenótipo.

TOMOEDA et alli (1968) relatam casos de cura em frequências muito altas em todos os casos por eles examinados. Contudo, esses autores trabalharam com linhagens de *E. coli* K12 e não com linhagens selvagens, o que poderia, especulativamente, responder pelos resultados. Ainda esses autores, relatam que a presença de um detergente aniônico como o dodecil sulfato de sódio (SDS) no meio de cultura líquido por eles utilizado, evita o desenvolvimento dos pili sexuais que promovem a conjugação bacteriana. Portanto, partindo dessa premissa, a linhagem de *E. coli* J111 foi subcultivada por várias gerações seguidas em meio líquido SDS. A intenção era aumentar o número de células que teriam perdido seu plasmídio durante o crescimento, sendo que a presença de SDS no meio, impediria sua reinfecção pelas células

portadoras do plasmídio. Células bacterianas que tivessem perdido um plasmídio durante seu crescimento em meio de cultura, provavelmente seriam reinfectedas por outras, portadoras de plasmídios, o que poderia responder pela frequência muito baixa de células curadas em ensaios com esta finalidade.

O resultados obtidos, não permitiram a obtenção de uma prova definitiva de que a expressão do antígeno "K99" seja mediada por genes cromossômicos, mas estes podem ser interpretados como fortes evidências da localização cromossômica do determinante genético do antígeno "K99", ao contrário do que ocorre com o operon do antígeno K99 que localiza-se em um plasmídio (SMITH & LINGGOOD, 1972; SO et alli, 1976). O plasmídio pMYiii seria então, simplesmente, um plasmídio R típico sem nenhuma outra função aparente na célula bacteriana além de conferir resistência múltipla a drogas antimicrobianas.

Uma vez que o antígeno "K99" aparentemente apresenta propriedades biológicas e genéticas distintas (se for realmente o caso) daquelas do antígeno K99, é possível que esse antígeno seja um novo fator de colonização de *E. coli*.

Um outro objetivo deste trabalho foi o de descrever a genética do fator de aderência fimbriano EAF44, presente na linhagem de *E. coli* verocitotoxigenica (VTEC) 55, isolada de bezerro com diarreia neonatal e descrita por YANO (1986) e a localização dos genes codificando a produção da verocitotoxina (VT) produzida por esta linhagem (YANO et alli, 1988a).

A partir do estoque original da linhagem de *E. coli* 55,

foram recuperados dois tipos de linhagens: (1) uma que apresentava produção de hemolisina, de verocitotoxina (VT) e de uma toxina letal a camundongos adultos (TLC), e (2) outra, que não apresentava esses fenótipos. Através de reações de hemaglutinação manose-resistente com hemácias humanas (YANO, 1986; YANO et alli, 1988) foi constatado que as linhagens verocitotoxigênicas (VTEC) não expressavam o antígeno EAF44 enquanto que, aquelas que expressavam esse antígeno não apresentavam produção de hemolisina, VT ou TLC. Foi também observado que as linhagens de ambos os tipos apresentavam a produção de colicina V.

Análises eletroforéticas demonstraram que os dois tipos de linhagens apresentavam um perfil plasmidiano idêntico, com excessão das presenças, mutuamente exclusivas, de dois plasmídios: um de alto peso molecular, estimado em 103,6 Mdal (denominado pMY551), presente na linhagem verocitotoxigênica (VTEC) e um de baixo peso molecular (denominado pMY555), estimado em 2,4 Mdal, presente na linhagem que expressava o antígeno EAF44.

Outras três bandas de DNA plasmidiano, visualizadas no gel de agarose, são comuns às duas diferentes linhagens. Os pesos moleculares desses plasmídios foram estimados em 74,7, 4,6 e 3,7 Mdal. Um desses plasmídios comuns às duas linhagens pode estar relacionado com a produção da colicina V.

Fotomicrografias eletrônicas de ambas as linhagens crescidas em meio CFA a 37 C, por 18 horas, demonstrou a presença de fímbrias na superfície celular da linhagem EAF44+ e ausência

total de estruturas fimbrianas na linhagem VTEC.

Ambas as linhagens, da mesma forma que a linhagem de *E. coli* 55, não produzem enterotoxinas termo-estáveis (ST) ou termo-lábeis (LT) e apresentam sensibilidade a drogas antimicrobianas comumente utilizadas.

Esses resultados preliminares sugerem que tanto a linhagem VTEC denominada *E. coli* BV, quanto a linhagem EAF44+, denominada *E. coli* BF44, são derivadas da linhagem original de *E. coli* 55 (que não foi recuperada) e que os determinantes genéticos para a produção de VT e para a expressão do antígeno EAF44 localizam-se nos plasmídios pMY551 e pMY555, respectivamente.

Estas hipóteses baseam-se nos fatos de que na ausência do plasmídio pMY551, a VT, a hemolisina e a TLC não são produzidas, ou seja, sua expressão é, pelo menos, dependente da presença desse plasmídio.

A VT, a hemolisina e a TLC produzidas pela linhagem de *E. coli* BV parecem ser manifestações da mesma entidade bioquímica, uma vez que essas três características aparentemente ocorrem associadas em linhagens de *E. coli* produtoras de VT (O'BRIEN e LAVECK, 1983; O'BRIEN et alii, 1982; O'BRIEN et alii, 1983; SILVA et alii, 1983). deRYCKE et alii (1987) verificaram a ocorrência de um efeito letal a camundongos mediado por verocitoxinas produzidas por linhagens não-enterotoxigênicas (NETEC) de *E. coli* isoladas de bovino com diarreia. A produção de VT por linhagens de *E. coli* tem sido relatada por vários autores

como sendo mediada por bacteriófagos (HUANG et alli, 1987; LEVINE et alli, 1987; SMITH et alli, 1983), contudo, no estudo da linhagem de *E. coli* 55, os objetivos principais foram a determinação das localizações dos genes (cromossômica ou plasmidiana) mediando as sínteses da fímbria EAF44 e da VT, portanto, não foram realizados ensaios de conversão fágica para se verificar se, neste caso, a síntese dessa citotoxina era mediada por um bacteriófago.

Quinze outros isolados hemolíticos, obtidos a partir da cultura original da linhagem de *E. coli* 55, foram ensaiados quanto à expressão do antígeno EAF44 e os resultados foram negativos. A análise eletroforética (dados não apresentados) desses isolados, em gel de agarose, revelou que todos eram portadores do plasmídio pMY551, sendo que, o plasmídio pMY555 estava ausente em todos os casos. Este fato poderia ser um suporte para a hipótese de que a produção de verocitotoxina (VT) seria mediada pelo plasmídio pMY551, e que a expressão do antígeno EAF44 seria mediada pelo plasmídio pMY555, uma vez que, a fenótipo verocitotoxigênico está associado ao fenótipo hemolítico, ocorrendo quando da presença do plasmídio pMY551, e, pelo fato de que, na ausência do plasmídio pMY555, não ocorre a expressão do antígeno EAF44.

Apesar da evidência de que o antígeno EAF44 esteja codificado no plasmídio pMY555, o baixo peso molecular deste plasmídio por si só questiona o fato. Quando os operons das fímbrias K88ab, K99 e F41 foram descritos, foi visto que as somas

dos pesos moleculares dos peptídios envolvidos na expressão destes antígenos era de cerca de 220 (MOOI et alli, 1981), 230 (deGRAAF et alli, 1984) e 185 Kdal (ANDERSON & MOSELEY, 1988), respectivamente, sendo que, só o DNA necessário para codificar tais polipeptídios, em cada caso, corresponderia a cerca de 7.400 pares de bases, ou seja, cerca do dobro do tamanho do plasmídio pMY555, que estimativamente pesando cerca de 2,4 Kdal, conteria aproximadamente 3.840 pares de bases. Mesmo que este plasmídio não seja conjugativo, deve conter regiões de DNA comprometidas com sua replicação, ocupando um espaço, neste caso desconhecido, uma vez que não se conhece sua organização molecular.

A despeito do baixo peso molecular do plasmídio pMY551, pode-se supor que, pelo menos, a expressão do antígeno EAF44 dependa da presença desse plasmídio, uma vez que na sua ausência o antígeno EAF44 não é produzido. Neste caso, duas hipóteses são cabíveis: (1) que o plasmídios pMY555 seja o mediador da síntese do antígeno EAF44 ou (2) que os genes estruturais do antígeno EAF44 estejam ou em um outro plasmídio maior ou no cromossomo bacteriano, e que os sinais regulatórios para a síntese deste antígeno estejam presentes no plasmídio pMY555.

No primeiro caso, deveria-se supor que a organização do operon da fímbria EAF44 seria diferente e mais simples que a dos casos já conhecidos, ou que, pelo menos, os peptídios envolvidos fossem bem menores ou em número reduzido.

O fato de um plasmídio conter o gene regulador para a síntese de componentes fimbrianos foi relatada por CARON et alli

(1989) que verificaram que os genes estruturais para a síntese dos componentes CS1 e CS2 da fímbria CFA/II (SMITH, 1982) de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), localizavam-se no cromossomo bacteriano ao invés de estarem localizados em um plasmídio como suposto anteriormente. Esses autores relataram que o plasmídio que se supunha transportar os genes estruturais para os antígenos CS1 e CS2, transportava na realidade o gene regulador da síntese destes antígenos, cujo produto gênico era homólogo ao produto do gene regulador positivo do operon da arabinose, *araC*.

O fato de que ambas as linhagens de *E. coli* BV e BF44 serem portadoras de plasmídios comuns, permite supor (ao menos especulativamente) que os genes estruturais para a síntese da fímbria EAF44 poderiam estar presentes nestes plasmídios e os sinais regulatórios para a síntese do antígeno estejam presentes no plasmídio pMY555.

Uma vez que ambas as linhagens de *E. coli* BV e BF44 não apresentavam marcadores para resistência a antimicrobianos selecionáveis em ensaios de conjugação bacteriana, um plasmídio de amplo espectro de hospedeiro, o pRP4 (DATTA & HEDGES, 1971), foi transferido, via conjugação bacteriana para ambas as linhagens. O objetivo foi utilizar o plasmídio pRP4 como marcador selecionável em cruzamentos recíprocos para auto-transferência ou mobilização dos plasmídios pMY551 e pMY555 das linhagens portadoras para aquelas onde estavam ausentes, visando uma possível confirmação de uma das hipóteses citadas acima. Os resultados foram negativos, em ambos os casos, sugerem que

aqueles dois plasmídios podem não ser conjugativos ou não mobilizáveis, uma vez que o plasmídio pRP4 é um eficiente mobilizador de genes plasmidianos e cromossômicos (DATTA et alli, 1972; OLSEN & SHIPLEY, 1973), tendo sido utilizado com sucesso inclusive para a mobilização de genes cromossômicos de *Rhizobium meliloti* e *R. leguminosarum* para *E. coli* em estudos da genética destas espécies bacterianas (BERINGER et alli, 1978; MEADE & SIGNER, 1977).

Numa segunda abordagem, plasmídios pertencentes a Grupos de Incompatibilidade conhecidos foram transferidos, via conjugação bacteriana, para ambas as linhagens com dupla finalidade: (1) tentar determinar a que Grupos de Incompatibilidade pertencem seus plasmídios, e (2), eliminando-se um ou mais plasmídios, observar se algum fenótipo desaparece, relacionando-o com o plasmídio eliminado.

Vários desses plasmídios foram transferidos para as duas diferentes linhagens de *E. coli*, sem contudo, terem sido alcançados quaisquer desses objetivos. A presença desses plasmídios em culturas crescidas e mantidas na ausência de pressão seletiva, ou sob pressão de seleção sobre plasmídios exógenos após sucessivos repiques, demonstra a alta estabilidade dos plasmídios residentes nessa linhagens.

Tentativas de se transferir os plasmídios pMY551 e pMY555 para uma linhagem de *E. coli* DH5a, via transformação bacteriana, apresentaram resultados negativos. Os motivos para esses resultados são desconhecidos, uma vez que, o plasmídio pBR322

(BOLIVAR et alli, 1977) transformava essa linhagem com alta eficiência.

Tentativas de se eliminar quaisquer dos plasmídios das linhagens de *E. coli* BV e BF44 através de cura plasmidiana pelo método de TOMOEDA et alli (1968) também levaram a resultados negativos.

Numa outra abordagem, foram feitas tentativas de transferência de dois diferentes plasmídios portadores de transposons portadores de genes para resistência a drogas antimicrobianas para as linhagens de *E. coli* BV e BF44, via conjugação e transformação bacteriana, com a finalidade de mutagenizar os plasmídios das linhagens estudadas, inserindo-lhes marcadores de resistência a antimicrobianos para torna-los selecionáveis em ensaios de conjugação ou transformação bacteriana. Contudo, não foram sequer obtidos transconjugantes nem transformantes, em ambos os casos, em várias tentativas. A possibilidade de um plasmídio infectar uma célula bacteriana pode depender do seu sistema de restrição ou da natureza de algum plasmídio residente nessa célula. Se o sistema de restrição não reconhecer o novo plasmídio, este será destruído. Se um plasmídio residente é incompatível com o novo plasmídio, a entrada pode ser evitada pelo fenômeno da exclusão de superfície (BRODA, 1979). Tanto um caso como outro pode se aplicar aos dois plasmídios portadores de transposons utilizados, mas, é digno de nota o fato do plasmídio pMR5 ser derivado do plasmídio pRP1, virtualmente indistinguível do plasmídio pRP4 (DATTA & HEDGES, 1971), o qual

não só se auto-transfere para ambas as linhagens como se mantém de maneira estável, ao menos sob pressão seletiva. Uma outra possibilidade que poderia ser aventada seria o fato de que alguns sorogrupos de *E. coli* são mais receptivos a plasmídios do que outros (BRADLEY, 1989). Esse autor verificou a frequência de conjugação de diferentes plasmídios infectando linhagens de *E. coli* pertencentes a diferentes sorogrupos e verificou que linhagens pertencentes ao sorogrupo O125 (o mesmo ao qual pertencem as linhagens derivadas da *E. coli* 55) eram pouco receptivas a plasmídios, pelo menos, àqueles utilizados pelo autor. Apesar de não terem sido feitos controles das frequências de conjugação, para alguns plasmídios transferidos para ambas as linhagens derivadas da *E. coli* 55 (*E. coli* BF44 e *E. coli* BV), várias tentativas de obtenção de transconjugantes tiveram que ser feitas antes que alguns transconjugantes fossem obtidos.

Os conjunto dos resultados obtidos neste trabalho não foram suficientes ou totalmente adequados para o estabelecimento indubitável das localizações genéticas dos genes responsáveis pela expressão das características biológicas estudadas. Contudo, pelo menos no caso da linhagem de *E. coli* J111 são fortes as evidências da localização cromossômica do determinante genético do antígeno "K99" e existe a possibilidade do desenvolvimento de uma vacina viva contra todas as linhagens de *E. coli* portadoras do antígeno K99 ou de antígenos sorologicamente homólogos. Quanto às localizações dos determinantes genéticos da fímbria EAF44 e da VT produzidos pelas linhagens de *E. coli* BF44 e *E. coli* BV,

existem evidências de que sejam realmente característica plasmidiana, uma vez que a linhagem de *E. coli* na qual essas características foram originalmente descritas expressava tanto a fímbria EAF44 quanto a VT. Infelizmente, a linhagem de *E. coli* 55 não foi recuperada a partir de seus estoques originais, porque destes, apenas um encontrava-se viável e mesmo assim poucas amostras puderam ser recuperadas. Aparentemente, os plasmídios pMY551 e pMY555 segregaram e como provavelmente não sejam conjugativos ou mobilizáveis não houve reinfecção dos segregantes, que, aparentemente, apresentaram vantagem seletiva sobre a linhagem original. Contudo, os resultados não são conclusivos e estudos mais acurados são necessários neste caso.

A pesquisa de novos fatores de virulência em *E. coli* pode levar ao desenvolvimento de mecanismos de combate a processos infecciosos em andamento e especialmente ao desenvolvimento de novas vacinas. Uma vez que novos fatores de virulência vêm sendo descritos em linhagens patogênicas de *E. coli*, torna-se necessário o seu estudo.

A importância de estudos biológicos e genéticos de novos fatores de virulência de *E. coli*, além da contribuição para o conhecimento científico, reside no fato de que o uso contínuo de vacinas contra fatores de virulência conhecidos e bem caracterizados não implica na proteção contra outros ainda desconhecidos, possibilitando a inclusão desses novos fatores de virulência nas vacinas já existentes ou na produção de novas vacinas, minorizando prejuízos de ordem humana ou econômica.

No Brasil, não existe, ainda, uma vacina totalmente eficiente contra colibacilose neonatal de bezerros, ocorrendo casos de diarreia em animais imunizados (T. YANO, comunicação pessoal).

Vacinas preparadas com fímbrias purificadas são muito eficientes, porém, a infraestrutura necessária para a sua produção industrial é altamente complexa e dispendiosa, não estando ao alcance da quase totalidade das indústrias brasileiras.

O uso de bacterinas, contendo os antígenos K99 e F41, representam uma alternativa simples e barata. Contudo, esse tipo de vacina pode provocar reações adversas como febre, hipotensão e choque endotóxico. Além disso, o controle da quantidade de antígenos específicos produzidos é difícil de ser realizado e diferentes partidas da vacina podem apresentar diferentes quantidades de antígenos específicos, tornando o produto heterogêneo.

O ideal para as condições brasileiras seria o desenvolvimento de vacinas cuja tecnologia de produção evitasse a criação e manutenção de estruturas para fins ultra-específicos e, por outro lado, evitando técnicas que fossem demasiadamente simples, que poderiam incorrer em falhas de imunização, com consequente perda de animais.

Uma possível solução seria o desenvolvimento de uma vacina contendo os antígenos K99 e F41 semi-purificados. GARCIA (1992) desenvolveu uma vacina oleosa eficiente em promover a

produção de anticorpos anti-K99 e anti-F41 em vacas vacinadas, com a transferência destes, via colostro, para bezerros recém-nascidos em alta frequência. Essa vacina, além de não provocar efeitos colaterais indesejáveis, apresentou grande eficiência em proteger bezerros desafiados com uma linhagem enteropatogênica de *E. coli* produtora destes antígenos.

Uma outra alternativa para as condições brasileiras, seria a utilização de uma vacina viva, que nada mais é que a introdução no intestino do animal, de uma linhagem não-enterotoxigênica de *E. coli* expressando um determinado antígeno de interesse imunológico. O emprego de uma vacina viva eliminaria etapas de purificação de antígenos, barateando o processo de produção. Aliadas às vantagens econômicas encontram-se a ausência da possibilidade de choque endotóxico e sua grande eficiência pois, colonizando o intestino, a bactéria introduzida não somente compete com a microbiota patogênica no animal como, estimula a produção de anticorpos contra um determinado antígeno expresso por uma linhagem enterotoxigênica de *E. coli*.

A desvantagem da vacina viva reside no fato da sua aplicação ser feita por via oral, e, quando o número de animais a ser vacinado é grande, existe o problema de sua administração.

Uma maneira de se bloquear a aderência bacteriana, pré-requisito à infecção e manifestação do quadro clínico, é a introdução, no intestino delgado, de um excesso de fímbrias ou análogos de fímbrias que se ligariam aos sítios receptores nos enterócitos, tornando-os indisponíveis para a adesão de células

de ETEC. Este método foi usado experimentalmente, em suínos, por DAVIDSON & HIRSH (1975) que mostraram que a administração de uma linhagem não-enterotoxigênica de *E. coli* expressando o antígeno K88, reduziu a severidade da diarreia causada por ETEC expressando essa fímbria.

Uma outra abordagem seria a imunização de animais recém-nascidos via anticorpos anti-fímbrias que preveniriam a diarreia interferindo com a anexação de células de ETEC à mucosa intestinal (ACRES et alli, 1979; ACRES et alli, 1982; MORRIS et alli, 1980). Existem evidências, *in vitro*, que anticorpos anti-fímbria possam reverter a adesão (METT et alli, 1983) sugerindo que possam ser úteis não somente na prevenção como no tratamento da diarreia.

Em ambos os casos, uma vacina viva poderia ser usada tanto na prevenção como no tratamento da diarreia, como uma forma de promover a produção de anticorpos contra um ou mais antígenos específicos e de bloquear a aderência de uma linhagem enterotoxigênica de *E. coli* via competição por sítios receptores nas células epiteliais intestinais.

A eficácia do método tem sido demonstrada por vários autores (DUCHET-SUCHAUX, 1988; ISAACSON, 1986; RUNNELS et alli, 1987; SACK, et alli, 1988).

Uma vez que a linhagem de *E. coli* J111 não apresenta a produção de enterotoxinas causadoras de diarreia, nem a produção de citotoxinas que poderiam estar envolvidas em outros tipos de patologias bacterianas, e, como expressa uma fímbria

sorologicamente homóloga à fímbria K99, esta linhagem poderia vir a servir para o desenvolvimento de uma vacina viva contra diarreia causada por linhagens de *E. coli* enterotoxigênicas, produtoras dessa fímbria, em bovinos e suínos.

Por outro lado, as consequências de imunizações em larga escala contra as características de virulência de populações naturais de ETEC são desconhecidas. A vacinação contra antígenos como K99 e F4i ou outros, poderia selecionar novos mecanismos de colonização do intestino delgado. Mais provavelmente, populações de ETEC portadoras de mais de um antígeno de aderência tornar-se-iam mais comuns (ACRES, 1985). Isto foi observado por SODERLIND et alli (1982) que verificaram que 50 % das linhagens de ETEC isoladas de leitões com diarreia em rebanhos vacinados eram produtoras da fímbria K88, enquanto que, as outras 50 %, expressavam a fímbrias K99, 987P e outros fatores de aderência não identificados. Por outro lado, em leitões de rebanhos não vacinados, 90 % das linhagens de ETEC eram produtoras da fímbria K88 e 10 % expressavam fímbrias como K99 ou 987P. Estes fatos sugerem que a vacinação contra o antígeno K88 selecionou positivamente linhagens de ETEC produtoras de outros fatores de aderência que não o K88, ou seja, a vacinação alterou as frequências gênicas da população natural de ETEC, aparentemente incorrendo num aumento da frequência de fatores de virulência anteriormente não tão importantes do ponto de vista epidemiológico. ACRES (1985) sugere que estudos a longo-prazo devam ser realizados para se verificar se a vacinação pode

realmente causar alterações neste nível. Esse autor concorda que a imunização possa alterar a estrutura populacional de ETEC, faltando ainda, a determinação do grau em que tais alterações possam ocorrer e sugere que deva haver uma "vigilância" e caracterização contínuas das populações de ETEC e que novos antígenos possam ter que vir a ser incorporados em vacinas se alterações importantes na estrutura populacional de ETEC forem detectadas.

Partindo desse pressuposto, sugerimos, neste estudo, que não somente uma alteração da estrutura genética de populações naturais de ETEC possa ocorrer, selecionando novos fatores de virulência, como populações de *E. coli* não-enterotoxigênicas, possivelmente envolvidas com diarreia bovina através de mecanismos outros, possam se tornar importantes do ponto de vista epidemiológico. Por exemplo, existem evidências de que linhagens *E. coli* verocitotoxigênicas (VTEC) possam estar envolvidas em casos de diarreia bovina (MOHAMMAD et alli, 1985; YANO, 1986; YANO et alli, 1986b; YANO et alli, 1988). Caso se esclareça o papel de linhagens verocitotoxigênicas (VTEC) na patogênese da diarreia bovina, estudos dos fatores de virulência dessas bactérias seriam importantes para o desenvolvimento de novas vacinas. A existência de um linhagem de *E. coli* não-toxigênica, mas produtora de um fator de colonização de VTEC, como a *E. coli* BF44, pode ser de utilidade para tal propósito se dados epidemiológicos comprovarem a importância de populações de VTEC na patogênese da diarreia.

8. RESUMO

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de se determinar as localizações dos determinantes genéticos de dois fatores de colonização produzidos por duas diferentes linhagens de *E. coli*, isoladas de bezerros com diarreia neonatal, os antígenos "K99" e EAF44, e a dos genes codificando as produções de verocitotoxina (VT), hemolisina e toxina letal a camundongos (TLC), produzidas por uma linhagem de *E. coli* verocitotoxigênica (VTEC).

Uma dessas linhagens, denominada de *E. coli* J111, apresenta a produção de um antígeno de superfície que reage especificamente com o antissoro anti-K99 porém, não apresenta nenhuma atividade de hemaglutinação, manose-resistente. Este novo antígeno foi denominado de "K99".

Estudos de microscopia eletrônica revelaram a presença de fímbrias na superfície celular da linhagem.

Esta linhagem não é produtora de enterotoxinas termo-estável (STa) ou termo-lábil (LT-I), ou de verocitotoxina (VT).

A linhagem de *E. coli* J111 é portadora de um único plasmídio, conjugativo, com peso molecular estimado em 32 Mdal, que contém genes para resistência múltipla à ampicilina, à estreptomicina e à tetraciclina. Quando esse plasmídio, denominado de pMY111, foi transferido para duas diferentes linhagens de *E. coli* K12, a C600 e a DH5a, e, para duas linhagens selvagens de origem bovina, a *E. coli* BF44 e a *E. coli* BV, nenhum

dos transconjugantes obtidos expressou o antígeno "K99" e nem tiveram nenhuma de suas características biológicas conhecidas alteradas, com exceção da aquisição de resistência simultânea àquelas três drogas.

Estes fatos sugerem que o determinante genético do antígeno "K99", localiza-se no cromossomo bacteriano, ao contrário do que ocorre com o operon do antígeno K99 que localiza-se em um plasmídio. O plasmídio pMY111 seria então, um plasmídio R típico, sem nenhuma outra função aparente na célula bacteriana além da de conferir resistência múltipla a drogas.

A confirmação desta hipótese seria obtida através da eliminação do plasmídio pMY111. Contudo, tentativas de eliminação do plasmídio através de cura ou pela introdução de plasmídios pertencentes a Grupos de Incompatibilidade conhecidos foram infrutíferas.

Uma vez que o antígeno "K99" tem propriedades biológicas e genéticas distintas (se for realmente o caso) daquelas do antígeno K99, é possível que esse antígeno seja um novo fator de colonização de *E. coli*.

As duas outras linhagens bacterianas estudadas neste trabalho são provavelmente derivadas da linhagem de *E. coli* verocitotoxigênica 55 (VTEC) que expressa o fator de colonização EAF44.

Uma destas linhagens expressa o antígeno EAF44 mas não produz verocitotoxina (VT), enquanto que, a outra, que não expressa o antígeno EAF44, produz verocitotoxina juntamente com

hemolisina e uma toxina letal a camundongos adultos. Estas linhagens foram denominadas de *E. coli* BF44 e *E. coli* BV, respectivamente. Ambas as produzem colicina V e da mesma forma que a linhagem de *E. coli* 55, não produzem enterotoxinas termo-estável (STa) ou termo-lábil (LT-I) e apresentam sensibilidade a drogas antimicrobianas comumente utilizadas.

Estudos de microscopia eletrônica de ambas as linhagens revelaram a presença de fímbrias na superfície celular da linhagem EAF44+ e ausência total de estruturas fimbrianas na linhagem VTEC.

Análises em gel de agarose revelaram três bandas plasmídicas em posições relativas idênticas, em ambas as linhagens, sendo que, a linhagem de *E. coli* BV apresenta um plasmídio de alto peso molecular, estimado em 103,6 Mdal, inexistente na linhagem de *E. coli* BF44. Em contrapartida, a linhagem de *E. coli* BF44 apresenta um plasmídio de baixo peso molecular, estimado em 2,4 Mdal, inexistente na linhagem de *E. coli* BV. Estes plasmídios foram denominados de pMY551 e pMY555, respectivamente.

Os plasmídios presentes em ambas as linhagens bacterianas receberam as seguintes denominações, na ordem do maior peso molecular para o menor: pMY552, pMY553 e pMY554, com pesos moleculares estimados em 74,8, 4,7 e 3,7 Mdal, respectivamente.

Esses resultados preliminares sugerem que tanto a linhagem de *E. coli* BV, quanto a linhagem de *E. coli* BF44, são derivadas da linhagem original de *E. coli* 55 (que não foi

recuperada) e que os determinantes genéticos para a produção de VT e para a expressão do antígeno EAF44 localizam-se nos plasmídios pMY551 e pMY555, respectivamente.

Estas hipóteses baseam-se nos fatos de que na ausência do plasmídio pMY551, a VT, a hemolisina e a TLC não são produzidas, ou seja, sua expressão é, pelo menos, dependente da presença desse plasmídio. A VT, a hemolisina e a TLC produzidas pela linhagem de *E. coli* BV parecem ser manifestações da mesma entidade bioquímica.

Da mesma forma, na ausência do plasmídio pMY555, não ocorre a expressão do antígeno EAF44, sugerindo que a expressão desta fímbria é pelo menos dependente da presença deste plasmídio.

Tentativas de conjugação, mobilização, transformação, mutagenização e cura dos plasmídios pMY551 e pMY555, para uma confirmação da hipótese de que são mediadores das características biológicas apresentadas pelas linhagens de *E. coli* BF44 e *E. coli* BV, respectivamente, foram infrutíferas.

7. SUMMARY

Our objectives in this work were to determine the location of the genetic determinants of two colonization factors expressed by two strains of *E. coli* isolated from calves with neonatal diarrhea, and that of the genes coding for verotoxin (VT), hemolysin and a toxin lethal for mice (TLC) produced by a verocytotoxigenic *E. coli* strain (VTEC).

One of the *E. coli* strains, denominated J111, express a surface antigen that reacts specifically with anti-K99 rabbit antiserum but does not show mannose-resistant hemagglutinating (MRHA) activities. This antigen was denominated "K99".

This *E. coli* strain was negative for either STa or LT-I enterotoxin production. Verotoxin production was also negative when examined by the Vero cell monolayer assay.

Electron microscopic studies revealed fimbrial structures on the cell surface of this strain.

The *E. coli* J111 strain bears a single conjugative plasmid, whose molecular weight was estimated to be 32 Mdal. This plasmid, denominated pMY111, carry genes coding for resistance to ampicillin, streptomycin, and tetracycline.

When we transferred the pMY111 plasmid to strains of *E. coli* K12 C600 and *E. coli* K12 DH5a, and two different wild-type *E. coli* strains of bovine origin, *E. coli* BF44 and *E. coli* BV, all the transconjugant strains acquired resistance to the three antibiotics simultaneously, but none of them expressed the

"K99" antigen. Also, the presence of pMY111 plasmid in these transconjugants did not interfere with the expression of any known biological characteristic of either wild-type strains.

This fact suggests that the genetic determinants for the "K99" antigen may be located on the *E. coli* J111 bacterial chromosome. The pMY111 plasmid would be just a common R plasmid without any other apparent function in the bacterial cell.

Further confirmation of the chromosomal location hypothesis for "K99" genes might be obtained with pMY111 plasmid elimination either by curing or by transferring plasmids belonging to different Incompatibility Groups, but all attempts of eliminating this plasmid were unsuccessful. However, we believe that the results found in our assays are strong evidence for the chromosomal location of the "K99" antigen genetic determinants.

Since the "K99" antigen show different biological and genetical properties (if it really does) from those showed by the K99 antigen, we believe that this antigen may be a new *E. coli* colonization factor.

The two other bacterial strains studied in this work are derived from the verocytotoxigenic (VTEC) strain of *E. coli* 55 that express the EAF44 colonization factor.

One of these strains express the EAF44 antigen but does not produce verotoxin (VT), while the other one produces verotoxin together with hemolysin and a toxin lethal for mice (TLC). These strains, denominated *E. coli* BF44 and *E. coli* BV, respectively, both produce colicin V, and like the *E. coli* 55

strain are also negative for both STa or LT-I enterotoxin production, and are susceptible to several antimicrobial drugs commonly used.

Electron microscopic studies revealed the presence of fimbriae on the surface of the EAF44+ strain and absence of fimbrial structures on the surface of the verocytotoxigenic strain.

Agarose gel electrophoresis analyses revealed that both strains have a similar plasmid profile, bearing three identical plasmids and, the presences mutually exclusives of two distinct plasmids: one with high molecular weight, estimated to be 103.6 Mdal, presente only in the E. coli BV strain, and one with low molecular weight, estimated to be 2.4 Mdal, presente only in the E. coli BF44 strain. These plasmids were denominated pMY551 and pMY555, respectively.

The other plasmids present in both strains were denominated pMY552, pMY553, and pMY554 whose molecular weights were estimated to be 74.8, 4.7, and 3.7 Mdal, respectively.

These results led us to believe that both strains are derived from the original E. coli 55 strain and that the genetic determinants for VT, hemolysin and TLC production and EAF44 antigen expression are located on the pMY551 and pMY555 plasmids, respectively.

These hypotheses are based on the fact that in the absence of the pMY551 plasmid, the VT, hemolysin and TLC production do not occur. On the other hand, in the absence of the

pMY555 plasmid the EAF44 antigen is not expressed, what suggests that the expression of the EAF44 antigen is, at least, dependent on the presence of that plasmid.

All attempts of conjugation, mobilization, transformation, mutagenization, or curing of the pMY551 and pMY555 plasmids in order to confirm our hypotheses were unsuccessful.

8. BIBLIOGRAFIA

- ACRES, S.D. 1985. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves: a review. *Journal of Dairy Sciences* 68:229-256.
- ACRES, S.D., ISAACSON, R.E., BABIUK, L.A. & KAPITANY, R.A. 1979. Immunization of calves against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with purified K99 antigen and whole cell bacterin. *Infection and Immunity* 25: 121-126.
- ACRES, S.D., FORMAN, A.J. & KAPITANY, R.A. 1982. Antigen-extinction profile in pregnant cows, using a K99-containing whole-cell bacterin to induce passive protection against enterotoxigenic colibacillosis of calves. *American Journal of Veterinary Research* 43: 569-575.
- ALDERETE, J.F. & ROBERTSON, D.C. 1977. Repression of heat-stable enterotoxin synthesis in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 17: 629-633.
- ALDERETE, J.F. & ROBERTSON, D.C. 1978. Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 19: 1021-1030.
- ANDERSON, D.G. & MOSELEY, S.L. 1988. *Escherichia coli* F41 adhesin: genetic organization, nucleotide sequence and homology with the K88 determinant. *Journal of Bacteriology* 170:4890-4896.

- APPLEYARD, R.K. 1954. Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. *Genetics* 39: 440-452.
- ARTHUR, M., CAMPANELLI, C., ARBEIT, R.D., KIM, C., STEINBACH, S., JOHNSON, C.E., RUBIN, R.H. & GOLDSTEIN, R. 1989. Structure and copy number of gene clusters related to the pap F-adhesin operon of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 57: 314-21.
- AUBEL, D., DARFEVILLE-MICHAUD, A. & JOLY, B. 1991. New adhesive factor (antigen 8786) on a human enterotoxigenic *Escherichia coli* O117:H4 strain isolated in Africa. *Infection and Immunity* 59:
- AZEVEDO, J.L. & COSTA, S.O.P. 1973. Exercícios práticos de genética. Companhia Editora Nacional, EDUSP, SP.
- BAE, Y.M., HOLMGREN, E. & CRAWFORD, I.P. 1989. *Rhizobium meliloti* anthranilate synthase gene: cloning, sequence and expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 171: 3471-3478.
- BAECKER, P.A., SHELTON, E.R., BURSZTYN-PETTEGREW, H., SALAZAR, F.H., OSEN, E.G., STOUFER, S.D., LEE, S.W. & CHAN, H.W. 1988. Expression of K99 adhesion antigen controlled by the *Escherichia coli* tryptophan operon promoter. *Infection and Immunity* 56: 2317-2323.

- BAK, A.L., CHRISTIANSEN, G., CHRISTIANSEN C., STENDERUP A., ØRSKOV, I., & ØRSKOV, F. 1972. Circular DNA molecules controlling synthesis and transfer of the surface antigen (K88) in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* 73:373-385.
- BERINGER, J.E., HOGGAN, S.A. & JOHNSTON, A.W.B. 1978. Linkage mapping in *Rhizobium leguminosarum* by means of plasmid-mediated recombination. *Journal of General Microbiology* 104: 201-207.
- BERTSCHINGER, H.V., MOON, H.W. & WHIPP, S.C. 1972. Association of *Escherichia coli* with the small intestinal epithelium. I. Comparison of enteropathogenic and nonenteropathogenic porcine strains in pigs. *Infection and Immunity* 5: 595-605.
- BIRNBOIM, H.C. & DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1531-1533.
- BOLIVAR, F., RODRIGUEZ, R.L., GREENE, P.J., BETLACK, M.C., HEYNEKER, H.L., BOYER, H.W., CROSA, J.H. & FALKOW, S. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multiple purpose cloning system. *Gene* 2: 95-113.
- BROCK, J.H., PICKERING, M.G., McDOWALL, M.C. & DEACON, A.G. 1983. Role of antibody and enterobactin in controlling growth of *Escherichia coli* in human milk and acquisition of lactoferrin- and transferrin-bound iron by *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 40: 453-459.

BRODA, P. 1979. Plasmids. W.H. Freeman, Oxford.

BURGESS, M.N., BYWATER, R.J., COWLEY, C.M., MULLAN, N.A. & NEWSOME, P.M. 1978. Biological evaluation of a methanol-soluble heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits and calves. *Infection and Immunity* 21: 526-531.

BURROWS, M.R., SELLWOOD, R. & GIBBONS, R.A. 1976. Haemagglutinating and adhesive properties associated with the K99 antigen of bovine strains of *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* 96: 269-275.

BRADLEY, D.E. 1989. Interaction of drug resistance, plasmids and bacteriophages with diarrheagenic strains of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 57: 2331-2338.

CARON, J., COFFIELD, L.M. & SCOTT, J.R. 1989. A plasmid-encoded regulatory gene, *rns*, required for expression of the CS1 e CS2 adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 86: 963-967.

CARDN, J. & SCOTT, J.R. 1990. A *rns*-like regulatory gene for colonization factor antigen I (CFA/I) that controls expression of CFA/I pilin. *Infection and Immunity* 58: 874-878.

CHAN, R., ACRES, S.D. & COSTERTON, J.W. 1982. Use of specific antibody to demonstrate glycocalyx, K99 pili, and the spatial relationships of K99- enterotoxigenic strain of *Escherichia coli* colonizing the ileum of colostrum-fed calves. *Infection and Immunity* 37: 1170-1180.

CHANG, P.P., MOSS, J., TWIDDY, E.M. & HOLMES, R.K. 1987. Type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* activates adenylate cyclase in human fibroblasts by ADP ribosylation. *Infection and Immunity* 55: 1854-1858.

CHANG, S.K. & GIANNELLA, R.A. 1981. Aminoacid sequence of heat-stable enterotoxin produced by *Escherichia coli* pathogenic for man. *Journal of Biological Chemistry* 256: 7744-7746.

CLEMENTS, J.D. & FINKELSTEIN, R.A. 1979. Isolation and characterization of homogeneous heat-labile enterotoxin with high specific activity from *Escherichia coli* cultures. *Infection and Immunity* 24: 760-769.

CLEMENTS, J.D., FLINT, D.C., ENGERT, R.F. & KLIPSTEIN, F.A. 1983. Cloning and molecular characterization of the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Infection and Immunity* 40: 653-658.

CLEMENTS, J.D., FLINT, D.C. & KLIPSTEIN, F.A. 1982. Immunological and physicochemical characterization of heat-labile enterotoxins isolated from two strains of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 38: 806-809.

- COFFIELD, L.M. & SCOTT, J.R. 1989. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 86: 963-967.
- COLLINS, N.F., MALBUR, T., SCHWENCK, W.H., HOOGEVEEN, P., PIERCE, R.L., BEHAN, R.W. & FANKRATZ, D. 1988. Duration of immunity and efficacy of an oil emulsion *Escherichia coli* bacterin in cattle. American Journal of Veterinary Research 49: 674-677.
- CONTREPOIS, M. & GIRARDEAU, J.P. 1985. Additive protective effects of colostral antipili antibodies in calves experimentally infected with enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infection and Immunity 50: 947-949.
- CRAVIOTO, A., SCOTLAND, S.M. & ROWE, B. 1982. Hemagglutination activity and colonization factor antigens I and II in enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolate from humans. Infection and Immunity 36: 189-197.
- DALLAS, W.S. & FALKOW, S. 1979. The molecular nature of heat-labile enterotoxin (LT) of *Escherichia coli*. Nature 277: 406-407.
- DALLAS, W.S. & FALKOW, S. 1980. Amino acid sequence homology between cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin. Nature 288: 499-501.
- DALLAS, W.S., GILL, D.M. & FALKOW, S. 1979. Cistrons encoding *Escherichia coli* heat-labile toxin. Journal of Bacteriology 139: 850-858.

- DATTA, N. & HEDGES, R.W. 1972. Host ranges of R factors. *Journal of General Microbiology* 70: 453-460.
- DATTA, N., HEDGES, R.W., SHAW, E.J., SYKES, R.B. & RICHMOND, M.H. 1971. Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 108: 1244-1249.
- DAVIDSON, J.N. & HIRSH, D.C. 1975. Use of the K88 antigen for *in vivo* bacterial competition with porcine strains of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 12: 134-136.
- DAVIES, D.L., FALKINER, F.R. & HARDY, K.G. 1981. Colicin V production by clinical isolates of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 31: 574-579.
- DAVIS, C.F., AVOTS-AVOTINS, A.E. & FADER, R.C. 1981. Evidence for a bladder cell glycolipid receptor for *Escherichia coli* and the effect of neuraminic acid and colominic acid on adherence. *Infection and Immunity* 34: 944-948.
- DEAN, A.G., CHING, Y.C., WILLIAMS, R.G. & HARDEN, L.B. 1975. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in the study of diarrhea in children in Honolulu. *Journal of Infectious Diseases* 125: 407-411.
- DeBOY II, J.M., WACHSMUTH, I.K. & DAVIS, B. 1980. Hemolytic activity in enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 12:193-198.

- deGRAAF, F.K. & KLAASEN, P. 1986. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of 987P fimbriae. *Molecular and General Genetics* 204: 75-81.
- deGRAAF, F.K., KLAASEN-BOOR, P. & vanHESS, J.E. 1980a. Biosynthesis of the K99 surface antigen is repressed by alanine. *Infection and Immunity* 30: 125-128.
- deGRAAF, F.K., KLEMM, P. & GAASTRA, W. 1980c. Purification, characterization and partial covalent structure of *Escherichia coli* adhesive antigen K99. *Infection and Immunity* 33: 877-883.
- deGRAAF, F.K., KRENN, B.E. & KLAASEN, P. 1984. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of K99 fimbriae. *Infection and Immunity* 43: 508-514.
- deGRAAF, F.K. & ROORDA, I. 1982. Production, purification and characterization of the fimbrial and adhesive antigen F41 isolated from the calf enteropathogenic *Escherichia coli* strain B41M. *Infection and Immunity* 36: 751-758.
- deGRAAF, F.K., WIENTJES, F.B. & KLAASEN-BOOR, P. 1980b. Production of K99 antigen by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of antigen groups 08, 09, 020 and 0101 grown at different conditions. *Infection and Immunity* 27: 216-221.

- deREE, J.M., SCHWILLENS, P. & van den BOSCH, F. 1985. Molecular cloning of F11 fimbriae from a uropathogenic *Escherichia coli* and characterization of fimbriae with polyclonal and monoclonal antibodies. FEMS Microbiology Letters 29: 91-97.
- deRYCKE, J, GUILLOT, J.F. & BOIVIN, R. 1987. Cytotoxins in non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from feces of diarrheic calves. Veterinary Microbiology 15: 137-150.
- DONTA, S.T., MOON, H.W., WHIPP, S.C. 1974. Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cell in tissue culture. Science 183: 334-336.
- DORNER, F. 1975. *Escherichia coli* enterotoxin: purification and partial characterization. The Journal of Biological Chemistry 250: 8712-8719.
- DORNER, F., JAKSCHE, H. & STOCK, W. 1979. *Escherichia coli* enterotoxin: purification, partial characterization and immunological observations. Journal of Infectious Diseases 133 (supl.): 142-156.
- DOUGAN, G., DOWD, G. & KEHOE, M. 1983. Organization of K88ac-encoded polypeptides in the *Escherichia coli* cell envelop: use of minicells and outer membrane protein mutants for studying assembly of pili. Journal of Bacteriology 153: 364-370.

- DREES, D.T. & WAXLER, G.L. 1970. Enteric colibacillosis in gnotobiotic swine. An electron microscopic study. American Journal of Veterinary Research 31: 1159-1171.
- DREYFUS, L.A., FRANTZ, J.C. & ROBERTSON, D.C. 1983. Chemical properties of heat-stable enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of different host origins. Infection and Immunity 42: 539-548.
- DUCHET-SUCHAUX, M. 1988. Protective antigens against enterotoxigenic *Escherichia coli* O101:k99,F41 in the infant mouse diarrhea model. Infection and Immunity 56: 1364-1370.
- 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 cholera toxin. FEMS Microbiology Letters 26: 171-174.
- ECHEVERRIA, P. & MURPHY, J.R. 1980. Enterotoxigenic *Escherichia coli* carrying plasmids coding for antibiotic resistance and enterotoxin production. Journal of Infectious Diseases 142: 273-278.
- ECHEVERRIA, P., ØRSKOV, F., ØRSKOV, I. & PLIANBANGCHANG, D. 1982. Serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* in Thailand and the Philippines. Infection and Immunity 36: 851-856.

- ECHEVERRIA, P., SERIWATANA, J., PATAMAROJ, U., MOSELEY, S.L.,
McFARLAND, A., CHITYOTHIN, O. & CHAICUMPA, W. 1984. Prevalence
of heat-stable II enterotoxigenic *Escherichia coli* in pigs,
water and people at farms in Thailand as determined by DNA
hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 19: 489-491.
- EDERER, G.M. & CLARK, M. 1970. Motility-indole-ornithine medium.
Applied Microbiology 20 : 845-850
- EDWARDS, J.P. & EWING, W.H. 1966. Identification of
Enterobacteriaceae. Burgess Publishig Co.
- ELWELL, L.P. & SHIPLEY, P.L. 1980. Plasmid-mediated factor
associated with virulence of bacteria to animals. *Annual
Reviews of Microbiology* 34: 465-496.
- EVANS, D.G. & EVANS Jr., D.J. 1978. New surface-associated heat-
labile surface colonization factor antigen CFA(II) produced
by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O6 and O8.
Infection and Immunity 21: 638-647.
- EVANS, D.G., EVANS Jr., D.J. & DuPONT, H.L. 1977a. Virulence
factor of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of
Infectious Diseases* 136: 118-123.
- EVANS, D.G., EVANS Jr., D.J. & GORBACH. 1973. Production of
vascular permeability factor by *Escherichia coli* isolated from
man. *Infection and Immunity* 8: 725-730.

- EVANS, D.G., EVANS Jr., D.J., TJOA, W.S. & DuPONT, H.L. 1978. Detection and characterization of colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhoea. *Infection and Immunity* 19: 727-736.
- EVANS, D.G., SILVER, R.P., EVANS Jr. D.J., CHASE, D.G. & GORBACH, S.L. 1975. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. *Infection and Immunity* 12: 656-667.
- EVANS Jr., D.J., EVANS, D.G. & DuPONT, H.L. 1979. Hemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* determined with human, bovine, chicken and guinea pig erythrocytes in the presence and absence of mannose. *Infection and Immunity* 23: 336-346.
- EVANS Jr., D.J., EVANS, D.G. & GORBACH, S.L. 1974. Polymyxin B induced release of low molecular weight, heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 10: 1010-1017.
- EVANS Jr., D.J., EVANS, D.G., RICHARDSON, S.H. & GORBACH, S.L. 1976. Purification of the polymyxin released heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases* (suppl.) 133: 97-101.

- EVANS Jr., D.J., EVANS, D.G., YOUNG, L.S. & PITT, J. 1980. Hemagglutination typing of *Escherichia coli*: definition of seven hemagglutination types. *Journal of Clinical Microbiology* 12: 235-242.
- FAIRWEATHER, N.F., LYNESS, V.A., MASKELL, D.J. 1987. Immunization of mice against tetanus with fragments of tetanus toxin synthesized in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 55: 2541-2545.
- FALCÃO, D.P., LIMA, B.M., MARINI, E. & SHIMIZU, M.T. 1982. Resistência a drogas em enterobactérias isoladas de alimentos. *Revista de Microbiologia* 13: 402-411.
- FARIS, A., LINDAHL, M. & WADSTROM, T. 1980. GM2-like glycoconjugate as possible erythrocyte receptor for the CFA/I and K99 hemagglutinins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 7: 265-269.
- FIELD, M. GRAF, L.H., LAIRD, W.J. & SMITH, P.L. 1978. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: in vitro effects of guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration and ion transport in small intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*: 75: 2800-2804.
- FINKELSTEIN, R.A., LARUE, M.K., JOHNSTON, D.W., VASIL, M.L., CHO, G.L. & JONAS, J.R. 1976. Isolation and properties of heat-labile enterotoxin(s) from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases* 133 (supl.): 120-137.

- FORMAL, S.B. & HORNICK, R.B. 1978. Invasive *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases* 137: 641-644.
- GAASTRA W. & deGRAAF, F.K. 1982. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiological Reviews* 46: 129-161.
- GARCIA, M. 1992. Estudos da eficiência de uma vacina oleosa contra colibacilose neonatal em bovinos. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, SP.
- GATTI, M.S.V. 1983. Fatores de virulência em amostras de colibacilos enteropatogênicos isolados no Brasil. Tese de Mestrado. Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP.
- GATTI, M.S.V., SERAFIM, M.B. & PESTANA de CASTRO, A.F. 1985. Fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênicas para suínos isolados no Brasil. *Revista de Microbiologia* 16: 21-30.
- GEARY, S.J., MARCHLEWICZ, B.A. & FINKELSTEIN, R.A. 1982. Comparison of heat-labile enterotoxins from porcine and human strains of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 36: 215-220.
- GIANNELLA, R.A., DRAKE, K.W. & LUTTRELL, M. 1981. Development of a radioimmunoassay for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin: comparison with the suckling mouse bioassay. *Infection and Immunity* 33: 186-192.

- GILL, D.M., CLEMENTS, J.D., ROBERTSON, D.C. & FINKELSTEIN, R.A. 1981. Subunit number and arrangement in *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Infection and Immunity* 33: 677-682.
- GILL, D.M. & RICHARDSON, S.H. 1980. Adenosine diphosphate-ribosylation of adenylate cyclase catalysed by heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*: comparison with cholera toxin. *Journal of Infectious Diseases* 141: 64-70.
- GIUGLIANO, L.G., MENEGUETTI, M.A.M. & TRABULSI, L.R. 1978a. Produção de enterotoxina LT por amostras de *Escherichia coli*. *Revista de Microbiologia* 9: 11-17.
- GIUGLIANO, L.G., NAKAGIMA, G.S., GIUGLIANO, R. & SHRIMPTON, R. 1978b. *Escherichia coli* enterotoxigênica isolada de lactentes em Manaus, Amazonas, Brasil. *Revista de Microbiologia* 9: 198-201.
- GORBACH, S.L. & KHURANA, C.M. 1972. Toxigenic *Escherichia coli*: a cause of infantile diarrhea in Chicago. *New England Journal of Medicine* 293: 567-573.
- GUERRANT, R.L., BRUNTON, L.L., SCHNAITMAN, T.C., REBHUN, L.T. & GILMAN, A.G. 1974. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cells morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 10:320-337.

- GUINÉE, P.A.M., JANSEN, W.H. & ASTERBERG, C.M. 1976. Detection of the K99 antigen by means of agglutination and immunoelectrophoresis in *Escherichia coli* isolated from calves and its correlation with enterotoxigenicity. *Infection and Immunity* 13: 1369-1377.
- GUINÉE, P.A.M., VELDKAMP, J & JANSEN, W.H. 1977. Improved Minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 15: 676-678.
- GURWITH, M., HINDE, D., GROSS, R. & ROWE, B. 1978. A prospective study of enteropathogenic *Escherichia coli* in endemic diarrheal disease. *Journal of Infectious Diseases* 137: 292-297.
- GURWITH, M. & WILLIAMS, T.W. 1977. Gastroenteritis in children: a two-year review in Manitoba. *Journal of Infectious Diseases* 136: 239-247.
- GUZMAN-VERDUZCO, L.M. & KUPERSZTOCH, Y.M. 1987. Fusion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and heat-labile enterotoxin B subunit. *Journal of Bacteriology* 169: 5201-5208.
- GYLES, C.L. 1971. Heat-labile and heat-stable forms of the enterotoxin from *Escherichia coli* strains enteropathogenic for pigs. *Annals of the New York Academy of Sciences* 176: 314-322.

- GYLES, C.L. & BARNUM, D.A. 1969. A heat-labile enterotoxin from strains of *Escherichia coli* enteropathogenic for pigs. *Journal of Infectious Diseases* 120: 419-426.
- GYLES, C.L., SO, M. & FALKOW, F. 1974. The enterotoxin plasmids of *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases* 130: 40-49.
- HALE, T., SANSONETTI, F.J., SCHAD, P.A., AUSTIN, S. & FORMAL, S.B. 1983. Characterization of virulence plasmids and plasmid-associated outer membrane proteins in *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* and *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 40: 340-350.
- HANAHAN, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166: 557-580.
- HANSON, M.S., HEMPEL, J. & BRINTON Jr., C. 1988. Purification of the *Escherichia coli* type 1 pilin and minor pilus proteins and partial characterization of the adhesin protein. *Journal of Bacteriology* 170: 3350-3358.
- HARNETT, N.M. & GYLES, C.L. 1983. Enterotoxigenicity of bovine and porcine *Escherichia coli* of O groups 8, 9, 20, 64, 101 and X46. *American Journal of Veterinary Research* 44: 1210-1214.
- HOHMANN, A. & WILSON, M.R. 1975. Adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to intestinal epithelium in vivo. *Infection and Immunity* 12: 866-880.

- HOLMES, R.K., TWIDDY, E.M. & PICKETT, C.L. 1986. Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. Infection and Immunity 53: 464-473
- HOLMGREN, J., FREDMAN, P., LINBLAD, M., SVENNERHOLM, A-M. & SVENNERHOLM, L. 1982. Rabbit intestinal glycoprotein receptor for *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin lacking affinity for cholera toxin. Infection and Immunity 38: 424-433.
- HOLMGREN, J., SVENNERHOLM, A-M. & AHREN, C. 1981. Nonimmunoglobulin fraction of human milk inhibits bacterial adhesion (hemagglutination) and enterotoxin binding of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. Infection and Immunity 33: 136-141.
- HONDA, T. ARITA, M. & MIWATANI, I. 1984. Characterization of new hydrophobic pili of human enterotoxigenic *Escherichia coli*: a possible new colonization factor. Infection and Immunity 43: 959-965.
- HONDA, T., ISUJI, T., TAKEDA, Y & MIWATANI, T. 1981. Immunological non identity of heat-labile enterotoxin from human and porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infection and Immunity 34: 337-340.
- HUANG, A., FRIESEN, J. & BRUNTON, J.L. 1987. Characterization of a bacteriophage that carries the genes for production of Shiga-like toxin 1 in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 169: 4308-4312.

- 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. 1977. K99 surface antigen of *Escherichia coli*: purification and partial characterization. *Infection and Immunity* 15: 272-279.
- ISAACSON, R.E. 1980. Factors affecting expression of the *Escherichia coli* pilus K99. *Infection and Immunity* 28: 190-194.
- ISAACSON, R.E. 1983. Regulation of expression of *Escherichia coli* pilus K99. *Infection and Immunity* 40: 633-639.
- ISAACSON, R.E. 1986. Development of vaccines for bacterial diseases using recombinant DNA technology. *Avian Diseases* 30: 28-36.
- ISAACSON, R.E., DEAN, E.A., MORGAN, R.L. & MOON, H.W. 1980. Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced diarrheal disease by vaccinating dams with purified K99 or 987P pili: antibody production in response to vaccination. *Infection and Immunity* 29: 824-826.
- ISAACSON, R.E., FUSCO, P.C., BRINTON, C.C. & MOON, H.W. 1978. *In vitro* adhesion of *Escherichia coli* to porcine small intestinal epithelial cells: pili has adhesive factors. *Infection and Immunity* 21: 392-397.

- ISAACSON, R.E., MOON, H.W. & SCHNEIDER, R.A. 1978. Distribution and virulence of *Escherichia coli* in the small intestines of calves with and without diarrhea. American Journal of Veterinary Research 39: 1750-1755.
- ISAACSON, R.E., NAGY, B. & MOON, H.W. 1977. Colonization of porcine small intestine by *Escherichia coli*: colonization and adhesion factor of pig enteropathogens that lack K88. Journal of Infectious Diseases 135: 531-539.
- JOHNSON, W.H., LIOR, H. & BEZANSON, G.S. 1983. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. Lancet 1: 76.
- JONES, G.W., RUTTER, J.M. 1972. Role of the K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by *Escherichia coli* in piglets. Infection and Immunity. 6: 918-927.
- JONES, G.W., RUTTER, J.M. 1974. The association of K88 antigen with haemagglutinating activity in porcine strains of *Escherichia coli*. Journal of General Microbiology 84:135-144.
- KARCH, H., HEESEMANN, J., LAUFS, R., O'BRIEN, A.D., TACKET, C.O. & LEVINE, M.M. 1987. A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. Infection and Immunity 55: 455-451.

- KARMALI, M.A., STEELE, B.T., PETRIC, M. & LIM, C. 1983. Sporadic cases of haemolytic-uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* stools. *Lancet* 1: 619-620.
- KLAASEN, P., WOODWARD, M.J., vanZIJDERVELD, F.G. & deGRAAF, F.K. 1990. The 987P gene cluster in enterotoxigenic *Escherichia coli* contains a STpa transposon that activates 987P expression. *Infection and Immunity* 58:
- KLEMM, P. 1979. Fimbrial colonization factor CFA/I from human enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *FEBS Letters* 108: 107-110.
- KLIPSTEIN, F.A., ENGERT, R.F. & CLEMENTS, J.D. 1981. Protection in rats immunized with *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Infection and Immunity* 34: 637-639.
- KLIPSTEIN, F.A., ENGERT, R.F. & HOUGHTEN, R.A. 1983. Properties of synthetically produced *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Infection and Immunity* 39: 117-121.
- KNUTTON, N.S., LLOYD, D.R. & McNEISH, A.S. 1987a. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infection and Immunity* 55: 69-77.

- KNUTTON, N.S., LLOYD, D.R. & McNEISH, A.S. 1987b. Identification of a new fimbrial structure in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) serotype O148:H28 which adheres to human intestinal mucosa: a potentially new human ETEC colonization factor. *Infection and Immunity* 55: 86-92.
- KONOWALCHUK, J., DICKIE, N., STAVRIC, S. & SPEIRS, J.I. 1978. Comparative studies of five heat-labile toxic products of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 22: 644-648.
- KONOWALCHUCK, J., SPEIRS, J.I. & STAVRIC, S. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 18: 775-779.
- JUNKEL, S.L. & ROBERTSON, D.C. 1979. Purification and chemical characterization of the heat-labile enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 25: 586-596.
- LALLIER, R., LARIVIERE, S. & ST-PIERRE, S. 1980. *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin: rapid method of purification and some characteristics of the toxin. *Infection and Immunity* 28:469-474.
- LATHE, R., HIRTH, P., DEWILDE, M., HARFORD, N. & LE COQ, J.P. 1980. Cell free synthesis of enterotoxin of *Escherichia coli* from a cloned gene. *Nature* 284: 473-474.

- LEE, J.A. & KEAN, B.H. 1978. International conference on the diarrhea of travelers - new directions in research: a summary. *Journal of Infectious Diseases* 137: 335-369.
- LEFFLER, H. & SVANBORG-EDÉN, C. 1981. Glycolipid receptors for uropathogenic *Escherichia coli* on human erythrocytes and uroepithelial cells. *Infection and Immunity* 34: 920-929.
- LEITE, D.S. 1986. Isolamento, purificação e caracterização de um novo fator de colonização (F42) de *Escherichia coli* enterotoxigênica de origem suína. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, SP.
- LEITE, D.S., GARCIA, M., YANO, T. & CASTRO, A.F.P. 1989. Detecção da adesina FY em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia no Brasil. *Revista de Microbiologia* 20: 292-295.
- LEITE, D.S., YANO, T. & CASTRO, A.F.P. 1988. Production, purification, and partial characterization of a new adhesion factor (F42) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. *Annales de l'Institut Pasteur Microbiologie* 139: 295-306.
- LEVINE, M.M. 1984. *Escherichia coli* infections. In: *Bacterial Vaccines*, cap. 7, pp. 187-235, London, Academic Press.
- LEVINE, M.M. 1985. *Escherichia coli* infections. *New England Journal of Medicine* 313: 445-447.

- LEVINE, M.M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *Journal of Infectious Diseases* 155: 377-389.
- LEVINE, M.M., CAPLAN, E.S., WATERMAN, D., CASH, R.A., HORNICK, R.B. & SNYDER, M.J. 1977. Diarrhea caused by *Escherichia coli* that produce only heat-stable enterotoxin. *Infection and Immunity* 17: 78-82.
- LEVINE, M.M., REWNELS, M.B., DAYA, V. & HUGHES, T.P. 1980. Haemagglutination and colonization factors in enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* that cause diarrhea. *Journal of Infectious Diseases* 141: 733-737.
- LINDAHL, M. & WADSTROM, T. 1981. K99 surface hemagglutinin of enterotoxigenic *Escherichia coli* recognizes terminal N-acetylgalactosamine and other complex glycoconjugates. *Veterinary Microbiology* 9: 254-257.
- LINDBERG, F., LUND, B., JOHANSSON, L. & NORMARK, S. 1987. Localization of the receptor-binding protein adhesin at the tip of the bacterial pilus. *Nature* 328: 87-89.
- LINGGOOD, M.A. & THOMPSON, J.M. 1987. Verotoxin production among porcine strains of *Escherichia coli* and its association with aedema disease. *The Journal of Medical Microbiology* 24:359-362.

- LINTERMANS, P.F., POHL, P., BERTELS, A., CHARLIE, G., VANDEKERCKHOUE, J., Van DAMME, J., SCHOUF, J., SCHILICKER, C., KORHONEN, T., deGREVE, H. 1988. Characteristics and purification of the F17 adhesin on the surface of bovine enteropathogenic and septicemic *Escherichia coli*. American Journal of Veterinary Research 49: 1794-1799.
- LOUREIRO, E.D.B., SERAFIM, M.B., LINHARES, A.C. & CASTRO, A.F.P. 1983. *Escherichia coli* enterotoxigênicas e rotavírus detectadas em crianças com gastroenterite aguda em Belém, Pará. Revista de Microbiologia 14: 129-135.
- LOW, D.A., BRAATEN, B.A., LING, G.V., JOHNSON, D.L., RUBY, A.L. 1988. Isolation and comparison of *Escherichia coli* strains from canine and human patients with urinary tract infections. Infection and Immunity 56: 2601-2609.
- MACRINA, F.L., KOPECKO, D.J., JONES, K.R., AYERS, D.J. & MCCOWEN, S.M. 1978. A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. Plasmid 1: 417-420.
- MAGALHÃES, M., ANDRADE, M. & CARVALHO, A.E. 1981. Pathogenic *Escherichia coli* associated with infantile diarrhea. Revista de Microbiologia 12: 38-41.
- MARQUES, L.R.M., MOORE, M.A., WELLS, J.G., WACHSMUTH, I.K. & O'BRIEN, A.D. 1986. Production of Shiga-like toxins by *Escherichia coli*. Journal of Infectious Diseases 154: 338-341.

- MATHEWSON, J.J., JOHNSON, P.C., DuPONT, H.L., MORGAN, D.R., THORNTON, S.A., WOOD, L.V. & ERICSON, C.D.A. 1985. A newly recognized cause of travelers' diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases* 151: 471-475.
- MATHEWSON, J.J., JOHNSON, P.C., DuPONT, H.L., SATTERWHITE, T.K. & WINSOR, D.K. 1986. Pathogenicity of enteroadherent *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases* 154: 524-527.
- MAURER, L. & ORNDORFF, P.E. 1987. Identification and characterization of genes determining receptor binding and pilus length of *Escherichia coli* type I pili. *Journal of Bacteriology* 169: 640-645.
- McCONNEL, M.M., SMITH, H.R., WILLSHAW, G.A., SCOTLAND, S.M. & ROWE, B. 1980. Plasmids coding for heat-labile enterotoxin production isolated from *Escherichia coli* 078: comparison of their properties. *Journal of Bacteriology* 143: 158-167.
- McCONNEL, M.M., SMITH, H.R., WILLSHAW, G.A., FIELD, A.M. & ROWE, B. 1981. Plasmids coding for colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin production isolated from enterotoxigenic *Escherichia coli* : comparison of their properties. *Infection and Immunity* 32: 927-936.

- McCONNELL, M.M., THOMAS, L.V., WILLSHAW, G.A., SMITH, H.R. & ROWE, B. 1986. Genetic control and properties of coli surface antigens of colonization factor antigen IV (PCF8775) of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 56: 1974-1980.
- McCONNELL, M.M., WILLSHAW, G.A., SMITH, H.R., SCOTLAND, S.M. & ROWE, B. 1979. Transposition of ampicillin resistance to an enterotoxin plasmid in *Escherichia coli* strain of human origin. *Journal of Bacteriology* 139: 346-355.
- MEADE, H.M. & SIGNER, E.R. 1977. Genetic mapping of *Rhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 74: 2076-2078.
- MERSON, M.H., ØRSKOV, F., ØRSKOV, I., SACK, R.B., HUQ, I. & KOSTER, F.T. 1979. Relationship between enterotoxin production and serotype in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 23: 325-329.
- METT, H., KLOETZLEN, L. & VOSBECK, K. 1983. Fimbria-specific antibodies detach *Escherichia coli* from human cells. *Infection and Immunity* 40: 862-868.
- MEYERS, J.A., SANCHES, D., ELWELL, L.P. & FALKOW, S. 1976. Simple agarose electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology* 127: 1529-1537.

- MOHAMMAD, A., PEIRIS, J.S.M., WIJEWANTA, E.A., MAHALINGAM, S. & GUNASEKARA, G. 1985. Role of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in cattle and buffalo calf diarrhoea. *FEMS Microbiology Letters* 26: 281-283.
- MOOI, F.R. & deGRAAF, F.K. 1979. Isolation and characterization of K88 antigens. *FEMS Microbiology Letters* 5: 17-20.
- MOOI, F.R., deGRAAF, F.K. & van EMBDEN, J.D.A. 1979. Cloning, mapping and expression of the genetic determinant that encodes for the K88ab antigen. *Nucleic Acids Research* 6: 849-865.
- MOOI, F.R., HARMS, N., BAKKER, D. & deGRAAF, F.K. 1981. Organization and expression of genes involved in the production of the K88ab antigen. *Infection and Immunity* 32: 1155-1163.
- MOON, H.W. 1981. Protection against enteric colibacillosis in pigs suckling orally vaccinated dams: evidence for pili as protective antigens. *American Journal of Veterinary Research* 42: 173-177.
- MOON, H.W., BAETZ, A.L. & GIANNELLA, R.A. 1983. Immunization of swine with heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin coupled to carrier protein does not protect suckling pigs against an *Escherichia coli* strain that produces heat-stable enterotoxin. *Infection and Immunity* 39: 990-992.

- MOON, H.W., KOHLER, E.M., SCHNEIDER, R.A. & WHIPP, S.C. 1980. Prevalence of pilus antigens, enterotoxins types and enteropathogenicity among K88-negative enterotoxigenic *Escherichia coli* from neonatal pigs. *Infection and Immunity* 27: 222-230.
- MOON, H.W. & McDONALD, J.S. 1983. Antibody response of cows to *Escherichia coli* pilus antigen K99 after oral vaccination with live or dead bacteria. *American Journal of Veterinary Science* 44: 493-496.
- MOON, H.W., NAGY, B., ISAACSON, R.E. & ØRSKOV, I. 1977. Occurrence of K99 antigen on *Escherichia coli* isolated from pigs and colonization of pig ileum by K99+ enterotoxigenic *E. coli* of calves and pigs. *Infection and Immunity* 15: 614-620.
- MOON, H.W., WHIPP, S.C., ARGENZIO, R.A., LEVINE, M.M. & GIANELLA, R.A. 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infection and Immunity* 41: 1340-1351.
- MOON, H.W., WHIPP, S.C., SKARTVEDT, S.M. 1976. Etiologic diagnosis of diarrreal diseases of calves: Frequency and methods of detecting enterotoxin and K99 antigen production by *Escherichia coli*. *American Journal of Veterinary Research* 37: 1025-1029.

- MORGAN, R.L., ISAACSON, R.E., MOON, H.W. & BRINTON, C.C. 1978. Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced diarrheal disease by vaccinating dams with purified 987F or K99 pili: protection correlates with pilus homology of vaccine and challenge. *Infection and Immunity* 22: 771-777.
- MORRIS, J.A., SOJKA, W.J. & READY, R.A. 1985. Serological comparison of the *Escherichia coli* prototype strains for the F(Y) and Att25 adhesins implicated in neonatal diarrhea in calves. *Research in Veterinary Science* 38: 246-247.
- MORRIS, J.A., STEVENS, A.E. & SOJKA, W.J. 1977. Preliminary characterization of cell-free K99 antigen isolated from *Escherichia coli* B41. *Journal of General Microbiology* 99: 353-357.
- MORRIS, J.A., STEVENS, A.E. & SOJKA, W.J. 1978. Isoelectric point of cell-free K99 antigen exhibiting hemagglutinating properties. *Infection and Immunity* 19: 1097-1098.
- MORRIS, J.A., THORNS, C., SCOTT, A.C., SOJKA, W.J. & WELLS, G.A. 1982. Adhesion in vitro and in vivo associated with an adhesive antigen (F41) produced by a K99 mutant of the reference strain *Escherichia coli* B41. *Infection and Immunity* 36: 1146-1153.
- MORRIS, J.A., THORNS, C.J. & SOJKA, W.J. 1980. Evidence for two adhesive antigens on the K99 reference strain *Escherichia coli* B41. *Journal of General Microbiology* 118: 107-113.

- MORRIS, J.A., THORNS, C.J., WELLS, G.A. & SOJKA, W.J. 1983. The production of F41 fimbriae by piglet strains of enterotoxigenic *Escherichia coli* that lack K88, K99 and 987P fimbriae. *Journal of General Microbiology* 129: 2753-2759.
- MORRIS, J.A., WRAY, C. & SOJKA, W.J. 1980. Passive protection of lambs against enteropathogenic *Escherichia coli*: role of antibodies in serum and colostrum of dams vaccinated with K99 antigen. *The Journal of Medical Microbiology* 13: 265-271.
- MORRISSEY, P.M. & DOUGAN, G. 1986. Expression of a cloned 987P adhesion-antigen fimbrial determinant in *Escherichia coli* K12 strain HB101. *Gene* 43: 79-84.
- MOSELEY, S.L., ESCHEVERRIA, P., ERIWATANA, J., TIRAPAT, C., CHAICUMPA, W., SAKULDAIEARA, T. & FALKOW, S. 1982. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* by colony hybridization using three enterotoxin gene probes. *Journal of Infectious Diseases* 145: 863-869.
- MOSELEY, S.L. & FALKOW, S. 1980. Nucleotide sequence homology between the heat-labile enterotoxin gene of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology* 144: 444-446.

- MOSELEY, S.L., HARDY, J.W., HUG, M.I., ESCHEVERRIA, P. & FALKOW, S. 1983. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 39: 1167-1174.
- MOSELEY, S.L., HUG, I., ALIM, A.R.M.A., SO, M., SAMADPOUR-MOTALEBI, M. & FALKOW, S. 1980. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* by DNA colony hybridization. *Journal of Infectious Diseases* 142: 892-898.
- MURAHOSCHI, J. & TRABULSI, L.R. 1981. Aspectos etiológicos e epidemiológicos das diarreias infecciosas bacterianas. In: TRABULSI, L.R. *Microbiologia das Infecções Intestinais*. SP, Atheneu, pp. 11-24.
- MURRAY, B.E., EVANS Jr., D.J., PENARANDA, M.E. & EVANS, D.G. 1983. CFA/I-ST plasmids: comparison of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) of serogroups O25, O63, O78 and O128 and mobilization from an R-factor-containing epidemic ETEC isolate. *Journal of Bacteriology* 153: 566-570.
- MYERS, L.L. 1980. Passive protection of calves against experimentally induced and naturally occurring enteric colibacillosis. *American Journal of Veterinary Research* 41: 1952-1956.
- MYERS, L.L. & GUINÉE, P.A.M. 1976. Occurrence and characteristics of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea. *Infection and Immunity* 13: 1117-1119.

- NAGY, B. 1980. Vaccination of cows with a K99 extract to protect newborn calves against experimental enterotoxigenic colibacillosis. *Infection and Immunity* 27: 21-24.
- 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 antigen and by some acapsular mutants. *Infection and Immunity* 13: 1214-1220.
- NAGY, B., MOON, H.W. & ISAACSON, R.E. 1977. Colonization of porcine intestine by enterotoxigenic *Escherichia coli*: selection of piliated forms in vivo, adhesion of piliated forms to epithelial cells in vitro, and incidence of a pilus antigen among porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 16: 344-352.
- NAGY, B., MOON, H.W. & ISAACSON, R.E., TO, C.C. & BRINTON, C.C. 1978. Immunization of suckling pigs against enteric enterotoxigenic *Escherichia coli* infection by vaccinating dams with purified pili. *Infection and Immunity* 21: 269-274.
- NICOLETTI, M., SUPERTI, F., CONTI, C., CALONI, A. & ZAGAGLIA, C. 1988. Virulence factors of lactose-negative *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea in Somalia. *Journal of Clinical Microbiology* 26: 524-529.
- O'BRIEN, A.D. & HOLMES, R.K. 1987. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiological Reviews* 51: 206-220.

- O'BRIEN, A.D., LAVECK, G.D., THOMPSON, M.R. & FORMAL S.B. 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases* 146: 763-769.
- O'BRIEN, A.D., LAVECK, G.D. 1983a. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 40:675-683.
- O'BRIEN, A.D., LIVELY, T.A., CHEN, M.E., ROTHMAN, S.W. & FORMAL, S.B. 1983b. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. *Lancet* 1: 702-703.
- OLIVEIRA, M.S., CASTRO, A.F.P., SERAFIM, M.B. & PORTUGAL, M.A.S.C. 1982. Produção de enterotoxinas e resistência a drogas em colibacilos isolados de suínos com diarreia. *Revista de Microbiologia* 13: 135-142.
- OLSEN, R.H. & SHIPLEY, P. 1973. Host range and properties of the *Pseudomonas aeruginosa* R factor R1822. *Journal of Bacteriology* 77:772-780.
- ONO, E., ABE, K., NAKAZAWA, M. & NAIKI, M. 1989. Ganglioside epitope recognized by K99 fimbriae from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 57: 907-911.

- ØRSKOV, F., ØRSKOV, I., EVANS Jr., D.J., SACK, R.B., SACK, D.A.
& WADSTROM, T. 1976. Special *Escherichia coli* serotypes among enterotoxigenic strains from diarrhea in adults and children. *Medical Microbiology and Immunology* 162: 73-80.
- ØRSKOV, I. & ØRSKOV, F. 1966. Episome-carried surface antigen K88 of *Escherichia coli*. I. Transmission of the determinant of the K88 antigen and influence on the transfer of chromosomal markers. *Journal of Bacteriology* 91: 69-75.
- ØRSKOV, I. & ØRSKOV, F. 1977. Special O:K:H serotypes among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains from diarrhea in adults and children. Occurrence of the CF (colonization factor) antigen and of hemagglutination abilities. *Medical Microbiology and Immunology* 163: 99-110.
- ØRSKOV, I. & ØRSKOV, F., JANN, B. & JANN, K. 1977. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriology Reviews* 41: 667-710.
- PAI, C.H., KELLY, J.K. & MEYERS, G.L. 1986. Experimental infection of infant rabbits with verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 51: 16-23.
- PENARANDA, M.E., EVANS, D.G., MURRAY, B.E. & EVANS Jr., D.J. 1983. ST:LT:CFA/II plasmids in enterotoxigenic *Escherichia coli* belonging to serogroups O6, O8, O80, O85 and O139. *Journal of Bacteriology* 154: 980-983.

- PICKETT, C.L., WEINSTEIN, D.L. & HOLMES, R.K. 1987. Genetics of type IIa heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*: operon fusions, nucleotide sequence, and hybridization studies. *Journal of Bacteriology* 169: 5180-5187.
- PORTER, F., KENWORTHY, R. & ALLEN, W.D. 1974. Effect of oral immunization with *Escherichia coli* antigens of postweaning enteric in the young pig. *Veterinary Research* 95: 99-104.
- RATNAM, S., MARCH, S.B., AHMED, R., BEZANSON, G.S. & KASATIYA, S. 1988. Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Journal of Clinical Microbiology* 26: 2006-2012.
- REIS, M.H.L., AFFONSO, M.H.T., TRABULSI, L.R., MAZAITIS, A.J., MAAS, R. & MAAS, W.K. 1980. Transfer of a CFA/I-ST plasmid promoted by a conjugative plasmid in a strain of *Escherichia coli* of serotype O128ac:H12. *Infection and Immunity* 29: 140-143.
- REIS, M.H.L., CASTRO, A.F.P., TOLEDO, M.R.F. & TRABULSI, L.R. 1979. Production of heat-stable enterotoxin by the O128 serogroup of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 24: 289-290.
- REIS, M.H.L., GUTH, B.E.C., GOMES, T.A.T., MURAHOSCHI, J. & TRABULSI, L.R. 1982. Frequency of *Escherichia coli* strains producing heat-labile toxin or heat-stable toxin or both in children with and without diarrhea in São Paulo. *Journal of Clinical Microbiology* 15: 1062-1064.

- REIS, M.H.L., MATOS, D.P., CASTRO, A.F.P., TOLEDO, M.R.F. & TRABULSI, L.R. 1980. Relationship among enterotoxigenic phenotypes, serotypes and sources of strains in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 28: 24-27.
- REIS, M.H.L., VASCONCELOS, J.C. & TRABULSI, L.R. 1980. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in some processed raw food from animal origin. *Applied and Environmental Microbiology* 39: 270-271.
- REITER, B., MARSHALL, V.M.E, BJORCK, L. & ROSEN, C-G. 1976. Nonspecific bactericidal activity of the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system of milk against *Escherichia coli* and some Gram-negative pathogens. *Infection and Immunity* 13: 800-807.
- RIZZO, E., TUCHIYA, H.N. & MARTINEZ, C.H. 1983. Técnicas básicas de cultura celular. Instituto Butantan e Instituto Adolfo Lutz, SP.
- ROBINSON, M.K., BENNETT, P.M., FALKOW, S. & DODD, H.M. 1980. Isolation of a temperature-sensitive derivative of RP1. *Plasmid* 3: 343-347.
- ROOSENDAAL, E., GAASTRA, W. & deGRAAF, F.K. 1984. The nucleotide sequence of the gene encoding the K99 subunit of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 22: 253-258.

RUNNELLS, P.L., MOON, H.W. & SCHNEIDER, R.A. 1980. Development of resistance with host age to adhesion of K99+ *Escherichia coli* to isolated intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity* 28: 298-300.

RUNNELLS, 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. *Infection and Immunity* 55: 555-558.

RUTTER, J.M. 1975. *Escherichia coli* infections in piglets, pathogenesis, virulence and vaccination. *Veterinary Research* 96: 171-175.

RYLEY, L.W., JUNIO, L.N., LIBAEK, L.B., SCHOOLNIK, G.K. 1987. Plasmid-encoded expression of lipopolysaccharide O-antigenic polysaccharide in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 55: 2052-2056.

SACK, R.B. 1975. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Annual Reviews of Microbiology* 29: 333-353.

SACK, R.B. 1978. The epidemiology of diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases* 137: 639-640.

- SACK, R.B., GORBACH, S.L., BANWELL, J.G., JACOBS, B., CHATTERJEE, B.D. & MITRA, R.C. 1971. Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with severe cholera-like disease. *Journal of Infectious Diseases* 123: 378-385.
- SACK, R.B., KLINE, R.L. & SPIRA, W.M.. 1988. Oral immunization of rabbits with enterotoxigenic *Escherichia coli* protects against intrainestinal challenge. *Infection and Immunity* 56: 387-394.
- SACK, D.A., McLAUGHLIN, J.C., SACK, R.B., ØRSKOV, F. & ØRSKOV, I. 1977. Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients at a hospital in Dacca. *Journal of Infectious Diseases* 135: 275-280.
- SAHORE, E.G., DEAN, A.G., HOLIK, K.J. & DAVIS, R.B. 1974. Enterotoxin producing *Escherichia coli* and diarrheal disease in adult travelers: a prospective study. *Journal of Infectious Diseases* 129: 577-582.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed., N.Y., Cold Spring Harbor Press.
- SATO, M.I., SANCHEZ, P.S. & MARTINS, M.T. 1983. Isolation of enterotoxigenic *Escherichia coli* in water and sewage in São Paulo, Brazil. *Revista de Microbiologia* 14: 276-281.

SCALETISKY, I.C.A., SILVA, M.L.M., REIS, M.H.L., AFFONSO, M.H.T. & TRABULSI, 1983. Ent plasmids, Col plasmids and drug resistance in *Escherichia coli* strains of human origin. *Revista Brasileira de Genética* 6: 1-14.

SCALETISKY, I.C.A., SILVA, M.L.M., REIS, M.H.L. & TRABULSI, L.R. 1982. *Escherichia coli* strains producing LT toxin isolated from processed food. *Revista de Microbiologia* 13: 236-241.

SCHENKEIN, I., GREEN, R.F., SANTOS, D.S. & MAAS, W.K. 1976. Partial purification and characterization of a heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 13: 1710-1720.

SCOTLAND, S.M., SMITH, H.R. & ROWE, B. 1985. Two distinct toxins active in Vero cells from *Escherichia coli* O157. *Lancet* 11: 885-886.

SHARP, P.A., SUGDEN, B. & SAMBROOK, J. 1973. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide eletrophoresis. *Biochemistry* 12: 3055.

SHERMAN, D.M., ACRES, S.D., SADOWSKY, P.L., SPRINGER, J.A., BRAY, B., RAYBOULD, T.J.G. & MUSCOPLAT, C.C. 1983. Protection of calves against fatal enteric colibacillosis by orally administered *Escherichia coli* K99-specific monoclonal antibody. *Infection and Immunity* 42: 653-658.

- SHERWOOD, D., SNODGRASS, D.R. & O'BRIEN, A.D. 1985. Shiga-like toxin production from *Escherichia coli* associated with calf diarrhea. *Veterinary Research* 116: 217-218.
- SHIFFERLI, D.M., BEACHEY, E.H. & TAYLOR, R.K. 1990. The 987P fimbrial gene cluster of enterotoxigenic *Escherichia coli* is plasmid encoded. *Infection and Immunity* 58: 149-156.
- SHIMIZU, M., SAKANO, T., YAMAMOTO, T. & KITAJIMA, K. 1987. Incidence and some characteristics of fimbriae FY and 31A of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Japan. *Microbiology and Immunology* 31: 417-426.
- SHIPLEY, P.L., DOUGAN, G. & FALKOW, S. 1981. Identification and cloning of the genetic determinant that encodes for the K88ac adherence antigen. *Journal of Bacteriology* 145: 920-925.
- SHIPLEY, P.L., GYLES, C.L. & FALKOW, S. 1978. Characterization of plasmids that encode for the K88 colonization antigen. *Infection and Immunity* 20: 559-566.
- SHIRATORI, T., INOUE, C., SUGAWARA, K., KUSANO, T. & KITAGAWA, Y. 1989. Cloning and expression of *Thiobacillus ferrooxidans* mercury ion resistance genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 171: 3458-3464.

- SILVA, M.L.M., MAAS, W.K., & GYLES, C.L. 1978. Isolation and characterization of enterotoxin-deficient mutants of *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 75:1384-1388.
- SILVA, M.L.M., REIS, M.H.L., & TRABULSI, L.R. 1981. Transfer of Ent and R plasmids in enterotoxigenic strains of *E. coli* 0128ac. Revista Brasileira de Genética 4: 713-717.
- SILVA, M.L.M., SCALETISKY, I.C.A., REIS, M.H.L., AFFONSO, M.H.T. & TRABULSI, L.R. 1983. Plasmid coding for drug resistance and production of heat-labile and heat-stable toxins harbored on *Escherichia coli* strain of human origin. Infection and Immunity 39: 970-973.
- SILVA, M.L.M., SCALETISKY, I.C.A. & VIOTTO, L.H. 1983. Non production of cytotoxin among enteropathogenic strains of *Escherichia coli* isolated in São Paulo, Brazil. Revista de Microbiologia 14: 161-162.
- SILVA, M.L.M., SEVERO, N.P.F., PUCCIA, R., COSTA, L.L.P. & TRABULSI, L.R. 1982. Lysogeny among enteropathogenic *E. coli* strains isolated in São Paulo between 1963 and 1981. Revista de Microbiologia 13: 325-331.
- SILVA, M.L.M., YAMAMOTO, M.A. & SEVERO, N.P.F. 1983. Resistência a drogas, lisigenia e produção de colicinas e hemolisinas em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênicas. Revista de Microbiologia 14: 254-258.

- SILVEIRA, W.D. 1986. Estudo plasmidial em amostras enterotoxigênicas de *Escherichia coli* produtoras do novo fator de colonização F42. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), SP.
- SIMÕES, M., SERAFIM, M.B., RODRIGUES, A.C., GIOGI, W., NETTO, L.P. & CASTRO, A.F.P. 1977. Amostras de *Escherichia coli*, de origem animal, produtoras de enterotoxina termo-estável (ST) isoladas de casos de diarreia em São Paulo, S.P. Revista de Microbiologia 8: 143-144.
- SMIT, H., GAASTRA, W., KAMERLING, J.P., VLIEGENTHART, J.F.G. & deGRAAF, F.K. 1984. Isolation and structural characterization of the equine erythrocyte receptor for enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 fimbrial adhesin. Infection and Immunity 46: 578-583.
- SMITH, H.W., GREEN, P. & PARCELL, Z. 1983. Vero cell toxins in *Escherichia coli* and related bacteria: transfer by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens and pigs. Journal of General Microbiology 129: 3121-3137.
- SMITH, H.W. & GYLES, C.L. 1970. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. The Journal of Medical Microbiology 3: 387-401.

SMITH, H.W. & HALLS, S. 1967. Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. *Journal of Pathology and Bacteriology* 93: 499-529.

SMITH, H.W. & HUGGINS, M.B. 1979. Experimental infections of calves, piglets and lambs with mixtures of invasive and enteropathogenic strains of *Escherichia coli*. *The Journal of Medical Microbiology* 12: 507-510.

SMITH, H.W. & LINGGOOD, M.A. 1972. Further observations on *Escherichia coli* enterotoxins with particular regard to those produced by atypical piglet strains and by calf and lamb strains. The transmissibility of these enterotoxins and of K antigen possessed by calf and lamb strains. *The Journal of Medical Microbiology* 5: 243-250.

SMITH, H.W. & PARCELL, Z. 1975. Transmissible substrate-utilizing ability in enterobacteria. *Journal of General Microbiology* 87: 129-140.

SMYTH, C.J. 1982. Two mannose-resistant haemagglutinins on enteropathogenic *Escherichia coli* of serotype O6:K15:H16 or H- isolated from travellers' and infantile diarrhoea. *Journal of General Microbiology* 128: 2081-2096.

SMYTH, C.J. 1984. Serologically distinct fimbriae on enterotoxigenic *Escherichia coli* of serotype O6:K15:H16 or H-. *FEMS Microbiology Letters* 21: 51-57.

- SO, M., BOYER, H.W., BETLACH, M. & FALKOW, S. 1976. Molecular cloning of an *Escherichia coli* plasmid determinant the encodes for the production of heat-stable enterotoxin. *Journal of Bacteriology* 128: 463-472.
- SO, M., CROSA, J.H. & FALKOW, S. 1975. Polynucleotide sequence relationships among Ent plasmids and the relationship between Ent and other plasmids. *Journal of Bacteriology* 121: 234-238.
- SO, M., DALLAS, W.S. & FALKOW, S. 1978. Characterization of an *Escherichia coli* plasmid encoding for the synthesis of a heat-labile (LT) toxin: molecular cloning of the toxin determinant. *Infection and Immunity* 21: 405-411.
- SO, M., HEFFRON, F. & MCCARTHY, B.J. 1979. The *Escherichia coli* gene encoding heat-stable toxin is a bacterial transposon flanked by inverted repeats of IS1. *Nature* 277: 453-456.
- SO, M. & MCCATHY, B.J. 1980. Nucleotide sequence of bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable toxin (ST) and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77: 4011-4015.
- SODERLIND, O. & MOLLBY, R. 1979. Enterotoxins, O-groups, K88 antigen in *Escherichia coli* from neonatal pigs with and without diarrhea. *Infection and Immunity* 24: 611-616.

- SODERLIND, O., OLSSON, E., SMYTH, C.J. & MOLLBY, R. 1982. Effect of parenteral vaccination of dams on intestinal *Escherichia coli* in piglets with diarrhea. *Infection and Immunity* 36: 900-906.
- SPEIRS, J.I., STAVRIC, S. & KONOWALCHUCK, J. 1977. Assay of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with vero cells. *Infection and Immunity* 16: 617-622.
- SPICER, E.K., KAVANAUGH, W.M., DALLAS, W.S., FALKOW, S., KONIGSBE, W.H. & SCHAFER, D.E. 1981. Sequence homologies between A subunits of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* enterotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 78:50-54.
- STIEGLITZ, H., FONSECA, R., OLARTE, J. & KUPERSZTOCH-PORTNOY, Y.M. 1980. Linkage of heat-stable enterotoxin activity and ampicillin resistance in a plasmid isolated from an *Escherichia coli* strain of human origin. *Infection and Immunity* 28: 617-620.
- STROCKBINE, H.A., MARQUES, L.R.M., NEWLAND, J.W., SMITH, H.W., HOLMES, R.K. & O'BRIEN, A.D. 1986. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infection and Immunity* 53: 135-140.
- TAKAO, T., HITOUJI, T., AIMOTO, S., SHIMONISHI, Y., HARA, S., TAKEDA, T., TAKEDA, Y. & MIWATANI, T. 1983. Amino acid sequence of a heat stable enterotoxin isolated from enterotoxigenic *Escherichia coli* strain 18D. *FEBS Letters* 152: 1-5.

- TAKEDA, Y., HONDA, T., TAGA, S. & MIWATANI, I. 1981. In vitro formation of hibrid toxins between subunits of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and those of cholera enterotoxin. *Infection and Immunity* 34: 341-346.
- TAKEDA, Y., TAGA, S. & MIWATANI, T. 1979. Purification of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 5: 181-186.
- TAYLOR, D.N., ECHEVERRIA, P., PAL, T., SETHABUTR, O., SAIBORISUTH, SRICHAMORN, S., ROWE, B. & GROSS, J. 1986. The role of *Shigella* spp., enteroinvasive *Escherichia coli* and other enteropathogens as causes of childhood dysentery in Thailand. *Journal of Infectious Diseases* 153: 1132-1138.
- TAYLOR, D.N., ECHEVERRIA, P., SETHABUTR, O., PITARANQSI, C., LEKSOMBOON, U., BLACKLOW, N., ROWE, B., GROSS, R. & GROSS, J. 1988. Clinical and microbiologic features of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infections detected by DNA hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 26: 1362-1366.
- THOMAS, L.V., McCONNELL, M.M., ROWE, B. & FIELD, A.M. 1985. The possession of three novel coli surface antigens by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains positive for the putative colonization factor PCF8775. *Journal of General Microbiology* 131: 2319-2326.

- THOMAS, L.V. & ROWE, B. 1982. The occurrence of colonization factor (CFA/I, CFA/II and E8775) in enterotoxigenic *Escherichia coli* from various countries in South East Asia. *Medical Microbiology and Immunology* 171: 85-90.
- TO, S.L.M. 1984. F41 antigen among porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* strains lacking K88, K99 and 987P. *Infection and Immunity* 43: 549-554.
- TOLEDO, M.R.F., ALVARIZA, M.C.B., MURAHOSCHI, J., RAMOS, S.R.T.S. & TRABULSI, L.R. 1983. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. *Infection and Immunity* 39: 586-589.
- TOLEDO, M.R.F., FONTES, C.F. & TRABULSI, L.R. 1982a. MILi - um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. *Revista de Microbiologia* 13: 230-235.
- TOLEDO, M.R.F., FONTES, C.F. & TRABULSI, L.R. 1982b. Modificação do meio de Rugai & Araujo para realização simultânea dos testes produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. *Revista de Microbiologia* 13: 305-315.
- TOMOEDA, M., INUZUKA, M., KUBO, N. & NAKAMURA, S. 1968. Effective elimination of drug resistance and sex factors in *Escherichia coli* by sodium dodecyl sulfate. *Journal of bacteriology* 95: 1078-1089.

- TRABULSI, L.R. 1981. Microbiologia das Infecções Intestinais. RJ, Atheneu, 135 p., vol I (Atualização em Microbiologia Clínica).
- TZIPORI, KARCH, H., WACHSMUTH, K.I., ROBINS-BROWNE, R.M., O'BRIEN, A.D., LIOR, H., COHEN, M.L., SMITHERS, J. & LEVINE, M.M. 1987. Role of a 60-megadalton plasmid and Shiga-like toxins in the pathogenesis of gnotobiotic piglets. *Infection and Immunity* 55: 3117-3125.
- vanDIE, I., WAUBEN, M., MEGEN, I. & BERGMANS, H. 1988. Genetic manipulation of major P-fimbrial subunits and consequences for formation of fimbriae. *Journal of Bacteriology* 170: 5870-5876.
- vanEMBDEN, J.D.A., deGRAAF, F.K., SCHOULS, L.M. & TEPPEMA, J.S. 1980. Cloning and expression of a deoxyribonucleic acid fragment that encodes for the adhesive antigen K99. *Infection and Immunity* 29: 1125-1133.
- VIAL, P.A., ROBINS-BROWNE, R., LIOR, H., PRADO, V., KAPER, J.B., NATARD, J.P., MANEVAL, D., ELSAYE, A. & LEVINE, M.M. 1988. Characterization of entero adherent aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *Journal of Infectious Diseases* 158: 70-79.
- WACHSMUTH, I.K., FALKOW, S. & RYDER, R.W. 1976. Plasmid mediated properties of a heat-stable enterotoxin producing *Escherichia coli* associated with infantile diarrhea. *Infection and Immunity* 14: 403-407.

- WADE, W.G., THOM, B.I. & EVANS, N. 1979. Cytotoxic enteropathogenic *Escherichia coli*. Lancet 2: 1235-1236.
- WACHSMUTH, I. K., FALKOW, S. & RYDER, R.N. 1976. Plasmid-mediated properties of a heat-stable enterotoxin-producing *Escherichia coli* associated with infantile diarrhea. Infection and Immunity 14: 403-407.
- WACHSMUTH, I. K., WELLS, J., SHIPLEY, P. & RYDER, R. 1979. Heat-labile enterotoxin production in isolates from a shipboard outbreak of human diarrheal illness. Infection and Immunity 24: 793-797.
- WANGER, A.R., MURRAY, B.E., ECHEVERRIA, P., MATHEWSON, J.J. & DuPONT, H.L. 1988. Enteroinvasive *Escherichia coli* in travellers diarrhea. Journal of Infectious Diseases 158:640-642.
- WHIPP, S.G., MOON, H.W. & ARGENZIO, R.A. 1981. Comparison of enterotoxigenic activities of heat-stable enterotoxins from class 1 and class 2 *Escherichia coli* of swine origin. Infection and Immunity 31: 245-251.
- WILLIAMS, P.H., SEDGWICK, M.I., EVANS, N., TURNER, P.J., GEORGE, R.H. & McNEISH, A.S. 1978. Adherence of an enteropathogenic strain of *Escherichia coli* to human intestinal mucosa is mediated by a colicinogenic conjugative plasmid. Infection and Immunity 22: 393-402.

- WILSON, M.W. & BETTELHEIM, K.A. 1980. Cytotoxic *Escherichia coli* serotypes. *Lancet* 1: 201.
- YAMAMOTO, T., GOJOBORI, T. & YOKOTA, T. 1987. Evolutionary origin of pathogenic determinants in enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* O1. *Journal of Bacteriology* 169: 1352-1357.
- YAMAMOTO, T. & YOKOTA, T. 1980. Cloning of deoxyribonucleic acid regions encoding a heat-labile and heat-stable enterotoxin originating from an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain of human origin. *Journal of Bacteriology* 143: 652-660.
- YAMAMOTO, T. & YOKOTA, T. 1981. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin genes are flanked by repeated deoxyribonucleic acid sequences. *Journal of Bacteriology* 145: 850-860.
- YAMAMOTO, T. & YOKOTA, T. 1983. Plasmids of enterotoxigenic *Escherichia coli* H10407: evidence for two heat-stable enterotoxin genes and a conjugal transfer system. *Journal of Bacteriology* 153: 1352-1360.
- YAMAMOTO, T., YOKOTA, T. & KAJI, A. 1981. Molecular organization of heat-labile enterotoxin genes originating in *Escherichia coli* human origin and construction of heat-labile toxoid-producing strains. *Journal of Bacteriology* 148: 983-987.

- YANO, T. 1986. Um provável antígeno de aderência do tipo fimbria em amostras de *Escherichia coli* verocitotoxigênicas (VTEC) de origem bovina. Tese de Livre-docência. Departamento de Microbiologia e Imunologia, Universidade Estadual de Campinas, SP
- YANO, T., GARCIA, M., LEITE, D.S., CAMARGO, I.J.B., CASTRO, A.F.P. 1988. Fimbria-like adhesive factor (EAF44) from a verocytotoxigenic *Escherichia coli* strain of bovine origin. *Research in Veterinary Science* 45:418-419.
- YANO, T., LEITE, D.S., CAMARGO, I.J.B. & CASTRO, A.F.P. 1986a. A probable new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. *Microbiology and Immunology* 30: 455-508.
- YANO, T., OLIVEIRA, M.S., FONTES, C.F., ALMEIDA, A.C.P. & CASTRO, A.F.P. 1982. Detection of heat-labile (LT) enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* by radial immune hemolysis test: a modification of clinical use. *Medical Microbiology and Immunology* 171: 171-178.
- YANO, T., TAMASHIRO, W.M.S.C., GARCIA, M. & CASTRO, A.F.P. 1986b. Detecção de verocitotoxina em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia. *Revista de Microbiologia* 17: 339-341.