

**BC/16699**  
**IB/80917**



CLEIDE MARQUES FERREIRA

*Este Exemplar corresponde a Realização Final da  
Tese Defendida pela candidata Cleide Marques  
Ferreira e Aprovada pela Comissão julgadora.  
Campinas, 29 de Abril de 1992.*

**ESTUDOS BIOLÓGICOS E GENÉTICOS DE UMA AMOSTRA  
DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÊNICA DE ORIGEM BOVINA.**

Dissertação apresentada ao  
Dept. de Genética e Evolução  
do Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção do  
título de Mestre em Ciências  
Biológicas.

**Orientador:** Prof. Dr. Tomomasa Yano

**Co-orientador:** Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Campinas - SP

T/UNICAMP

1992

F414<sub>e</sub>

UNICAMP

|                            |                                       |
|----------------------------|---------------------------------------|
| UNIDADE                    | IB 1151                               |
| N.º CHAMADA                | 414e                                  |
| .....                      |                                       |
| V. ....                    | EX. ....                              |
| TOMBO BC 16699             |                                       |
| PROC. 215/92               |                                       |
| C <input type="checkbox"/> | D <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO 6.820.000,00         |                                       |
| DATA 27/05/92              |                                       |
| N.º CPD                    |                                       |

CMO 24156-1

Ao meu filho BRUNO,  
por toda ternura que  
trouxe à minha vida,

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Ao Yano, pela orientação, compreensão, amizade e estímulo e, principalmente, pelo seu carinho e alegria constantes durante estes anos.

Ao Wanderley, pela orientação inestimável nos estudos de genética, por sua paciência, dedicação, empréstimo de espaço, equipamentos e reagentes e pela participação na pré-banca.

A Fabiana, minha amiga e irmã, por todo seu carinho, bondade, amizade e alegria.

Ao Gilson e Valéria, por todo os momentos maravilhosos que compartilhamos juntos.

Aos amigos Marcelo, Sergio, Paulo I e Paulo II, Vanessa, Cris e Eneida, por toda alegria, muito trabalho e pouco espaço que compartilhamos.

Ao Mingo, pela orientação nos primeiros tempos no laboratório, por suas dicas, amizade e sugestões.

A Sílvia, pela orientação na cultura de células, por todas suas sugestões e incentivo.

A Stella, pela amizade, disponibilidade e alegria com que sempre me recebeu.

Ao Aureo, pela maravilhoso trabalho de microscopia eletrônica, por toda sua ajuda e paciência na realização dos testes de adesão.

Ao Sr. Manuel, pelo preparo de meios, ajuda com os

animais e amizade no dia-a-dia.

Ao Sr.Garcia, pela ajuda com os animais.

Ao pessoal da Micro, Lucila, Marcina, Beth Pelosi, Isildinha, Natalícia, Mirtis, Fabrícia e Mara, por sua amizade e companheirismo.

Ao Dr. Pestana, pelo incentivo e participação na pré-banca.

A Dra. Marlene, pelo empréstimo de material e equipamentos.

Ao Zé Luis, pela participação na pré-banca.

A Sílvia e a Teresa da Secretaria da Pós-graduação, por sua paciência e disponibilidade.

A Terezinha, pela ajuda na realização das fotografias.

Ao André, que lutou comigo e por mim durante todo este tempo, pelo carinho, ajuda e compreensão nos momentos mais difíceis.

A minha mãe, meus irmãos e a minha família campineira (Lygia, Nana e Iza), minha "torcida organizada", por todo carinho e incentivo ao longo destes anos.

Ao CNPq, pela concessão da Bolsa de Mestrado.

## INDICE

|         |                                                       |    |
|---------|-------------------------------------------------------|----|
| 1.      | INTRODUÇÃO .....                                      | 1  |
| 2.      | REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....                           | 4  |
| 2.1.    | Fatores de colonização de <i>E. coli</i> humana ..... | 5  |
| 2.2.    | Fatores de colonização de <i>E. coli</i> animal ..... | 7  |
| 3.      | MATERIAL .....                                        | 14 |
| 3.1.    | Amostras bacterianas .....                            | 14 |
| 3.2.    | Meios de cultura .....                                | 16 |
| 3.2.1.  | Meio LB .....                                         | 16 |
| 3.2.2.  | Meio LA .....                                         | 16 |
| 3.2.3.  | Agar glicose .....                                    | 17 |
| 3.2.4.  | Minca .....                                           | 18 |
| 3.2.5.  | Meio mínimo .....                                     | 19 |
| 3.2.6.  | CFA .....                                             | 20 |
| 3.2.7.  | CAYE .....                                            | 21 |
| 3.2.8.  | Meio LAXP .....                                       | 22 |
| 3.2.9.  | Meio de Eagle .....                                   | 22 |
| 3.2.10. | Meio SOC .....                                        | 23 |
| 3.3.    | Soluções-estoque de antimicrobianos .....             | 24 |
| 3.4.    | Soluções de uso geral .....                           | 25 |
| 3.4.1.  | Tampão PBS pH 7,4 .....                               | 25 |
| 3.4.2.  | Tampão de EDTA 0,5M .....                             | 25 |
| 3.4.3.  | Solução de SDS 10% .....                              | 25 |
| 3.5.    | Solução para teste da toxina STa .....                | 26 |
| 3.5.1.  | Solução Azul de Evans 2% .....                        | 26 |

|         |                                                              |    |
|---------|--------------------------------------------------------------|----|
| 3.6.    | Soluções para teste de toxina LT .....                       | 26 |
| 3.6.1.  | Tampão trieta pH 7,4 (solução estoque) .....                 | 26 |
| 3.6.2.  | Tampão trieta pH 7,4 .....                                   | 26 |
| 3.7.    | Soluções para teste de hemaglutinação .....                  | 27 |
| 3.7.1.  | Solução de Alsever .....                                     | 27 |
| 3.7.2.  | Solução de citrato de sódio 3,8% .....                       | 27 |
| 3.8.    | Solução para preparo de antissoro .....                      | 27 |
| 3.8.1.  | Salina formolizada 0,5% .....                                | 27 |
| 3.9.    | Soluções para a microscopia eletrônica .....                 | 28 |
| 3.9.1.  | Solução de parlódio 0,5% .....                               | 28 |
| 3.9.2.  | Solução de PTA 1% .....                                      | 28 |
| 3.10.   | Soluções para marcação com ouro coloidal .....               | 28 |
| 3.10.1. | Tampão PBS-BSA .....                                         | 28 |
| 3.10.2. | Tampão Tris-BSA .....                                        | 29 |
| 3.11.   | Solução para teste de adesão em enterócitos ...              | 29 |
| 3.11.1. | Paraformaldeído 4% .....                                     | 29 |
| 3.12.   | Soluções para extração de DNA plasmidial .....               | 29 |
| 3.12.1. | Solução I .....                                              | 29 |
| 3.12.2. | Solução II .....                                             | 29 |
| 3.12.3. | Solução III .....                                            | 30 |
| 3.12.4. | Solução estoque de RNase .....                               | 30 |
| 3.12.5. | Solução de ressuspensão 6X .....                             | 31 |
| 3.13.   | Soluções para eletroforese de DNA em gel de<br>agarose ..... | 31 |
| 3.13.1. | Tampão TEB 5X .....                                          | 31 |
| 3.13.2. | Tampão TEB 1X .....                                          | 31 |
| 3.13.3. | Solução de brometo de etídio 1% .....                        | 32 |

|         |                                           |    |
|---------|-------------------------------------------|----|
| 3.14.   | Soluções para cura de plasmídios .....    | 32 |
| 3.14.1. | Brometo de etídio (20mg/ml) .....         | 32 |
| 3.14.2. | Solução de SDS 10% e novobiocina .....    | 32 |
| 3.15.   | Soluções para transformação .....         | 32 |
| 3.15.1. | Solução de cloreto de cálcio 0,1M .....   | 32 |
| 3.15.2. | Solução IV .....                          | 33 |
| 3.15.3. | IPTG 1M .....                             | 33 |
| 3.16.   | Soluções para SDS-PAGE .....              | 33 |
| 3.16.1. | Marcadores de peso molecular .....        | 33 |
| 3.17.   | Soluções para coloração de prata .....    | 35 |
| 3.17.1. | Fixador .....                             | 35 |
| 3.17.2. | Solução de etanol 50% .....               | 35 |
| 3.17.3. | Solução de pré-tratamento .....           | 35 |
| 3.17.4. | Solução de impregnação .....              | 36 |
| 3.17.5. | Solução reveladora .....                  | 36 |
| 3.17.6. | Solução de bloqueio da revelação .....    | 36 |
| 3.17.7. | Solução de metanol 50% .....              | 37 |
| 3.17.8. | Solução de preservação I .....            | 37 |
| 3.17.9. | Solução de preservação II .....           | 37 |
| 4.      | <b>MÉTODOS</b> .....                      | 38 |
| 4.1.    | Teste de produção de toxinas .....        | 38 |
| 4.1.1.  | Teste para a produção de toxina STa ..... | 38 |
| 4.1.2.  | Teste para a produção de toxina VT .....  | 39 |
| 4.1.3.  | Teste para a produção de LT-I .....       | 40 |
| 4.2.    | Teste de hemaglutinação .....             | 41 |
| 4.2.1.  | Teste de hemaglutinação em lâmina .....   | 41 |
| 4.2.2.  | Micro-hemaglutinação em placa .....       | 42 |



|           |                                                                     |    |
|-----------|---------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3.      | Teste de aglutinação com antissoro .....                            | 43 |
| 4.3.1.    | Preparo de antissoro .....                                          | 43 |
| 4.3.2.    | Reação de aglutinação .....                                         | 44 |
| 4.4.      | Teste de aglutinação com diferentes<br>antissoros .....             | 44 |
| 4.5.      | Visualização de fímbrias através da micorscopia<br>eletrônica ..... | 44 |
| 4.6.      | Marcação com ouro-coloidal .....                                    | 46 |
| 4.7.      | Adesão a enterócitos .....                                          | 47 |
| 4.7.1.    | Extração de adesinas da superfície bacteriana ..                    | 47 |
| 4.7.2.    | Preparo dos enterócitos e teste de adesão .....                     | 47 |
| 4.8.      | Teste de resistência a antimicrobianos .....                        | 49 |
| 4.9.      | Teste para a produção de colicina .....                             | 49 |
| 4.10.     | Extração do DNA plasmidial .....                                    | 50 |
| 4.11.     | Eletroforese do DNA plasmidial .....                                | 51 |
| 4.12.     | Experimentos de conjugação .....                                    | 52 |
| 4.12.1.   | Conjugação de J-1 X MS101 .....                                     | 52 |
| 4.12.2.   | Mutação com transposon Tnp <sup>hoA</sup> .....                     | 53 |
| 4.13.     | Eliminação de plasmídios .....                                      | 54 |
| 4.13.1.   | Através de plasmídios de incompatibilidade .....                    | 54 |
| 4.13.2.   | Com novobiocina .....                                               | 54 |
| 4.13.3.   | Com brometo de etídio .....                                         | 55 |
| 4.13.4.   | Com SDS .....                                                       | 55 |
| 4.13.4.1. | Da amostra J-1 .....                                                | 55 |
| 4.13.4.2. | Da mutante JS1 .....                                                | 55 |
| 4.14.     | Marcação com transposon para resistência a<br>antimicrobianos ..... | 56 |

|           |                                                                     |    |
|-----------|---------------------------------------------------------------------|----|
| 4.14.1.   | Extração do DNA plasmidial .....                                    | 57 |
| 4.14.2.   | Transformação com plasmídio pMR5 .....                              | 57 |
| 4.14.3.   | Transformação com plasmídio pNK862 .....                            | 59 |
| 4.14.3.1. | Transferência do transposon de pNK862 .....                         | 59 |
| 4.14.3.2. | Cura do plasmídio pNK862 .....                                      | 60 |
| 4.15.     | Hibridização para detecção de toxina STa .....                      | 60 |
| 4.16.     | Extração e eletroforese de proteínas .....                          | 61 |
| 4.16.1.   | Extração de proteínas de superfície .....                           | 61 |
| 4.16.2.   | Eletroforese em SDS-PAGE .....                                      | 62 |
| 4.16.3.   | Coloração de prata .....                                            | 63 |
| 5.        | <b>RESULTADOS.....</b>                                              | 64 |
| 5.1.      | Produção de toxina LT-I, VT e bacteriocina .....                    | 64 |
| 5.2.      | Teste de hemaglutinação .....                                       | 64 |
| 5.2.1.    | Hemaglutinação em lâmina .....                                      | 64 |
| 5.2.2.    | Micro-hemaglutinação .....                                          | 65 |
| 5.3.      | Caracterização sorológica .....                                     | 67 |
| 5.4.      | Visualização de fímbrias através de<br>microscopia eletrônica ..... | 67 |
| 5.5.      | Marcação com ouro coloidal .....                                    | 69 |
| 5.6.      | Aderência a enterócitos .....                                       | 69 |
| 5.7.      | Resistência a antimicrobianos .....                                 | 72 |
| 5.8.      | Padrão eletroforético do DNA plasmidial .....                       | 72 |
| 5.9.      | Análise da conjugação de J-i X MS101 .....                          | 74 |
| 5.10.     | Mutação com transposon TnpHoA .....                                 | 76 |
| 5.11.     | Cura de plasmídios .....                                            | 76 |
| 5.11.1.   | Através de plasmídios de incompatibilidade .....                    | 76 |
| 5.11.2.   | Utilizando novobiocina .....                                        | 76 |

|           |                                                          |     |
|-----------|----------------------------------------------------------|-----|
| 5.11.3.   | Através de brometo de etídio .....                       | 77  |
| 5.11.4.   | Com SDS .....                                            | 77  |
| 5.11.4.1. | Da amostra J-1 .....                                     | 77  |
| 5.11.4.2. | Da mutante JS1 .....                                     | 78  |
| 5.12.     | Resultados de marcação com transposon .....              | 78  |
| 5.12.1.   | Transformação com plasmídio pMR5 .....                   | 78  |
| 5.12.2.   | Transformação com plasmídio pNK862 .....                 | 80  |
| 5.12.2.1. | Transferência do transposon do plasmídio<br>pNK862 ..... | 82  |
| 5.12.2.2. | Cura com plasmídio pBR322 .....                          | 82  |
| 5.13.     | Análise de hibridização .....                            | 83  |
| 5.14.     | Análise do perfil eletroforético de proteínas ..         | 83  |
| 6.        | DISCUSSÃO .....                                          | 85  |
| 7.        | CONCLUSÃO .....                                          | 99  |
| 8.        | RESUMO .....                                             | 100 |
| 9.        | SUMMARY .....                                            | 102 |
| 10.       | REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....                         | 104 |

## INDICE DE TABELAS E FIGURAS

|                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Amostras de <i>Escherichia coli</i> utilizadas nos experimentos biológicos e genéticos .....                                                               | 15 |
| <b>Tabela 2.</b> Concentrações e diluentes dos estoques de antimicrobianos utilizados .....                                                                                 | 24 |
| <b>Tabela 3.</b> Padrão de hemaglutinação em lâmina na presença de D-manose da amostra de <i>E. coli</i> J-1 cultivada em diferentes meios de cultura a 37°C .....          | 66 |
| <b>Tabela 4.</b> Padrão de micro-hemaglutinação da amostra J-1 cultivada em meio de Minca e CFA a 37°C .....                                                                | 66 |
| <b>Figura 1.</b> Micrografia eletrônica da amostra de <i>Escherichia coli</i> J-1 cultivada em meio CFA, a 37°C (A) e 16°C (B), em coloração negativa com PTA .....         | 68 |
| <b>Figura 2.</b> Micrografia eletrônica da amostra de <i>Escherichia coli</i> J-1 marcada com ouro coloidal (Auro Probe). Antissoro anti-fímbrias aderido às fímbrias ..... | 70 |
| <b>Figura 3.</b> Fotomicrografia em microscópio de fluorescência. Imunocitoquímica com antissoro anti-fímbrias aderido à superfície de enterócitos isolados de bovino ..... | 71 |
| <b>Figura 4.</b> Perfil eletroforético de DNA plasmidial da amostra J-1 em gel de agarose 0,7% .....                                                                        | 73 |
| <b>Figura 5.</b> Perfil eletroforético de DNA plasmidial dos transconjugantes de J-1 e MS101, resistentes à estreptomicina, em gel de agarose 0,7% .....                    | 75 |
| <b>Figura 6.</b> Perfil eletroforético de DNA plasmidial de                                                                                                                 |    |

mutantes sensíveis à estreptomicina da amostra J-1 tratada com SDS, em gel de agarose 0,7% ..... 79

**Figura 7.** Perfil eletroforético de DNA plasmidial dos transformantes JSp1, JSpB1 e JSpB2 em gel de agarose 0,4% ..... 81

**Figura 8.** Perfil eletroforético das proteínas de membrana das amostras J-1 (F43ms<sup>+</sup>) e ORN (tipo 1<sup>+</sup>) em PAGE (13%), coradas pela prata ..... 84

## 1. INTRODUÇÃO

A enterobactéria *Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo que habita o intestino de homens e animais. A colonização ocorre logo após o nascimento e, uma vez estabelecida, a bactéria passa a fazer parte da flora normal do intestino (Graaf, 1990).

Existem, entretanto, muitas linhagens que são patogênicas, sendo capazes de causar doenças como meningites, septicemias, infecções do trato urinário e do próprio trato intestinal (Levine, 1987).

As *Escherichia coli* responsáveis por infecções do trato intestinal são classificadas em diferentes grupos, de acordo com suas propriedades de virulência, interação com a mucosa intestinal, sintomas clínicos, epidemiologia e sorotipos O:H (Levine, 1987).

A patogenicidade destes grupos não pode ser atribuída a um único determinante. Muitos fatores do patógeno, tanto de origem cromossômica como plasmidial, bem como uma série de fatores inerentes ao hospedeiro devem contribuir no processo de patogenicidade.

As *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) são uma das principais causas de diarreia em humanos e animais. Esta diarreia é causada, principalmente, pela (1) colonização da mucosa intestinal e (2) produção de toxinas que alteram o equilíbrio hidrossalino nas células epiteliais. Estas

toxinas estão divididas em dois grupos: toxinas termolábeis (LT) e toxinas termoestáveis (ST).

O outro fator determinante da infecção por *E. coli* enterotoxigênica é a adesão à mucosa intestinal. Esta adesão é geralmente mediada por fímbrias, estruturas de constituição proteica, também designadas antígenos de aderência, adesinas ou fatores de colonização.

Estas fímbrias tornam as bactérias capazes de aderir a receptores específicos das células do epitélio intestinal, permitindo assim a sua colonização e impedito a eliminação destas bactérias através dos movimentos peristálticos.

Apesar de todas as pesquisas que vêm sendo realizadas há mais de 20 anos, envolvendo toxinas e fímbrias, bem como a descoberta e conseqüentes estudos de novas fímbrias, resta esclarecer os fatores de patogenicidade envolvidos em muitos surtos diarreicos.

O presente trabalho visou estudar uma amostra de *E. coli*, designada J-1, isolada de bezerro com diarreia, produtora de toxina STa que, em testes preliminares, apresentou hemaglutinação manose-resistente com hemácias de rato e carneiro. Estes dados sugerem a presença de uma possível nova fímbria, não relacionada com outras fímbrias de *E. coli* de origem bovina já descritas.

Esta amostra foi avaliada quanto à produção de outras toxinas, padrão de hemaglutinação e de adesão.

Estudos de resistência à antimicrobianos, conjugação e eliminação plasmidial foram realizados, visando determinar os genes responsáveis pela expressão desta possível nova fímbria e da toxina STa.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Os primeiros relatos da presença de fímbrias em enterobactérias foram feitos por Anderson (1949, apud Brinton 1959) e Houwink & Van Itersen (1950, apud Brinton, 1959).

Estas fímbrias, designadas tipo 1, são encontradas na maioria das amostras de *E. coli*, tanto de origem animal quanto humana. Ligam-se a estruturas contendo açúcar D-manose na superfície de uma grande variedade de células eucarióticas, tendo, conseqüentemente, sua adesão inibida na presença deste monossacarídeo (Old, 1972). Estas fímbrias são estruturas rígidas, com 7 nm de diâmetro, compostas por uma subunidade proteica, denominada pilina, de 17 Kda e três subunidades de 28 Kda, 16,5 Kda e 14,5 Kda, associadas a ela (Hanson et al., 1988).

Bactérias com fímbrias do tipo 1 apresentam variação de fase, podendo passar da forma piliada para a não piliada e vice-versa (Brinton, 1959). Este processo consiste na inversão de um fragmento de 314pb contendo o promotor do gene *fimA*, que codifica a subunidade de pilina, flanqueado por repetições invertidas de 9pb (Abraham et al., 1985)

Os genes envolvidos na produção da fímbria tipo 1 encontram-se no cromossomo, na posição 98 minutos do mapa genético de *E. coli* (Backmann, 1983).

O envolvimento da fímbria tipo 1 em patogenicidade

é bastante controvertido. Embora bactérias que os possuem sejam capazes de aderir a um grande número de células epiteliais, seu papel no processo infeccioso não é conclusivo. Estas fímbrias estão presentes na maioria das amostras de *E. coli*, tanto da flora intestinal normal como em amostras enteropatogênicas, sendo diferenciada, portanto, de outras fímbrias posteriormente descritas, que estão associadas apenas a *E. coli* enterotoxigênicas e restritas a um número pequeno de sorogrupos.

#### 2.1. Fatores de colonização de amostras de *E. coli* humana

A primeira fímbria associada a *E. coli* enteropatogênica de origem humana foi inicialmente descrita por Evans et al. (1975) e designada CFA (colonization factor antigen). Esta fímbria apresentou hemaglutinação em presença de D-manose frente a hemácias humanas, de galinha e bovinas (Evans et al., 1979). Em 1978, Evans & Evans descreveram uma outra fímbria, encontrada nos sorogrupos 06 e 08. Evans et al. (1979), demonstraram que esta fímbria, à semelhança da fímbria CFA I, hemaglutinava hemácias humanas e de bovinos não hemaglutinando, no entanto, hemácias de galinha. A primeira fímbria encontrada foi então designada CFA I e a nova fímbria, CFA II.

Evans et al. (1975), trabalhando com uma amostra CFA I<sup>+</sup> do sorogrupo 078, determinaram que esta fímbria era

codificada por genes localizados em um plasmídio de aproximadamente 60 Mda, não conjugativo. Vários autores demonstraram que o plasmídio que codifica a fímbria CFA I também codifica enterotoxinas, principalmente toxina STa (Smith et al., 1979).

Smyth (1982), usando antissoro anti CFA II, demonstrou que CFA II não era uma única fímbria, mas um complexo antigênico composto de três fímbrias distintas, designadas CS1, CS2 e CS3. Smyth (1982) demonstrou a hemaglutinação de eritrócitos bovinos na presença dos antígenos CS1 e CS2, o que não foi verificado frente ao antígeno CS3.

Smith et al. (1983), demonstraram que os três antígenos de aderência de CFA II eram codificados por genes plasmidiais. Mullany et al. (1983), estudando dois plasmídios não-conjugativos similares, capazes de produzir CS1, CS2 e CS3, demonstraram que a expressão destes antígenos variava de acordo com o biotipo do hospedeiro. Assim, dependendo da célula hospedeira, detectava-se a expressão de CS1 e CS3, CS2 e CS3 ou apenas CS3.

Thomas et al. (1982) descreveram um novo antígeno designado E8775 (ou CFA IV), apresentando hemaglutinação manose-resistente de hemácias humanas e de bovinos. Posteriormente, reportou-se que esta fímbria também apresentava um sistema de fímbrias semelhante ao de CFA II, com três antígenos de aderência designados CS4, CS5 e CS6.

Os genes que codificam estas fimbrias foram localizados em plasmídios, em associação com a produção de enterotoxinas (Thomas et al., 1985).

Honda et al. (1984) descreveram um fator de colonização distinto de CFAI e CFA II. Este fator, designado 260-1 (ou CFA III) não apresentou hemaglutinação manose resistente de hemácias humanas ou bovinas. Esta fimbria foi capaz de aderir *in vivo* à células do epitélio intestinal de coelhos e camundongos recém-nascidos, além de se apresentar geneticamente relacionada à produção de toxina LT-I.

Tacket et al. (1987) descreveram um antígeno não hemaglutinante, associado a uma amostra de *E. coli* de origem humana, pertencente ao sorogrupo O159:H4, que foi denominado PCF0159 (putative colonization factor). Estes autores demonstraram, através de eletroforese em SDS-PAGE, que se tratava de uma fimbria diferente das já descritas, sendo sua presença detectada em diversas amostras deste mesmo sorotipo e em diversas partes do mundo. Também relataram que esta fimbria era codificada por genes localizados em plasmídio que também codificava toxinas STa e LT.

## 2.2. Fatores de colonização de amostras de *E. coli* animal

A primeira descrição de uma fimbria como sendo um fator de virulência em animais foi feita por Orskov et al. (1961). Estes autores denominaram a fimbria encontrada de

K88, por acreditar que se tratava de um antígeno capsular K. Em estudos posteriores (Smith & Halls, 1967; Jones & Rutter, 1972), verificou-se que este antígeno estava diretamente relacionado à diarreia suína, devido à alta frequência desta fímbria em amostras de *E. coli* isoladas de suínos.

Stirm et al. (1967) demonstraram a capacidade da fímbria K88 de aglutinar eritrócitos de cobaia em reações realizadas a 4°C, na presença de D-manose. Estes resultados foram confirmados por Jones & Rutter (1974), que também demonstraram que amostras K88<sup>+</sup> não hemaglutinavam quando eram cultivadas a 18°C.

Orskov et al. (1964) descreveram duas variantes antigênicas de K88, denominadas K88ab e K88ac. Perry & Porter (1978), trabalhando com grande variedade de hemácias, determinaram diferentes padrões de hemaglutinação nestas duas variantes. A variante "ab" reagiu melhor com hemácias de galinha, enquanto "ac" com hemácias de cobaia. Uma outra variante, denominada K88ad, foi posteriormente descrita (Guinée & Jansen, 1979), tendo sido diferenciada das demais apenas por testes sorológicos.

A fímbria K88 tem sido associada à produção de toxinas ST e LT. Embora Guinée & Jansen (1979) tenham encontrado muito mais amostras K88<sup>+</sup> produtoras de LT do que ST/LT, outros autores (Söderlind & Möllby, 1979) relataram que a predominância de uma ou outra toxina varia de acordo com o sorogrupo estudado.

O antígeno K88 foi a primeira adesina encontrada mediada por genes plasmidiais. Orskov & Orskov (1966) localizaram os genes responsáveis pela síntese desta fímbria em plasmídios transmissíveis, que normalmente possuíam genes responsáveis pela metabolização do açúcar rafinose. Entretanto, experimentos de conjugação e estudos de microscopia eletrônica realizados por Bak et al. (1972), questionaram a natureza transmissível dos plasmídios que codificam K88 e sugeriram que, provavelmente, os plasmídios de K88 poderiam ser dissociados em um fator de transferência e o plasmídio de K88 propriamente dito.

Shipley et al. (1978) posteriormente reportaram que os genes de K88 e de rafinose estavam presentes em um plasmídio não-conjugativo de 50 Mda. Em algumas das linhagens estudadas foram observados grandes plasmídios, aparentemente recombinantes entre os plasmídios K88-rafinose e do fator de transferência.

O antígeno K99 foi o segundo fator de virulência a ser descrito (Smith & Linggood, 1972), sendo inicialmente designado de "Kco" (common K antigen). Este foi encontrado em amostras de *E. coli* de origem bovina, suína e ovina. Orskov et al. (1975) designaram-no posteriormente de K99.

A atividade hemaglutinante do antígeno K99 foi descrita inicialmente por Orskov et al. (1975), que demonstraram a capacidade deste antígeno de hemaglutinar hemácias de cobaia na presença de D-manose, em reações a

4°C, quando a bactéria foi cultivada a 37°C. Como K88, o antígeno K99 não apresentou hemaglutinação quando cultivado a 18°C. Posteriormente demonstrou-se a hemaglutinação de K99 com hemácias de cavalo e carneiro (Tixer & Gouet, 1975 apud Graast & de Graaf, 1982).

Morris et al. (1978), trabalhando com um preparado de K99 livre de células, confirmaram estas observações, verificando a capacidade de hemaglutinação desta fímbria com hemácias de carneiro, cobaia e também humanas. Isaacson (1978), trabalhando com antígeno K99 purificado, contestou estas observações, sugerindo que o material utilizado por Morris e colaboradores continha uma outra adesina. Este autor verificou a presença de duas proteínas, com pesos aproximados de 22,2 Kda e 29,5 Kda, durante a purificação do antígeno K99, e que este antígeno purificado não hemaglutinava hemácias de cobaia.

Morris et al. (1982) posteriormente confirmaram esta hipótese, designando esta nova adesina de F41. Esta adesina mostrou ser composta de uma subunidade com peso de 29,5 Kda, com capacidade de hemaglutinar hemácias de cobaia e, mais fracamente, hemácias de carneiro e cavalo (de Graaf & Roorda, 1982).

A subunidade proteica da fímbria K99 purificada apresentou peso molecular de 18,5 Kda (de Graaf et al., 1981), hemaglutinando hemácias de cavalo e mais fracamente hemácias de carneiro, não apresentando hemaglutinação com

hemácias de cobaia.

A presença do antígeno K99 tem sido associada, em bovinos, à produção de toxina STa, com uma correlação de até 100% em alguns casos (Guinée & Jansen, 1979). Também em suínos a presença de fímbria K99 têm sido associada à produção de toxina STa, não tendo sido encontrada correlação com a produção de toxina LT (Castro et al, 1984).

O antígeno K99 foi o segundo a ser descrito como sendo mediado por plasmídios. Smith & Lingood (1972) reportaram que este fator de virulência era codificado por um plasmídio conjugativo, com um peso de 52 Mda (So et al., 1976).

de Graaf & Roorda (1982), utilizando antissoro anti-F41, não detectaram a presença deste antígeno em amostras que receberam o antígeno K99 por conjugação. Estes autores concluíram que os determinantes genéticos de F41 deveriam se encontrar em outro plasmídio, diferente de K99, ou seriam codificados por genes cromossômicos. Posteriormente, Moseley et al. (1986), através de hibridização, demonstraram que esta fímbria, diferentemente de K99 e K88, era codificada por genes cromossômicos.

Uma outra fímbria, diferente de K99 e K88, isolada de amostras de *E. coli* de suínos com diarreia, foi descrita por Nagy et al. (1976). Esta fímbria foi designada 987P, em referência à amostra de onde foi isolada (*E. coli* 987). Em estudos posteriores, mostrou-se a grande frequência desta



fímbria em suínos recém-nascidos com diarreia, chegando a ser isolada em 76% dos casos (Moon et al., 1980).

Em testes de hemaglutinação, Isaacson & Richter (1981) verificaram que esta fímbria não tem capacidade hemaglutinante frente a um grande número de hemácias, tanto a 4°C como em temperatura ambiente. Sua regulação não é dependente de temperatura e apresenta variação de fase como a fímbria tipo 1 (Nagy et al., 1977). Esta fímbria tem sido encontrada associada à produção de toxina STa (Moon et al., 1980). Graaf & Klaasen (1986), através de experimentos de hibridização demonstraram que os genes para esta fímbria estariam localizados no cromossomo. Entretanto, Shifferli et al. (1990) demonstraram a presença de genes que codificam esta fímbria em um plasmídio de 35 Mda.

Algumas amostras de *E. coli* isoladas de bovinos com diarreia na Europa (Contrepolis et al., 1982 apud Moon, 1990) e em particular na Inglaterra (Morris et al., 1985) produziram uma fímbria designada FY ou Att 25, comumente associada à fímbria K99. Outros autores relataram a presença desta fímbria no Japão (Shimizu et al., 1987) e no Brasil (Leite et al., 1989). Esta fímbria não tem sido relacionada à produção de toxinas, com exceção de uma amostra isolada por Morris et al. (1985), que produziu toxina STa associada à produção de F41. Lintermans et al. (1988), reportaram que os determinantes genéticos desta fímbria poderiam estar localizados no cromossomo, resultado

também encontrado posteriormente por Manfio (1990).

Yano et al., (1986a) demonstraram a presença de uma fímbria em amostras de *E. coli* isoladas de suínos com diarreia, designada F42, associada à toxina STa. Esta fímbria apresentou capacidade de hemaglutinação manose-resistente frente a hemácias humanas, de cavalo, carneiro, cobaio e mais fortemente com hemácias de galinha. Silveira et al. (1987) mostraram que os genes responsáveis pela expressão da fímbria F42 localizam-se em um plasmídio, associados aos genes para produção da toxina STa.

### 3. MATERIAL

#### 3.1. Amostras bacterianas

A amostra de *Escherichia coli* utilizada neste estudo, designada J-1, foi isolada de fezes diarreicas de bovino. Esta amostra, pertencente ao sorogrupo O159, é produtora de toxina termoestável STa e foi cedida pela Universidade de Osaka, Japão.

Nos experimentos de caracterização biológica e genética, foram utilizadas as amostras relacionadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Amostras de *Escherichia coli* utilizadas nos experimentos biológicos e genéticos

| Amostras bacterianas | Fenótipo                                                                                                            | Origem (coleção e/ou referência) |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| MS101                | Nal <sup>r</sup> , lac <sup>-</sup>                                                                                 | DMI <sup>a</sup>                 |
| DRN 115              | Tipo 1+                                                                                                             | Orndorff, 1985                   |
| B41                  | K99+, F41+, ST-I, O101:K-                                                                                           | DMI <sup>a</sup>                 |
| 195/1/7              | K88+                                                                                                                | DMI <sup>a</sup>                 |
| H-30                 | VT+                                                                                                                 | DMI <sup>a</sup>                 |
| 40T                  | LT+                                                                                                                 | DMI <sup>a</sup>                 |
| HB101                | pNK 862 <sup>b</sup> , ptac, Km <sup>r</sup>                                                                        | Way et al., 1984                 |
| HB101                | pBR 322 <sup>b</sup> , Ap <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>                                                            | Bolivar & Backman, 1979          |
| HB101                | pMR5 <sup>b</sup> , Tc <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , TnA <sup>c</sup> (Ap <sup>r</sup> )                         | Robinson et al., 1980            |
| 711 F-               | lac+, p307 (54Md) <sup>b</sup>                                                                                      | DMI <sup>a</sup>                 |
| J-53                 | F-, pro, met, pRA1 <sup>b</sup> , Tc <sup>r</sup> , Su <sup>r</sup> , (Inc A)                                       | DMI <sup>a</sup>                 |
| J-53                 | F-, pro, met, pR391 <sup>b</sup> , Km <sup>r</sup> , (Inc J)                                                        | DMI <sup>a</sup>                 |
| J-53                 | F-, pro, met, pR478 <sup>b</sup> , Tc <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , (Inc S)                    | DMI <sup>a</sup>                 |
| J-53-1               | Nal <sup>r</sup> , F-, pro, met, pR40A <sup>b</sup> , Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , Su <sup>r</sup> , (Inc C) | DMI <sup>a</sup>                 |
| J-53-1               | Nal <sup>r</sup> , F-, pro, met, pRP4 <sup>b</sup> , Ap <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , (Inc P)  | DMI <sup>a</sup>                 |
| SM10 pir             | pRT733 <sup>b</sup> , Ap <sup>r</sup> , TnphoA <sup>c</sup> (Km <sup>r</sup> )                                      | Taylor et al., 1989              |
| C600                 | Nal <sup>r</sup> , F-                                                                                               | Young & Davis, 1983              |
| DH5alpha             | F-, r <sup>-</sup> , m <sup>+</sup>                                                                                 | DMI <sup>a</sup>                 |
| 22R80                | K-12 RCW                                                                                                            | Silveira, 1986                   |
| V517                 | referência de P.M.                                                                                                  | Macrina et al., 1978             |

<sup>a</sup> Depto. de Microbiologia e Imunologia, I. B., Unicamp

<sup>b</sup> plasmídeo contido na amostra

<sup>c</sup> transposon presente no plasmídeo

### 3.2. Meios de cultura

Todos os meios de cultura utilizados foram preparados com reagentes de grau P.A. e água destilada ou deionizada (Mili Q), e esterilizados por autoclavagem a 121°C por 20 min, a não ser quando especificado de outra maneira.

#### 3.2.1. Meio LB (Luria Bertani Medium; Miller, 1972.)

|                                        |         |
|----------------------------------------|---------|
| Tryptona .....                         | 10,0 g  |
| Extrato de levedura .....              | 5,0 g   |
| NaCl .....                             | 10,0 g  |
| H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. .... | 1000 ml |
| pH final 7,2                           |         |

#### 3.2.2. Meio LA (Luria Bertani Agar)

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| Agar bacteriológico ..... | 15,0 g  |
| Meio LB pH 7,2 .....      | 1000 ml |

A adição dos antimicrobianos, quando necessária, foi feita ao meio esterilizado e resfriado a 50°C, antes do preparo das placas.

**3.2.3. Meio de ágar glicose (Jones e Rutter, 1972)****a. Caldo Simples**

|                                        |         |
|----------------------------------------|---------|
| Extrato de carne .....                 | 1,0 g   |
| Peptona .....                          | 10,0 g  |
| NaCl .....                             | 5,0 g   |
| H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. .... | 1000 ml |

**b. Meio Base**

|                                        |         |
|----------------------------------------|---------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....  | 0,45 g  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... | 0,81 g  |
| Agar bacteriológico .....              | 12,00 g |
| Caldo simples .....                    | 1000 ml |

**c. Solução estoque de glicose 40%**

|                                        |        |
|----------------------------------------|--------|
| Glicose .....                          | 40,0 g |
| H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. .... | 100 ml |

A solução de glicose foi esterelizada por filtração em membrana Millipore 0,22 µm e mantida a -20°C.

**3.2.4. Meio Minca (Guinée et al., 1977 modificado)****a. Solução de sais**

|                                             |          |
|---------------------------------------------|----------|
| MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O ..... | 1,00 g   |
| MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O ..... | 0,10 g   |
| FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O ..... | 13,00 mg |
| CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O ..... | 0,04 g   |
| H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. ....      | 100 ml   |

A solução foi esterilizada por filtração em membrana Millipore 0,22 µm.

**b. Meio Base**

|                                                            |         |
|------------------------------------------------------------|---------|
| Extrato de levedura .....                                  | 1,00 g  |
| Casaminoácidos .....                                       | 1,00 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....                      | 1,36 g  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O ..... | 10,10 g |
| Agar bacteriológico .....                                  | 12,00 g |
| H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. ....                     | 1000 ml |

Foi adicionado 1,0 ml da solução de sais para cada 1000 ml de meio base esterilizado.

**3.2.5. Meio mínimo (Davis e Minglioli, 1950)****a. Solução estoque M.M. 20 X**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  ..... 60,0 g  
 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ..... 140,0 g  
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ..... 20,0 g  
Citrato de sódio ..... 10,0 g  
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ..... 2,0 g  
 $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. .... 1000 ml  
pH final 7,4

**b. Meio mínimo Base**

Agar bacteriológico ..... 20,0 g  
 $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. .... 1000 ml

O meio base foi esterilizado e, após resfriamento a 50°C, suplementado com 50 ml da solução estoque e 12,5 ml de glicose 40 %.



**3.2.6. Meio CFA (Colonization Factor Agar ; Evans  
et al., 1980)**

**a. Solução A**

MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O ..... 0,5 g  
H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. .... 50 ml

**b. Solução B**

MnCl<sub>2</sub>. 7H<sub>2</sub>O ..... 0,39 g  
H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. .... 50 ml

**c. Meio Base**

Extrato de levedura ..... 1,5 g  
Casaminoácidos ..... 10,0 g  
Agar bacteriológico ..... 20,0 g  
H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. .... 1000 ml

Foi adicionado 1,0 ml das soluções A e B para cada  
100 ml de meio base esterilizado.

### 3.2.7. Meio CAYE (Evans et al., 1973).

#### a. Solução de Sais

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| MgSO <sub>4</sub> ..... | 5,0 g |
| FeCl <sub>2</sub> ..... | 0,5 g |
| MnCl <sub>2</sub> ..... | 0,5 g |

A solução foi preparada dissolvendo-se os sais em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,001M e esterilizada por filtração em membrana Millipore 0,22 µm.

#### b. Meio Base

|                                        |         |
|----------------------------------------|---------|
| Extrato de levedura .....              | 6,00 g  |
| Casaminoácidos .....                   | 20,00 g |
| NaCl .....                             | 2,50 g  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....  | 8,75 g  |
| H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. .... | 1000 ml |
| pH final                               | 8,2     |

Foi adicionado 1,0 ml da solução de sais para cada 100 ml de meio base esterilizado.

### 3.2.8. Meio LAXP (Luria-Bertani Agar + BCIP)

O meio LAXP foi utilizado como meio de seleção de mutantes fosfatase alcalina-positivos nos experimentos de mutagênese com o transposon TnPho A.

#### Solução de BCIP (4mg/ml)

|                                       |      |
|---------------------------------------|------|
| BCIP .....                            | 4 mg |
| H <sub>2</sub> O Mili-Q esteril. .... | 1 ml |

O BCIP (5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato) foi dissolvido em 1 ml de H<sub>2</sub>O e filtrado em membrana Millipore 0,22 µm com uma seringa. Esta solução foi transferida para um tubo Eppendorf esterilizado e usada imediatamente.

Ao meio LA (2.2.2) esterilizado e resfriado, foi adicionada uma solução de BCIP para uma concentração final de 40µg/ml.

### 3.2.9. Meio de Eagle

O meio de Eagle foi utilizado para o crescimento de células Vero em cultura de tecido nos testes de detecção de verotoxina.

Este meio foi preparado segundo especificações do fabricante, o seu pH ajustado com uma solução de bicarbonato

de sódio a 10% e esterilizado por filtração em membrana Millipore 0,22  $\mu$ m.

Nas culturas celulares, o meio de Eagle foi suplementado com soro fetal bovino (Cultilab) em concentrações de 2% ou 10%

### 3.2.10. Meio SOC

|                                        |         |
|----------------------------------------|---------|
| Bacto-triptona .....                   | 20,0 g  |
| Extrato de levedura .....              | 5,0 g   |
| NaCl .....                             | 0,5 g   |
| KCl (250mM) .....                      | 10,0 ml |
| H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. .... | 1000 ml |
| pH 7,0                                 |         |

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

### 3.3. Soluções-estoque de antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos de procedência Sigma utilizados foram: ampicilina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, estreptomicina, canamicina, tetraciclina, gentamicina e novobiocina.

As concentrações e os diluentes empregados encontram-se na tabela 2.

**Tabela 2.** Concentrações e diluentes dos estoques de antimicrobianos utilizados.

| Drogas                 | Concentração                        |
|------------------------|-------------------------------------|
| Ap (ampicilina)        | 25 mg/ml em H <sub>2</sub> O mili Q |
| Cm (cloranfenicol)     | 25 mg/ml em etanol                  |
| Km (canamicina)        | 25 mg/ml em H <sub>2</sub> O mili Q |
| Sm (estreptomicina)    | 20 mg/ml em H <sub>2</sub> O mili Q |
| Tc (tetraciclina)      | 12,5 mg/ml em metanol               |
| Nal (ácido nalidíxico) | 25 mg/ml em NaOH 0,2N               |
| Gm (gentamicina)       | 8 mg/ml em H <sub>2</sub> O mili Q  |
| Nc (novobiocina)       | 25mg/ml em H <sub>2</sub> O mili Q  |

### 3.4. Soluções de uso geral

#### 3.4.1. Tampão PBS pH 7,4

|                                        |         |
|----------------------------------------|---------|
| NaCl .....                             | 8,00 g  |
| KCl .....                              | 0,20 g  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... | 1,44 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....  | 0,24 g  |
| H <sub>2</sub> O mili Q q.s.p. ....    | 1000 ml |

pH 7,4

#### 3.4.2. Solução de EDTA 0,5 M

|                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| EDTA. 2H <sub>2</sub> O .....       | 18,61 g |
| H <sub>2</sub> O Mili Q q.s.p. .... | 100 ml  |

pH 8,0

#### 3.4.3. Solução de SDS 10%

|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| SDS .....                           | 10 g   |
| H <sub>2</sub> O Mili Q q.s.p. .... | 100 ml |

### 3.5. Solução para teste da toxina STa

#### 3.5.1. Solução Azul de Evans 2%

Azul de Evans ..... 2,0 g  
Solução salina 0,85% ..... 100 ml

A solução foi filtrada em papel Whatmann nº3 e armazenada em frasco escuro à temperatura ambiente.

### 3.6. Soluções para teste de toxina LT-I

#### 3.6.1. Tampão Trieta pH 7,4 (Solução estoque)

MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O ..... 1,2 g  
CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O ..... 0,2 g  
NaCl ..... 75,0 g  
Trietanolamina ..... 34,7 g  
H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. .... 1000 ml

#### 3.6.2. Tampão Trieta pH 7,4

Solução estoque ..... 100 ml  
Gelatina ..... 0,5 g  
H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. .... 1000 ml

### **3.7. Soluções para teste de hemaglutinação**

#### **3.7.1. Solução de Alsever**

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

Após dissolvidos todos os reagentes, o pH da solução foi ajustado para 6,5 com uma solução de ácido cítrico 1M e esterilizada por filtração em membrana Millipore 0,22 µm.

#### **3.7.2. Solução de Citrato de Sódio 3,8%**

|                                        |        |
|----------------------------------------|--------|
| Citrato de sódio .....                 | 3,8 g  |
| H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. .... | 100 ml |

### **3.8. Solução para preparo de antissoro**

#### **3.8.1. Salina Formolizada 0,5%**

|                        |         |
|------------------------|---------|
| Formaldeído 37% .....  | 1,35 ml |
| NaCl 0,85% q.s.p. .... | 100 ml  |



### **3.9. Soluções para a Microscopia eletrônica**

#### **3.9.1. Solução de parlódio 0,5%**

Parlódio ..... 0,25 g

Acetato de amila ..... 50 ml

#### **3.9.2. Solução de PTA 1%**

Acido fosfotúngstico ..... 0,5 g

H<sub>2</sub>O Milli Q q.s.p. .... 50 ml

O pH da solução foi ajustado para 7,2 com solução KOH 10N e filtrada em membrana Millipore 0,22 µm.

### **3.10. Soluções para marcação com ouro coloidal**

#### **3.10.1. Tampão PBS-BSA (PBS 50mM pH7,4, BSA 1%)**

BSA ..... 1,0 g

Tampão PBS pH 7,4 ..... 100 ml

**3.10.2. Tampão Tris-BSA (Tris 20mM pH 8,0, BSA 1%)**

Trisma-base ..... 0,24 g  
NaCl ..... 0,80 g  
BSA ..... 1,00 g  
H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. .... 100 ml  
pH 8,0

**3.11. Soluções para teste de adesão em enterócitos****3.11.1. Paraformaldeído 4%**

Paraformaldeído ..... 4 g  
Tampão PBS q.s.p. .... 100 ml

**3.12. Soluções para extração de DNA plasmidial****3.12.1. Solução I (Tris 25 mM pH 8,0, EDTA 10mM)**

Tris ..... 0,3 g  
Solução estoque de EDTA ..... 2 ml  
H<sub>2</sub>O mili Q q.s.p. .... 100 ml

**3.12.2. Solução II (NaOH 0,2N, SDS 1%)**

|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| Solução de NaOH 10N .....           | 200 µl |
| Solução de SDS 10% .....            | 100 µl |
| H <sub>2</sub> O mili Q q.s.p. .... | 10 ml  |

**3.12.3. Solução III (acetato de sódio 3M)**

O acetato (13,61 g) foi dissolvido em um pequeno volume de H<sub>2</sub>O destilada (aproximadamente 30 ml) e o pH ajustado para 4,8 com ácido acético glacial concentrado. Completou-se o volume para 100 ml com H<sub>2</sub>O destilada.

**3.12.4. Solução estoque de RNase (RNase 10 mg/ml;**

NaCl 15mM; Tris 15mM pH 7,5)

|                                              |         |
|----------------------------------------------|---------|
| RNase .....                                  | 100 mg  |
| Tris .....                                   | 18,2 mg |
| NaCl .....                                   | 8,8 mg  |
| H <sub>2</sub> O mili Q esteril. q.s.p. .... | 50 ml   |

A solução estoque foi fervida em banho-maria por 15 min e armazenada a -20°C.

**3.12.5. Solução de ressuspensão 6X (Ficoll 400 15%**

Azul de bromofenol 0,25%; Xileno cianol FF  
0,25%; RNase 0,1 mg/ml)

Ficoll 400 ..... 7,500 g  
Azul de bromofenol ..... 0,125 g  
Xileno cianol FF ..... 0,125 g  
Solução estoque RNase ..... 500 µl  
H<sub>2</sub>O mili esteril. q.s.p. .... 50 ml

**3.13. Soluções para eletroforese de DNA em gel de  
agarose****3.13.1. Tampão TEB 5X**

Tris ..... 54 g  
Acido bórico ..... 27,5 g  
Solução de EDTA 0,5M ..... 20 ml  
H<sub>2</sub>O mili Q q.s.p. .... 1000 ml  
pH 8,0

**3.13.2. Tampão TEB 1X**

Tampão TEB 5X ..... 200 ml  
H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. .... 1000 ml  
pH 8,0

**3.13.3. Solução de Brometo de etídio 1%**

Brometo de etídio ..... 1,0 g  
H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. .... 100 ml

**3.14. Soluções para cura de plasmídios****3.14.1. Brometo de etídio (20mg/ml)**

Brometo de etídio ..... 0,4 g  
H<sub>2</sub>O mili Q esteril. .... 20 ml

**3.14.2. Solução de SDS 10% e novobiocina**

As soluções de SDS e novobiocina foram as mesmas utilizadas em protocolos anteriores (2.11.2. e 2.3.10., respectivamente).

**3.15. Soluções para transformação****3.15.1. Solução de Cloreto de Cálcio 0,1M**

CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O ..... 1,47 g  
H<sub>2</sub>O Mili Q q.s.p. .... 100 ml

**3.15.2. Solução IV (Acetato 0,1M; Tris 5mM)**

Acetato de sódio ..... 1,36 g  
Tris ..... 0,60 g  
H<sub>2</sub>O Milli Q q.s.p. .... 100 ml  
pH 8,0

**3.15.3. IPTG 1M (Isopropil tio- $\beta$ -D-galactose)**

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

A solução foi esterilizada por filtração em membrana Millipore 0,22  $\mu$ m e armazenada a -20°C.

**3.16. Soluções para SDS-PAGE**

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

### 3.16.1. Marcadores de peso molecular

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

| Proteínas            | PM (Kd) |
|----------------------|---------|
| Alfa-lactalbumina    | 14.400  |
| Inibidor de tripsina | 20.100  |
| Anidrase carbônica   | 30.000  |
| Ovalbumina           | 43.000  |
| Albumina             | 67.000  |
| Fosforilase b        | 94.000  |

O "pool" de proteínas foi dissolvido em 100  $\mu$ l de tampão de eletroforese, contendo 2,5% de SDS e 5% de beta-mercaptoetanol. A mistura foi fervida em banho-maria por 5 min.

A solução de proteínas foi armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para a coloração de prata, a solução foi diluída 50 vezes.

### 3.17. Soluções para coloração pela prata

#### 3.17.1. Fixador (Etanol 50%; Ácido acético 12%; 0,5 ml/l de formaldeído 37%)

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| Etanol .....                   | 500 ml |
| Ácido acético glacial .....    | 120 ml |
| Formaldeído 37% .....          | 0,5 ml |
| H <sub>2</sub> O Milli Q ..... | 380 ml |

#### 3.17.2. Solução de etanol 50%

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Etanol .....                     | 500 ml |
| H <sub>2</sub> O destilada ..... | 500 ml |

#### 3.17.3. Solução de pré-tratamento

(Tiossulfato de sódio 0,02%)

|                                                                         |        |
|-------------------------------------------------------------------------|--------|
| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> · 5H <sub>2</sub> O ..... | 0,06 g |
| H <sub>2</sub> O destilada .....                                        | 300 ml |



**3.17.4. Solução de impregnação** (Nitrato de prata  
0,2%; 0,75 ml/l de formaldeído 37%)

AgNO<sub>3</sub> ..... 0,6 g  
Formaldeído 37% ..... 225 µl  
H<sub>2</sub>O destilada ..... 300 ml

**3.17.5. Solução reveladora** (Carbonato de sódio 6%;  
tiosulfato de sódio 0,4 mg%; 0,5 ml/l de  
formaldeído 37%)

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ..... 18 g  
Solução de pré-tratamento ..... 6 ml  
Formaldeído 37% ..... 150 µl  
H<sub>2</sub>O destilada ..... 300 ml

**3.17.6. Solução de bloqueio da revelação**  
(Metanol 50%; Ácido acético 12%)

Metanol ..... 500 ml  
Ácido acético glacial ..... 120 ml  
H<sub>2</sub>O destilada ..... 380 ml

**3.17.7. Solução de metanol 50%**

Metanol ..... 500 ml  
H<sub>2</sub>O destilada ..... 500 ml

**3.17.8. Solução de preservação I (Metanol 30%)**

Metanol ..... 300 ml  
H<sub>2</sub>O destilada ..... 700 ml

**3.17.9. Solução de preservação II (Glicerol 3%)**

Glicerol ..... 30 ml  
H<sub>2</sub>O destilada q.s.p ..... 1000 ml

## 4. MÉTODOS

### 4.1. Teste de produção de toxinas

As amostras testadas para a produção de toxina VT, LT-I e STa foram inoculadas em 10 ml de meio CAYE e mantidas sob agitação a 37°C por 15-18 h. Esta suspensão foi centrifugada a 1.300 g por 40 min e o sobrenadante armazenado a 4°C.

Para o teste de toxina VT, uma alíquota de 1,0 ml dos sobrenadantes das amostras foi centrifugada a 12.000 g por 5 min e transferida para tubos Eppendorf esterilizados, aos quais adicionaram-se 5 µl da solução estoque de gentamicina (8mg/ml).

#### 4.1.1. Teste para a produção de toxina STa

O teste do camundongo recém-nascido (Dean et al., 1973) foi empregado para se verificar a produção de toxina STa da amostra selvagem J-1, mutantes e recombinantes obtidas a partir da mesma.

Um volume de 100 µl de solução de azul de Evans 2% foi adicionada a 1,0 ml dos sobrenadantes de cada amostra testada. Alíquotas de 0,1 ml foram inoculadas, por via intragástrica, em camundongos albinos suíços com cerca de 3 dias de idade. Os animais foram sacrificados 2 h após a

inoculação, e determinou-se a relação de peso do intestino / peso da carcaça. Quando esta relação for igual ou superior a 0,085 confirma-se a produção de toxina STa.

Foram utilizados como controles a mostra B41 (STa positivo) e MS101 ( STa negativo).

#### **4.1.2. Teste para a produção de toxina VT**

A capacidade de produção de toxina VT foi testada em cultura de células Vero, segundo metodologia descrita por Yano et al. (1986b), com modificações.

As placas de cultura de tecido contendo uma monocamada de células Vero foram fornecidas pela Salsbury Laboratórios Ltda. e incubadas por 24 h a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub>.

O meio de cultura das placas (meio de Eagle com soro) foi removido e alíquotas de 100 µl de meio sem soro e do sobrenadante das culturas bacterianas foram adicionados às placas.

As placas foram novamente incubadas e a leitura dos resultados foi feita 24 e 48 h após a incubação, com o auxílio de um microscópio fotônico invertido.

Foram consideradas positivas para a produção de verotoxina as amostras que apresentaram mais de 50% de lise celular. Como controles positivo e negativo foram utilizadas as amostras H-30 e MS101, respectivamente.

#### 4.1.3. Teste para a produção de LT-I

A capacidade de produção de toxina LT-I foi feita através do método de imuno-hemólise radial (IHR), descrito por Yano *et al.* (1982), com modificações.

As hemácias de carneiro foram lavadas com tampão Trieta preparando-se uma suspensão a 5%. O gel de imunodifusão foi preparado com 1% de agarose no mesmo tampão, liquefeito e resfriado a uma temperatura de 45°C, adicionando-se a suspensão de hemácias de carneiro para uma concentração final de 0,6%. Esta mistura foi vertida em uma placa de acrílico. Após a solidificação do gel foram feitos orifícios de 4mm de diâmetro aos quais adicionaram-se 20 µl do sobrenadante das culturas.

A placa foi mantida à temperatura ambiente em câmara úmida por 18 h. Um volume de 20 µl de antissoro antitoxina colérica (1:10) foi adicionada aos orifícios, e novamente incubou-se à temperatura ambiente em câmara úmida.

Após 4 h, a placa foi recoberta com 4 ml de complemento diluído (1:10). Após incubação em câmara úmida a 37°C por 1 a 2 h, o complemento foi retirado e procedeu-se à leitura.

A formação de halo de hemólise ao redor dos orifícios foi considerada como resultado positivo para a produção de LT-I. Como controle foram utilizadas as amostras 40T (LT-I positivo) e MS101 (LT-I negativo).

## **4.2. Teste de hemaglutinação**

As amostras bacterianas foram semeadas com alça de Drigalsky em placas contendo diferentes meios de cultura (AG, Minca, CFA e MM), a partir de um pré-inóculo em meio LB e incubadas a 37°C por 18 h ou a 16°C por 48 h.

Para obtenção de hemácias de boi, carneiro e cavalo os animais foram sangrados sob condições assépticas, sendo os sangues coletados homogeneizados em igual volume de solução de Alsever e estocados a 4°C.

Em relação as hemácias de galinha, homem, cobaia e rato a sangria foi feita de modo semelhante, sendo que os materiais foram coletados e homogeneizados em uma solução de citrato de sódio (1:1).

Para o teste de hemaglutinação, os diferentes eritrócitos foram lavados com solução salina e centrifugados a 600 g por 5 min. O sedimento foi homogeneizado em tampão PBS e novamente centrifugado. Repetiu-se a operação com tampão PBS com 1% de D-Manose. O sedimento de cada hemácia obtida foi diluído em tampão PBS com D-Manose para uma concentração final de 5% para o teste em lâmina, e de 1% para o teste de micro-hemaglutinação.

### **4.2.1. Teste de hemaglutinação em lâmina**

Um pequeno raspado do crescimento bacteriano foi

retirado com um palito esterilizado e homogeneizado em 20 µl de PBS mais D-manose em lâmina de vidro. Uma alíquota de 20 µl de cada suspensão de hemácias foi homogeneizada à suspensão bacteriana e, após 2 min, procedeu-se à leitura dos resultados.

#### 4.2.2. Micro-hemaglutinação em placa

Os testes de micro-hemaglutinação para determinação de adesinas de superfície foram feitos em micro placas com fundo em "U", segundo o método de Jones e Rutter (1974).

Adicionaram-se 50 µl de Tampão PBS com 1% de D-manose aos orifícios. Um raspado das suspensões bacterianas cultivadas a 37°C ou 16°C, nos meios CFA e Minca, foi homogeneizado neste tampão e, a seguir, 50 µl de diluições seriadas destas suspensões foram adicionadas aos orifícios da microplaca. Adicionaram-se 50 µl da suspensão de eritrócitos numa concentração de 1% aos orifícios da placa, incubando-se por 1 h a 4°C.

O teste de micro-hemaglutinação também foi realizado em ausência de D-Manose com hemácias de cobaia. Considerou-se como título de micro-hemaglutinação o valor da última diluição onde ocorreu hemaglutinação.

### 4.3. Teste de aglutinação com antissoro

#### 4.3.1. Preparo de antissoro

O antissoro anti-J-1 (bactéria total) foi obtido pela imunização de coelhos adultos com a amostra J-1. O cultivo foi feito em meio CFA, em garrafas de Roux por 18 h a 37°C. A cultura bacteriana foi ressuspensa em salina formolizada e o material centrifugado a 15.000 g por 10 min, sendo o precipitado ressuspensa em salina esterilizada, correspondendo ao tubo 3 da Escala de Mac Farland.

Coelhos albinos adultos foram inoculados por via intravenosa, conforme recomendado por Edwards & Ewing (1972). Uma semana após a última inoculação, fez-se a sangria total dos coelhos. O soro obtido foi armazenado a -20°C.

Para tornar o soro mais específico para fímbrias, este foi absorvido com suspensões da amostra J-1 cultivada a 18°C em meio CFA. Esta absorção foi feita até o soro não mais aglutinar com a cultura cultivada a 18°C, apresentando reação apenas com a cultura cultivada a 37°C.



#### 4.3.2. Reação de aglutinação

As amostras mutantes e transconjugantes, a serem testadas para a expressão de fímbria presente na amostra J-1, foram cultivadas em meio LB a 37°C. Aliquotas de 100 µl de cada pré-inóculo foram transferidas para meio CFA e incubado a 37°C por 15 h.

Um raspado do crescimento bacteriano foi homogeneizado em 20 µl de salina esterilizada, em uma lâmina de vidro, adicionando-se 20 µl de antissoro e homogeneizando-se a mistura.

#### 4.4. Teste de aglutinação com diferentes antissoros

Para se verificar a produção de algumas das fímbrias comumente associadas a *E. coli* enteropatogênicas, a amostra J-1 foi testada frente a um grande número de antissoros anti-fímbrias conhecidos (K88, K99, 987P, EAF44, F42, F41, PCF0159, FY e 31A).

A amostra foi cultivada em meio LB por 12-18 h a 37°C. Aliquotas de 100 µl deste pré-inóculo foram transferidas para os meios que melhor expressam os diferentes antígenos a serem testados. Utilizou-se meio Mínimo para expressão da fímbria F42, Agar Glicose para K88, meio Minca para K99 e F41, meio Mac Conkey para PCF 0159 e meio CFA para EAF44, FY, 31A e 987P. O teste de aglutinação

foi realizado como descrito no item 4.3.2.

#### **4.5. Visualização de fímbrias através de Microscopia eletrônica**

Para a visualização da expressão de fímbrias pela amostra J-1 através de microscopia eletrônica, foram utilizadas telas de cobre de malha 400 "mesh". As telas foram preparadas através da deposição de uma película de parlódio e metalização com carbono.

A bactéria J-1 foi cultivada em placa de CFA a 37°C por 18 h ou a 18°C por 72 h. Com o auxílio de um palito, um raspado deste crescimento bacteriano foi ressuspendido em 100 µl de salina esterilizada. Uma gota desta suspensão foi colocada sobre papel Parafilm sendo recoberta por uma tela de cobre para microscopia eletrônica. Após 2 min, o excesso de líquido foi removido com papel de filtro e a tela colocada sobre uma gota de PTA 1% por 2 min. O excesso foi removido e a tela colocada em porta telas apropriado para secagem.

Telas contendo a bactéria J-1 cultivada em meio CFA líquido também foram preparadas como descrito anteriormente.

As telas foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL (Departamento de Histologia / ICB, USP), nos aumentos 20.000 e 50.000. As fotomicrografias

ampliadas em papel fotográfico Kodak F3.

#### **4.6. Marcação com ouro-coloidal**

O crescimento bacteriano, bem como o preparo inicial das telas foi feito como indicado no item 4.5.

Foram depositados 50  $\mu$ l de anticorpo anti-J-1 absorvido diluído (1:50) em Tampão PBS-BSA 1% sobre as telas contendo a suspensão bacteriana e incubou-se por 1 h em câmara úmida.

As telas foram lavadas duas vezes durante 5 min com tampão Tris-BSA 1%. Uma gota de antissoro Auro-Probe EM, produzido pela Janssen Biotech (anti-IgG de coelho marcado com ouro-coloidal) diluído (1:50) em PBS foi depositada sobre as telas, que foram incubadas por 1 h.

Após este período, foram lavadas duas vezes por 5 min com tampão Tris-BSA, seguindo-se uma lavagem com PBS. As telas foram então fixadas com glutaraldeído por 1 min e lavadas por duas vezes com água destilada.

Aliquotas de 50  $\mu$ l de PTA foram colocadas sobre papel Parafilm e as telas de cobre foram depositadas sobre estas gotas por 2 min. O excesso de líquido foi removido e as telas guardadas até o momento do uso. A visualização foi feita como indicado no item 4.5.

#### **4.7. Adesão a enterócitos**

##### **4.7.1. Extração de adesinas da superfície bacteriana**

A bactéria J-1 foi cultivada em meio CFA, por 18 h a 37°C. A cultura bacteriana foi ressuspensa em alga de Drigalsky em salina esterilizada.

A suspensão bacteriana foi aquecida a 60°C em banho-maria por 30 min. O material foi centrifugado a 15.000 g por 10 min e o sobrenadante precipitado com sulfato de amônia a 80%. A solução foi então centrifugada a 15.000 g por 20 min e o precipitado ressuspensa em tampão PBS a 4°C. O material foi dialisado por 18 h a 4°C sob agitação contra o mesmo tampão, que foi trocado diversas vezes.

##### **4.7.2. Preparo dos enterócitos e teste de adesão**

Intestino delgado de bezerro foi utilizado para os testes de adesão. Um segmento de intestino com aproximadamente 30 cm foi lavado cuidadosamente com PBS a 4°C. Foram feitas pequenas alças de 5 cm ao longo deste segmento. Durante todo o processo de lavagem e preparo das alças, o intestino permaneceu em um béquer contendo PBS a 4°C.

As alças foram inoculadas com 1,0 ml da suspensão de antígenos de superfície preparada anteriormente. O

material foi mantido em tampão PBS por 30 min à temperatura ambiente.

Após este período, as alças foram cortadas longitudinalmente e a parede interna das mesmas foi raspada delicadamente com o auxílio de uma lâmina de vidro. Os enterócitos removidos foram fixados com uma solução de paraformaldeído a 4% por 30 min à temperatura ambiente.

A suspensão de enterócitos foi então misturada com soro normal de coelho (1:1) e depositada em lâmina escavada. Após a secagem do material, este foi lavado com tampão PBS. Um volume de 50 µl de antissoro anti-J-1 diluído 1:50 foi colocado sobre a lâmina e incubou-se em câmara úmida por 1 hora a 37°C.

A lâmina foi novamente lavada com PBS e adicionaram-se 20 µl de soro de carneiro anti-IgG de coelho marcado com fluoresceína, diluído em PBS com azul de Evans 0,002% (diluição 1:20) por 1 hora a 37°C. Após nova lavagem com PBS, foi feita observação em microscópio de fluorescência.

Os enterócitos foram fotografados com filme colorido (ISO 400).

#### **4.8. Teste de resistência a antimicrobianos**

A bactéria J-1, juntamente com a linhagem MS101, foi testada frente aos seguintes antimicrobianos: ampicilina, cloranfenicol, canamicina, estreptomicina, tetraciclina e ácido nalidíxico.

As amostras foram inoculadas, a partir de um pré-inóculo em meio LB, em placas de Petri contendo 20 ml de meio LA com as seguintes concentrações de antimicrobianos: 0, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 350, 500, 750, e 1000 µg/ml.

Após a inoculação, as placas foram invertidas e incubadas a 37°C por 18 h. A maior concentração do antimicrobiano em que a bactéria ainda apresentou crescimento foi considerada como o nível de resistência das amostras.

#### **4.9. Teste para produção de colicina**

A bactéria J-1 foi inoculada por estria em meio LA e incubada a 37°C por 15 h. Na tampa da placa adicionaram-se 3,0 ml de clorofórmio, mantendo-se fechada por 30 min.

A placa foi então entreaberta em estufa a 37°C até completa evaporação do clorofórmio. Uma alíquota de 100 µl da cultura indicadora (22R80) cultivada em meio LB, foi homogeneizada com 4,0 ml de meio LB semi-sólido e vertida sobre a placa, que foi incubada a 37°C por 18 h.

A formação de um halo de inibição do crescimento da cultura ao redor da bactéria inoculada, indica a produção de colicina.

#### **4.10. Extração do DNA plasmidial**

Para a extração do DNA plasmidial, utilizou-se o método de lise alcalina de Birboin e Doly (1979), com modificações.

As culturas bacterianas foram inoculadas em 3,0 ml de meio LB e incubadas a 37°C por 12 h. Aliquotas de 1,0 ml dos crescimentos bacterianos foram transferidas para tubos Eppendorf e centrifugados por 1 min a 12.000g. Os sobrenadantes foram desprezados e os precipitados ressuspensos em 100 µl de solução I a 4°C, sendo mantidos em banho de gelo.

Após 5 min adicionaram-se 200 µl da solução II, seguido de suave inversão dos tubos que retornaram ao banho de gelo por 3 a 5 min. A seguir adicionou-se um volume de 150 µl da solução III e manteve-se em banho de gelo por 15 min, após várias inversões para homogeneização da mistura.

As suspensões foram centrifugadas a 12.000g por 5 min, e aliquotas de 400 µl dos sobrenadantes transferidas para outros tubos Eppendorf.

Adicionou-se 1,0 ml de etanol 100% a -20°C aos tubos, que, após várias inversões, foram mantidos a -20°C

por 1 hora.

Centrifugou-se o material a 12.000 g por 6 min para precipitar o DNA plasmidial. O sobrenadante foi rapidamente descartado e o excesso de líquido retirado com papel absorvente.

O sedimento foi ressuspensionado em 50 µl da solução I, adicionando-se a seguir 10 µl de solução de ressuspensão 6X aos tubos. O material foi homogeneizado e aplicado em gel de agarose.

#### **4.11. Eletroforese de DNA plasmidial**

O DNA plasmidial foi visualizado em gel de agarose submerso, através de eletroforese horizontal. Foram utilizados géis nas concentrações de 0,4% e 0,7%, com 3mm de espessura.

A agarose foi dissolvida em tampão TEB 1X e aquecida. A solução foi resfriada e vertida em placa de vidro selada lateralmente com fita adesiva. Um pente de acrílico foi utilizado para a formação das canaletas.

O gel foi transferido para cuba de eletroforese contendo tampão TEB 1X, em quantidade suficiente para cobrir o gel. Um volume de 20 µl das soluções contendo DNA plasmidial foi aplicado às canaletas.

Uma corrente de 15mA foi aplicada até a entrada das amostras no gel. A voltagem foi então mantida em 100 V



até o marcador azul de bromofenol atingir a extremidade oposta do gel.

O gel foi transferido para uma cuba contendo solução corante de brometo de etídio. Após 30 min, as bandas foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta.

Os géis foram fotografados com filme preto e branco (ISO 100).

#### **4.12. Experimentos de conjugação**

##### **4.12.1. Conjugação de J-1 X MS 101**

As amostras receptora e doadora, MS 101 e J-1 respectivamente, foram cultivadas em meio LB com antimicrobianos, por 15 h a 37°C.

Uma alíquota de 150 µl da amostra doadora foi transferida para tubo contendo 3 ml de meio LB (diluuição 1:20), com o antimicrobiano estreptomicina, e mantido a 37°C até atingir sua fase exponencial de crescimento.

Uma alíquota de 200 µl do caldo da amostra receptora em fase estacionária e 600 µl do caldo da doadora em fase exponencial foram centrifugados a 12.000 g por 2 min. Um volume de 500 µl de meio LB foi adicionado aos tubos para retirada dos antimicrobianos. Os tubos foram novamente centrifugados e os precipitados delicadamente ressuspensos em 70 µl de meio LB.

A mistura foi depositada sobre uma membrana de filtro Millipore (0,22  $\mu\text{m}$ ) esterilizada, previamente depositada sobre uma placa de Petri contendo meio LA. A placa foi invertida e incubada a 37°C por 15 h.

O filtro foi retirado da placa com uma pinça e transferido para tubo contendo 1,0 ml de meio LB. A suspensão foi diluída até  $1.10^{-3}$  e as diluições plaqueadas em meio LA mais os antimicrobianos estreptomicina e ácido nalidíxico.

A presença de colônias indica a passagem de plasmídios da bactéria J-1 para a bactéria receptora. Estas colônias foram analisadas quanto ao perfil plasmidial, produção de toxina STa e produção de fímbrias.

#### **4.12.2. Mutação com Transposon TnphoA**

As amostras J-1 e Sm10 pir (pRT 733:TnphoA) foram cultivadas e conjugadas como descrito no item 4.12.1. As diluições foram plaqueadas em meio LA+Xp contendo os antimicrobianos estreptomicina e canamicina.

#### **4.13. Cura de plasmídios**

##### **4.13.1. Cura através de plasmídios de incompatibilidade**

O teste para eliminação de plasmídios da amostra J-1 foi feito através de conjugação, como descrito no item 4.12.1., empregando os seguintes plasmídios de incompatibilidade: pRA1, pR391, pR478, pR40A e pRP4.

As suspensões bacterianas foram diluídas e plaqueadas em meio Mínimo contendo antimicrobianos de seleção.

##### **4.13.2. Cura com Novobiocina**

A bactéria J-1 foi inoculada em meio LB e incubada a 37°C por 15 h. Aliquotas de 100 µl do caldo bacteriano foram transferidas para erlenmeyers com 20 ml de meio LB, com concentrações crescentes de novobiocina (0, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 350, 500, 750 e 1000 µg/ml). Estes erlenmeyers foram incubados sob agitação por 15 h a 42°C.

Uma alíquota de 1,0 ml da última concentração onde a bactéria ainda apresentou crescimento foi centrifugada a 12.000 g por 2 min e o precipitado ressuspendido em 1,0 ml de LB.

A suspensão foi diluída até  $1.10^{-8}$ . As diluições de  $1.10^{-8}$ ,  $1.10^{-6}$ ,  $1.10^{-7}$  e  $1.10^{-9}$  foram plaqueadas em meio

LA e incubadas a 37°C por 15-18 h.

As colônias isoladas foram analisadas quanto à perda de resistência a antimicrobianos.

#### **4.13.3. Cura com brometo de etídio**

A eliminação de plasmídios da amostra J-1 utilizando brometo de etídio seguiu a metodologia descrita no item 4.13.2.

As colônias isoladas foram analisadas quanto à produção de toxina STa, produção de fímbrias e resistência à antimicrobianos.

#### **4.13.4. Cura com SDS**

##### **4.13.4.1. Cura de plasmídios da amostra J-1**

A amostra J-1 foi cultivada em meio LB a 37°C por 18 h. Uma alíquota de 100 µl deste caldo foi transferida para tubo com meio LB acrescido de SDS 10%. Este material foi incubado a 42°C por 48 h e repicado para outro tubo contendo LB + SDS 10% por mais duas vezes.

O caldo bacteriano foi centrifugado a 12.000 g por 2 min e o precipitado ressuscitado em 1,0 ml de meio LB. Diluições de  $1.10^{-1}$  a  $1.10^{-3}$  deste material foram plaqueadas em meio LA e incubadas a 37°C por 18 h.

As colônias isoladas foram testadas quanto à perda de resistência a antimicrobianos. Colônias que perderam sua resistência foram analisadas quanto ao perfil plasmidial e produção de toxina STa e fímbrias.

#### **4.13.4.2. Cura de plasmídios da mutante JS1**

A amostra mutante JS1, sensível à estreptomicina, foi tratada com SDS 10% como descrito no item 3.13.4.1.

As colônias isoladas foram examinadas quanto à produção de toxina STa, através de hibridização com sonda para STp, no Departamento de Microbiologia da Escola Paulista de Medicina.

#### **4.14. Marcação com transposon para resistência a antimicrobianos**

A marcação com transposon para resistência foi feita através de transformação, segundo metodologia descrita por Sambrook et al. (1989) com modificações, empregando-se os plasmídios pMR5 e pNK862.

Utilizou-se o plasmídio pMR5, portador do transposon TnA, resistente à ampicilina, para a transformação da bactéria J-1. A amostra mutante JS1, sensível à estreptomicina, foi transformada com o plasmídio pNK 862, portador de transposon ptac, resistente à

canamicina.

#### 4.14.1. Extração do DNA plasmidial

O DNA plasmidial para a transformação foi preparado como descrito no item 4.10., até a precipitação do DNA com etanol. Após a centrifugação do DNA plasmidial, este foi ressuscitado em 100 µl de Solução IV. Adicionaram-se 200 µl de etanol 100% à solução, que foi mantida por mais 1 h a temperatura de -20°C, e novamente centrifugada.

O precipitado foi lavado com etanol 70%, rapidamente centrifugado e ressuscitado em 50 µl de solução I. O DNA plasmidial foi mantido a -20°C até o momento do uso.

#### 4.14.2. Transformação com plasmídio pMR5

Um pré-inóculo da amostra J-1 foi cultivado em meio LB e incubado por 12-18 h. Uma alíquota de 2,5 ml do caldo bacteriano foi transferida para erlenmeyer contendo 50 ml de meio LB (diluição 1:20) e mantida sob agitação a 37°C até atingir sua fase exponencial de crescimento.

A cultura foi então transferida para tubos de centrífuga (25 ml/tubo) e mantida em gelo por 10 min. Seguiu-se uma centrifugação a 3.800 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado de cada tubo

ressuspendido em 20 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,1M.

Os tubos foram mantidos por 10 min em gelo e centrifugados nas condições anteriormente descritas. Os precipitados dos dois tubos foram ressuspendidos em 2 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,1M. Aliquotas de 200  $\mu\text{l}$  desta solução foram transferidas para tubos de ensaio e mantidas em gelo.

Após 4 h, adicionou-se a cada tubo uma solução de plasmídeo (10  $\mu\text{l}$ ). Estes foram mantidos em gelo por 45 min, seguindo-se um choque térmico em banho-maria a 37°C por 5 min e novamente banho de gelo por 2 min.

Adicionaram-se 800  $\mu\text{l}$  de meio SOC aos tubos, que foram incubados por 1 hora a 37°C. O material foi transferido para tubos Eppendorf e centrifugados a 12.000 g por 2 min. Os precipitados foram ressuspendidos em 100  $\mu\text{l}$  de meio LB e plaqueados em meio LA contendo os antimicrobianos estreptomicina e ampicilina.

As colônias isoladas foram analisadas quanto ao seu perfil plasmidial em gel de agarose 0,4%.

Como controle da transformação, utilizamos a linhagem DH5alfa como receptora do plasmídeo pMR5. Foi usado o plasmídeo pBR322 como controle na transformação da amostra J-1 e DH5alfa.

#### **4.14.3. Transformação com plasmídeo pNK862**

Para a transformação com o plasmídeo pNK862, adicionou-se, após 30 min da adição do meio SOC à mistura de células e plasmídios, uma solução de IPTG para uma concentração final de 1mM, como indicado por Sambrook, et al. (1989). Este material foi incubado a 37°C por 45 min e plaqueado em meio LA contendo o antimicrobiano canamicina.

As colônias obtidas na transformação foram analisadas quanto ao perfil plasmidial em gel de agarose 0,4%. Como controle da transformação, utilizou-se o plasmídeo pBR322 para transformar a receptora JS1.

##### **4.14.3.1. Transferência do transposon de pNK862**

A bactéria transformante JSpl, portadora dos plasmídios da amostra JS1 e do plasmídeo pNK862, foi cultivada em meio LB acrescido de IPTG, com o objetivo de transferir o transposon do plasmídeo pNK862 para um dos plasmídios da amostra JS1.

A amostra JSpl foi cultivada em meio LB contendo canamicina por 12-15 h a 37°C. Aliquotas de 100 µl do caldo bacteriano foram transferidas para dois tubos contendo meio LB, adicionando-se uma solução de IPTG (20mM/ml). Em um deles na fase inicial de crescimento e, no outro, ao atingir a fase exponencial.



Os tubos foram incubados a 37°C por 15 h. O material foi centrifugado a 12.000 g por 2 min e plaqueado em meio LA com canamicina por esgotamento com alça de platina.

As colônias isoladas foram analisadas quanto ao seu perfil plasmidial como indicado no item 4.13 em gel de agarose 0,4%

#### **4.14.3.2. Cura do plasmídio pNK862**

Para a eliminação do plasmídio pNK862 da amostra JSpl, esta foi submetida a uma transformação utilizando o plasmídio pBR322.

A extração do DNA plasmidial da amostra HB101 portadora do plasmídio pBR322, bem como o preparo das células competentes, foram feitos como indicado nos itens 4.14.1. e 4.14.3., respectivamente.

O material foi plaqueado em meio LA com ampicilina. As colônias isoladas foram analisadas quanto ao perfil plasmidial em gel de agarose 0,4%

#### **4.15. Hibridização para detecção de toxina STa**

A técnica de hibridização, segundo especificações do Departamento de Microbiologia da Escola Paulista de Medicina, foi empregada para detectar o plasmídio onde se

encontra o gene para a toxina STa.

Um gel de agarose 0,7%, contendo os plasmídios da amostra J-1, juntamente com o controle positivo (pRM5) e negativo (pBR 322) para a produção de toxina STa, foram submetidos à hibridização.

#### **4.16. Extração e eletroforese de proteínas**

##### **4.16.1. Extração de proteínas de superfície**

A extração de proteínas de superfície da amostra J-1 e ORN 115 (Tipo 1<sup>+</sup>), seguiu a metodologia descrita por Salit & Gotschlich (1977), com modificações.

As amostras bacterianas foram cultivadas em garrafas de Roux com meio CFA e incubadas a 37°C por 15 h.

O caldo bacteriano foi ressuscitado em tampão Tris-Cl (0,05M; pH 7,8) e homogeneizado em Omnimixer (Sorvall) em banho de gelo. O material foi centrifugado a 10.000 g por 20 min a 4°C e o sobrenadante precipitado com 20% de sulfato de amônia.

A mistura foi centrifugada a 4.000 g por 15 min e o precipitado ressuscitado em 10 ml de tampão Tris-Cl (0,05M; pH 7,8). Este material foi dialisado contra este mesmo tampão por 15 h, seguido de uma diálise contra tampão acetato (0,1M; pH 3,9).

A suspensão foi centrifugada a 2.000 g por 20 min

e o sedimento ressuspendido em tampão Tris (0,05M; pH 7,4). Uma alíquota de 200 µl do material foi misturada com igual volume do tampão de tratamento, fervendo-se em banho-maria a 100°C por 5 min e armazenando-se a -20°C.

#### **4.16.2. Eletroforese em SDS-PAGE**

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

Após a montagem do gel de separação (13%) e do gel de empacotamento (4%), as amostras de proteína foram aplicadas com seringas Hamilton de 50 µl.

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

#### 4.16.3. Coloração pela prata

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

---

| Soluções                  | tempo de tratamento |
|---------------------------|---------------------|
| <hr/>                     |                     |
| Fixador                   | > 1 h               |
| Etanol 50%                | 3 X 20 min          |
| Solução de pré-tratamento | 1 min               |
| Água destilada            | 3 X 20 seg          |
| Solução de impregnação    | 20 min              |
| Água destilada            | 2 X 20 seg          |
| Solução reveladora        | 10 min              |
| Água destilada            | 2 X 2 min           |
| Solução de bloqueio       | 10 min              |
| Metanol 50%               | > 20 min            |

---

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

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

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Produção de toxina LT-I, VT e bacteriocina.**

A bactéria J-1 não se mostrou produtora de toxina termo-sensível (LT-I), verotoxina (VT) ou de bacteriocina, quando testada segundo metodologias descritas nos itens 4.1.3, 4.1.2., e 4.11, respectivamente.

### **5.2. Testes de hemaglutinação**

#### **5.2.1. Hemaglutinação em lâmina**

Os resultados obtidos através dos testes de hemaglutinação da amostra J-1 cultivada a 37°C em diferentes meios de cultura , segundo metodologia descrita no item 4.4.1, encontram-se na tabela 3.

A bactéria J-1 quando cultivada em meio CFA, apresentou hemaglutinação na presença de D-manose apenas com hemácias de rato. No meio Minca, a bactéria hemaglutinou com hemácias de rato e carneiro.

### 5.2.2. Micro-hemaglutinação

Os resultados obtidos nos testes de micro-hemaglutinação da amostra J-1 cultivada a 37°C, em meio CFA e Minca com diferentes eritrócitos, segundo metodologia descrita no item 4.4.2, encontram-se na tabela 4.

A amostra J-1 quando cultivada a 37°C em meio CFA, apresentou um título de hemaglutinação de 1:16 com hemácias de rato. Em meio Minca, o título foi de 1:8 com hemácias de rato e carneiro.

A bactéria não hemaglutinou hemácias de rato ou carneiro quando cultivada a 16°C em meio CFA ou meio Minca.

O teste de micro-hemaglutinação realizado com hemácias de cobaia sem manose foi positivo, com um título de hemaglutinação de 1:128 (tabela 4).

**Tabela 3.** Padrão de hemaglutinação em lâmina na presença de D-manose da amostra de *E. coli* J-1 cultivada em diferentes meios de cultura a 37°C.

| Eritrócitos | Meios de cultura |              |     |             |
|-------------|------------------|--------------|-----|-------------|
|             | Minca            | Agar glicose | CFA | Meio Mínimo |
| Cavalo      | - <sup>1</sup>   | ---          | --- | ---         |
| Carneiro    | + <sup>2</sup>   | ---          | --- | ---         |
| Rato        | +                | -            | +   | -           |
| Cobaia      | -                | -            | -   | -           |
| Homem       | -                | -            | -   | -           |
| Boi         | -                | -            | -   | -           |
| Galinha     | -                | -            | -   | -           |

<sup>1</sup> Reação negativa

<sup>2</sup> Reação positiva

**Tabela 4.** Padrão de micro-hemaglutinação da amostra J-1 cultivada em meio de Minca e CFA a 37°C.

| eritrócitos |       |          |       |                     |       |
|-------------|-------|----------|-------|---------------------|-------|
| rato        |       | carneiro |       | cobaia <sup>a</sup> |       |
| CFA         | Minca | CFA      | Minca | CFA                 | Minca |
| 1/16        | 1/8   | -        | 1/8   | 1/128               | n.r.  |

<sup>a</sup> teste realizado em ausência de D-manose

n.r. teste não realizado

### 5.3. Caracterização sorológica

Nos testes sorológicos realizados segundo metodologia descrita no item 4.6., a bactéria J-1 não aglutinou com nenhum dos antissoros anti-fímbrias testados (antik99, K88, 987F, F41, F42, PCF 0159, FY, 31A e EAF44).

### 5.4. Visualização de fímbrias através de microscopia eletrônica

As fotomicrografias da amostra J-1, preparadas conforme descrito no item 4.7, encontram-se na figura 1.

A bactéria J-1, quando cultivada a 37°C, apresentou estruturas semelhantes a fímbrias, com um tamanho estimado de 7nm. A fímbria visualizada foi provisoriamente denominada F43ms. No cultivo a 16°C, a bactéria se mostrou portadora apenas de estruturas flagelares, estando ausentes as estruturas do tipo fímbria. Este mesmo padrão foi encontrado quando a bactéria foi cultivada em meio líquido (dados não mostrados).



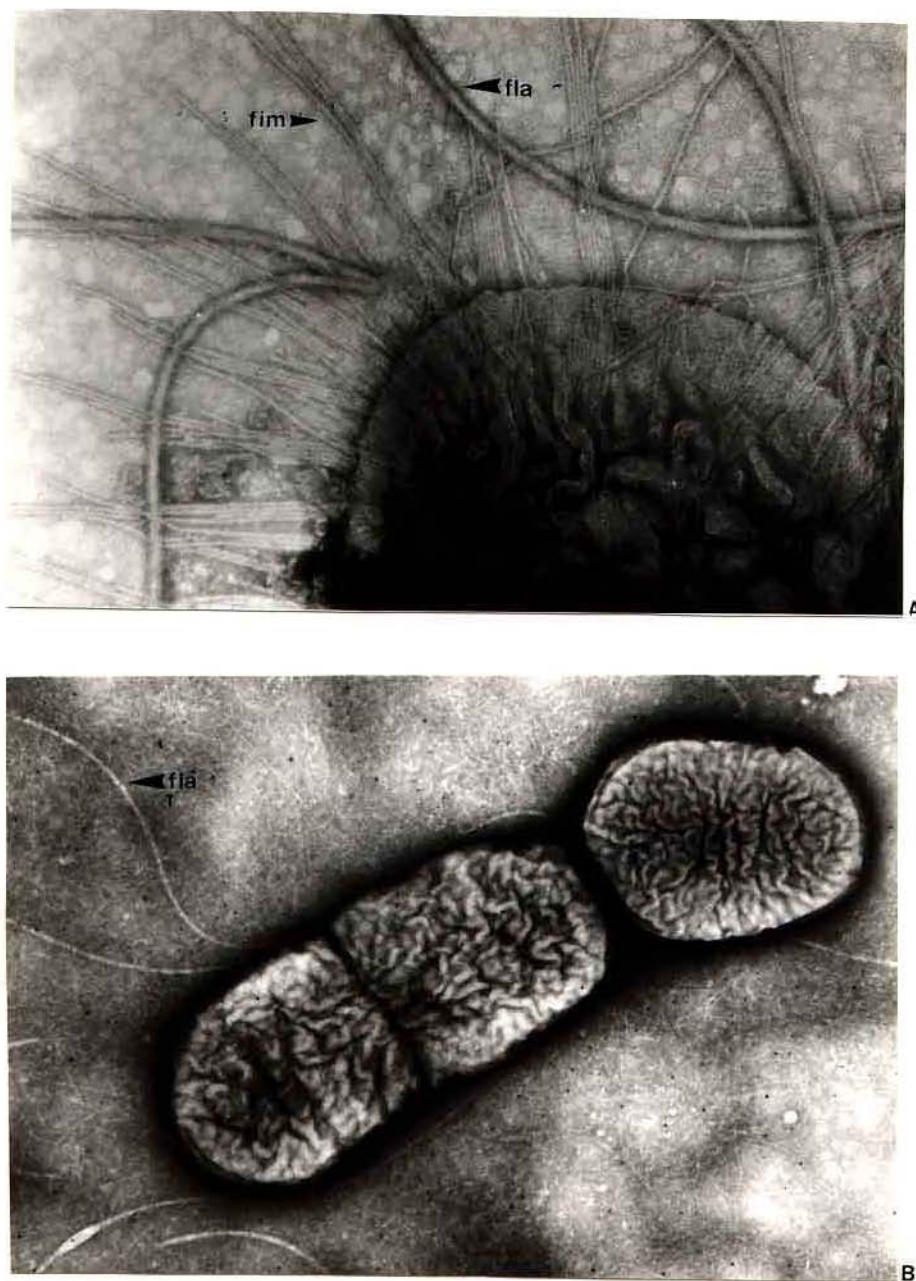


Figura 1. Micrografia eletrônica da amostra de *Escherichia coli* J-1 cultivada em meio CFA, (A) 37°C (B) 16°C, em coloração negativa com PTA.

Aumentos = (A) 80.000 e (B) 20.000

### **5.5. Marcação com ouro-coloidal**

O resultado da marcação com ouro-coloidal, segundo metodologia descrita no item 4.8, encontra-se na Figura 2.

Verificamos que o antissoro anti-J-1 absorvido, quando em contato com a bactéria J-1, reagiu especificamente com as estruturas tipo fímbria. Não foi verificada aderência em outras regiões na superfície da bactéria.

### **5.6. Aderência a enterócitos**

Os resultados obtidos nos testes de aderência, segundo metodologia descrita no item 4.9., encontram-se na figura 3.

Observamos, através de imunofluorescência, a aderência das fímbrias aos enterócitos. Em algumas das células, a aderência se localizou apenas na região apical da célula, enquanto que em outras esta aderência deu-se em toda a sua superfície.



Figura 2. Micrografia eletrônica da amostra de *Escherichia coli* J-1 marcada com ouro coloidal (Auro Probe). Antissoro anti-fímbrias aderido às fímbrias. Aumento = 35.000



Figura 3. Fotomicrografia em microscópio de fluorescência.  
Imunocitoquímica com antissoro anti-fímbrias  
aderido à superfície de enterócitos isolados de  
bovino.  
Aumento = 400

### **5.7. Resistência a antimicrobianos**

Nos testes de resistência, conforme descrito no item 4.10., a bactéria J-1 mostrou-se resistente apenas ao antibiótico estreptomicina, até uma concentração de 200 µg/ml. Esta amostra foi sensível aos demais antimicrobianos ensaiados.

A amostra MS101 se mostrou resistente apenas ao antimicrobiano ácido nalidíxico, até uma concentração de 1000 µg/ml.

### **5.8. Padrão eletroforético do DNA plasmidial**

Os resultados obtidos através de eletroforese do DNA plasmidial em gel de agarose da amostra J-1, conforme descrito no item 4.13, encontram-se na Figura 4.

A amostra J-1 apresentou dois plasmídios de alto peso molecular, com aproximadamente 79 Mda e 26 Mda; e 2 plasmídios de baixo peso molecular, com aproximadamente 8,0 Mda e 6,2 Mda.

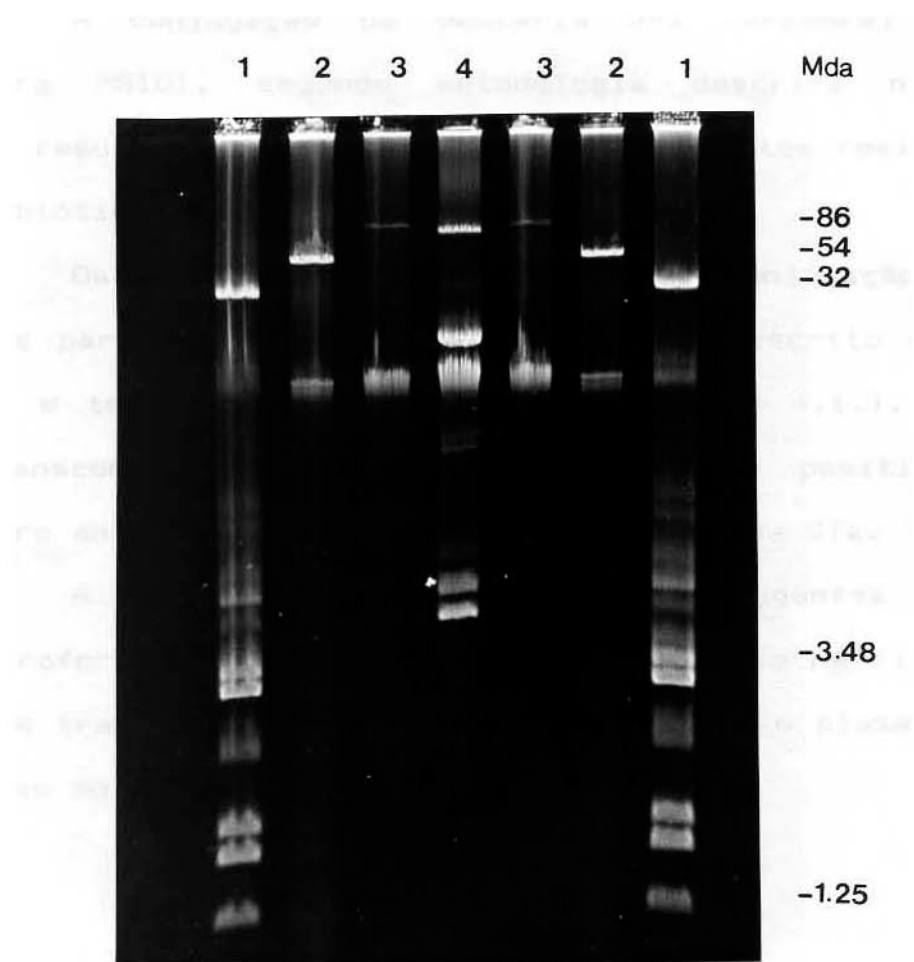


Figura 4. Perfil eletroforético de DNA plasmidial da amostra J-1 em gel de agarose 0,7%.

- |         |         |
|---------|---------|
| 1. V517 | 3. pRA1 |
| 2. p307 | 4. J-1  |

### 5.9. Análise da conjugação de J-1 X MS101

A conjugação da bactéria J-1 (doadora) com a receptora MS101, segundo metodologia descrita no item 4.14.1, resultou na obtenção de transconjugantes resistentes ao antibiótico estreptomicina.

Os transconjugantes obtidos na conjugação foram testados para a produção de fímbria (como descrito no item 4.5.2.) e toxina STa (como descrito no item 4.1.). Nenhum dos transconjugantes apresentou aglutinação positiva com antissoro anti-J-1 absorvido ou produziu toxina STa.

A análise plasmidial dos transconjugantes através de eletroforese em gel de agarose, encontra-se na Figura 5. Todos os transconjugantes apresentaram apenas o plasmídio de alto peso molecular, de 26 Mda.

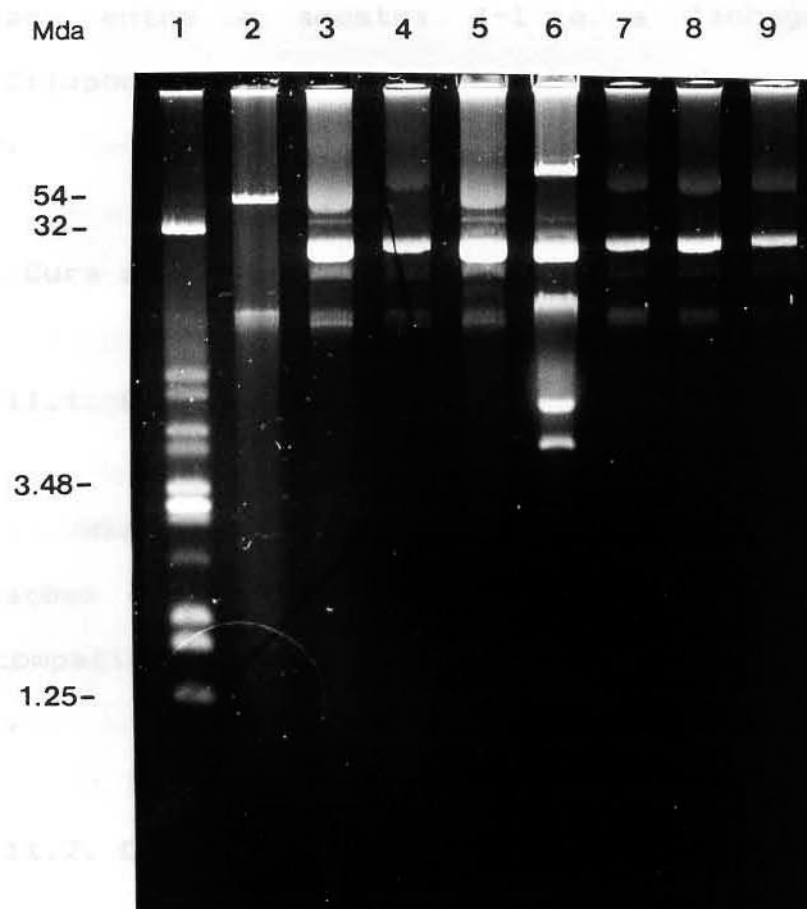


Figura 5. Perfil eletroforético de DNA plasmidial dos transconjugantes de J-1 e MS 101, resistentes a estreptomicina, em gel de agarose 0,7%.

1. V517                      3-5, 7-9. Transconjugantes

2. p307                      6. J-1



### **5.10. Mutação com transposon TnphoA**

Não foram obtidos transconjugantes na conjugação realizada entre a amostra J-1 e a linhagem Sm10 pir (pRT733:TnphoA), segundo metodologia descrita no item 4.14.2.

### **5.11. Cura de plasmídios**

#### **5.11.1. Cura através de plasmídios de incompatibilidade**

Não obtivemos transconjugantes nas várias conjugações realizadas com plasmídios de diferentes grupos de incompatibilidade, segundo metodologia descrita no item 4.15.1.

#### **5.11.2. Cura utilizando novobiocina**

A bactéria J-1, quando cultivada em diferentes concentrações de novobiocina (como descrito no item 4.15.2), apresentou crescimento bacteriano até uma concentração de 200 µg/ml.

Um total de 1000 colônias isoladas foram analisadas quanto à perda de resistência a estreptomicina. Nenhuma destas colônias mostrou-se sensível a este antibiótico.

### **5.11.3. Cura através de brometo de etídio**

Através da metodologia descrita no item 4.15.3, verificou-se que a bactéria J-1 cresceu até uma concentração de 200 µg/ml de brometo de etídio.

Cerca de 1000 colônias tratadas com brometo de etídio foram isoladas e examinadas quanto à perda de resistência ao antibiótico estreptomicina. Destas, um total de 300 colônias foram também examinadas quanto à produção de fímbria e toxina STa.

Nenhuma destas colônias apresentou alteração nas diversas características analisadas.

### **5.11.4. Cura com SDS**

#### **5.11.4.1. Cura de plasmídios da amostra J-1**

Aproximadamente 500 colônias, tratadas com SDS como descrito no item 4.15.4.1, foram examinadas quanto à perda de resistência ao antibiótico estreptomicina. Foram obtidas 3 colônias mutantes, sensíveis ao antibiótico.

A análise do perfil plasmidial destas 3 colônias, designadas JS1, JS2 e JS3, mostrou a perda do plasmídio conjugativo de 26 Mda (Figura 6).

Estas 3 colônias foram examinadas quanto à produção de toxina STa e fímbria. Nenhuma delas apresentou

alteração para estes caracteres.

#### **5.11.4.2. Cura de plasmídios da mutante JS1**

Aproximadamente 500 colônias da amostra mutante JS1, tratada com SDS, foram analisadas para a produção de toxina STa, através de hibridização. Todas as colônias reagiram positivamente com a sonda para a toxina STa.

### **5.12. Resultados de marcação com transposon**

#### **5.12.1. Transformação com plasmídio pMR5**

Não foram obtidos resultados na transformação realizada entre a amostra J-1 e o plasmídio pMR5, segundo metodologia descrita no item 5.16.2. O mesmo foi observado na transformação da linhagem DH5alfa com este mesmo plasmídio.

Nas transformações utilizando a amostra J-1 e o plasmídio pBR 322, foram obtidas apenas 3 colônias transformantes. Na transformação da linhagem DH5alfa com o plasmídio pBR 322, obteve-se aproximadamente 200 colônias por placa.

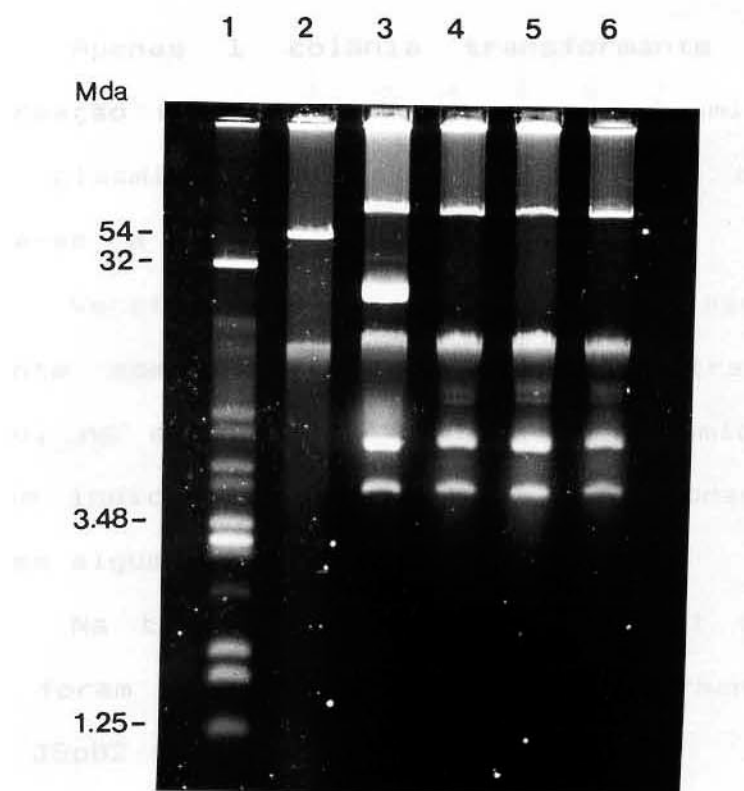


Figura 6. Perfil eletroforético de DNA plasmidial de mutantes sensíveis à estreptomicina da amostra J-1 tratada com SDS, em gel de agarose 0,7%.

1. V517

3. J-1

5. JS2

2. p307

4. JS1

6. JS3

### 5.12.2. Transformação com plasmídeo pNK 862

Apenas 1 colônia transformante foi obtida na transformação da bactéria JS1 com o plasmídeo pNK 862. A análise plasmidial desta transformante, designada JSp1, encontra-se na figura 7.

Verificou-se a presença do plasmídeo pNK 862, juntamente com os plasmídios da amostra JS1. Não se observou, no entanto, alteração nos plasmídios da amostra JS1, que indicassem a presença do transposon do plasmídeo pNK862 em algum deles.

Na transformação da mutante JS1 com o plasmídeo pBR322, foram obtidas 2 colônias transformantes, designadas JSpB1 e JSpB2 (figura 7).

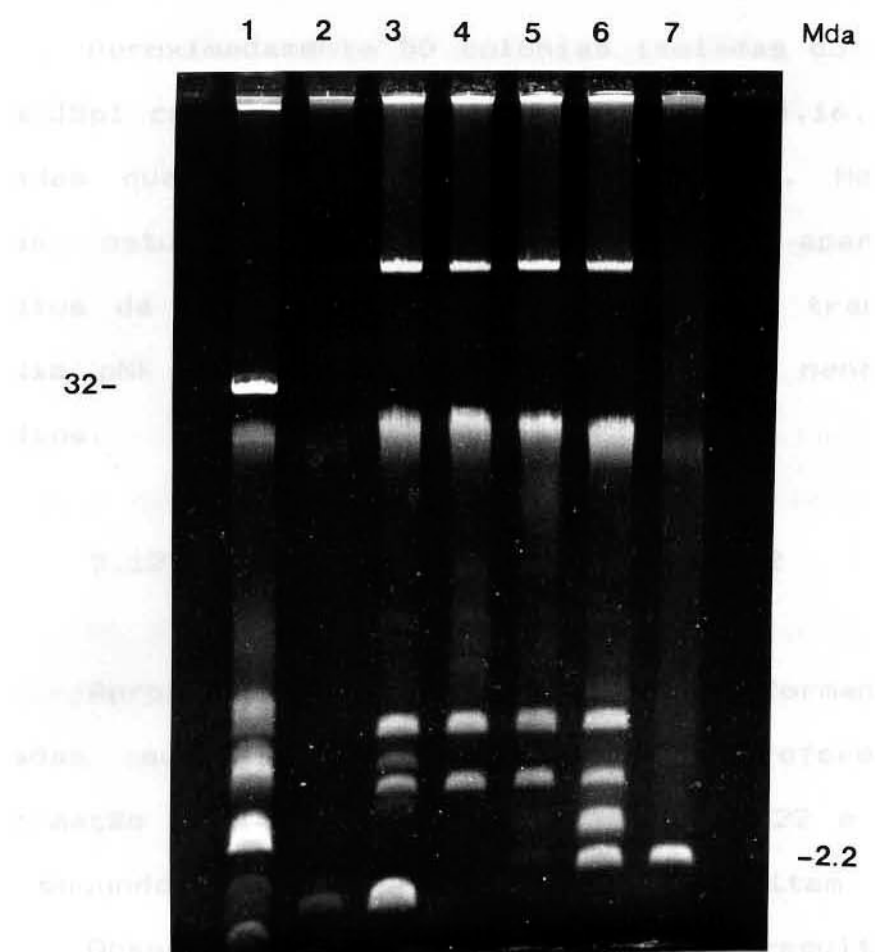


Figura 7. Perfil eletroforético de DNA plasmidial dos transformantes JSp1, JSpB1 e JSpB2 em gel de agarose 0,4%.

- |           |          |           |
|-----------|----------|-----------|
| 1. V517   | 4. JS1   | 7. pBR322 |
| 2. pNK862 | 5. JSpB1 |           |
| 3. JSp1   | 6. JSpB2 |           |

#### **5.12.2.1 Transferência do transposon do plasmídio pNK862**

Aproximadamente 50 colônias isoladas do cultivo da amostra JSp1 com IPTG, como indicado no item 4.16.3.1, foram analisadas quanto ao seu perfil plasmidial. Nenhuma das colônias estudadas apresentou alteração aparente nos plasmídios da amostra JSp1, indicando que o transposon do plasmídio pNK 862 não foi transferido para nenhum destes plasmídios.

#### **5.12.2.2. Cura com plasmídio pBR 322**

Aproximadamente 20 colônias transformantes foram analisadas quanto ao seu perfil eletroforético, na transformação realizada com o plasmídio pBR322 e a amostra JSp1, segundo metodologia descrita no item 4.16.3.2.

Observou-se que as colônias resultantes da transformação apresentaram o plasmídio pBR322 junto ao plasmídio pNK862. O plasmídio pBR322 inseriu-se na amostra JSp1 sem que o plasmídio pNK862 fosse eliminado.

### **5.13. Análise de hibridização**

Os resultados do teste de hibridização mostraram que o gene responsável pela produção da toxina STa encontra-se no plasmídio de 79 Mda da amostra J-1.

### **5.14. Análise do perfil eletroforético de proteínas**

Os resultados obtidos na análise do perfil eletroforético de proteínas em gel de SDS-PAGE, segundo metodologia descrita no item 4.18.2, encontram-se na figura 9.

As amostras J-1 e ORN 115 apresentaram um perfil eletroforético muito semelhante, com 3 bandas proteicas com peso molecular de aproximadamente 14,8 kD, 17 kD e 29,9 kD.



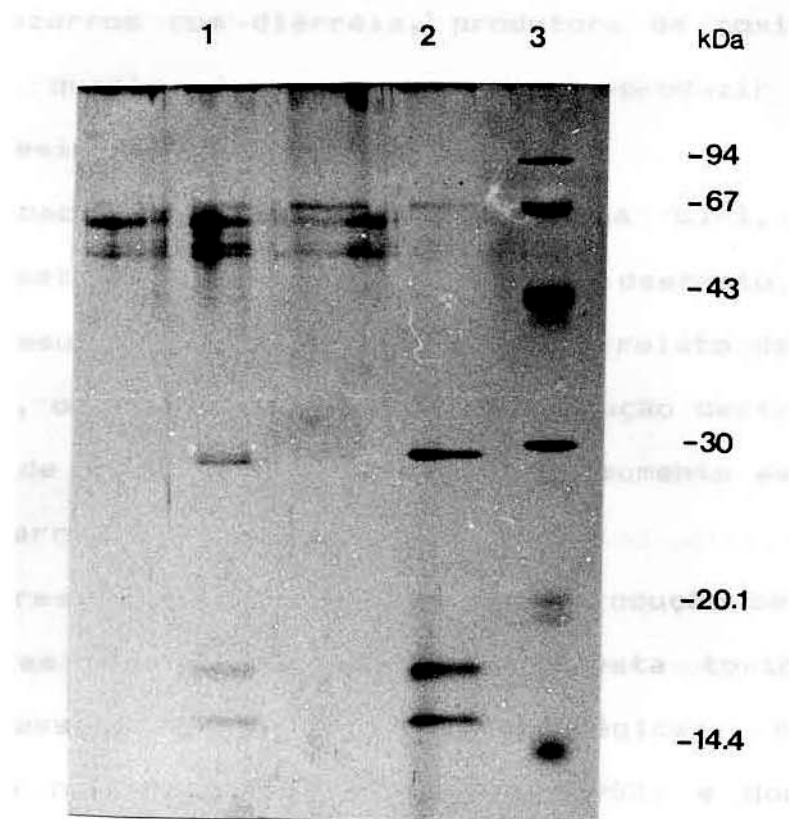


Figura 8. Perfil eletroforética de proteínas de membrana das amostras J-1 (F43ms<sup>+</sup>) e ORN (tipo 1<sup>+</sup>) em PAGE autoradiográfica (13%), coradas com prata.

1. J-1 em 12aine, com diferentes hemácias e cultivada em 2. ORN 115 de cultura. 3. Padrão de peso molecular (Kda)

## 6. DISCUSSÃO

A amostra de *Escherichia coli* enterotoxigênica J-1 isolada de bezerros com diarreia, produtora de toxina STa, foi avaliada quanto à sua capacidade de produzir toxinas LT-I, VT e adesinas.

A bactéria não produziu toxina LT-I, quando testada pelo método de imunohemólise radial descrito no item 4.1.3. Este resultado está de acordo com o relato de Morris et al. (1987), onde verificou-se que a produção desta toxina por amostras de *E. coli* bovina não está comumente associada a casos de diarreia.

Os resultados negativos para a produção de toxina VT também eram esperados, uma vez que esta toxina está normalmente associada a colites hemorrágicas, síndrome hemolítica em humanos (Johnson et al., 1983) e doença do edema em suínos (Petric et al., 1987). Alguns autores relataram a presença desta toxina em *E. coli* de bovinos com diarreia (Mohammad et al., 1985; Yano et al., 1988), porém sem estar normalmente associada às toxinas de *E. coli* enterotoxigênicas (ST e LT).

A amostra de *E. coli* J-1 foi submetida à hemaglutinação em lâmina com diferentes hemácias e cultivada em diferentes meios de cultura. Neste teste, a bactéria J-1 hemaglutinou hemácias de rato e carneiro quando cultivada em meio de Minca e hemaglutinou somente hemácias de rato quando

cultivada em meio CFA (Tabela 3).

Segundo Old (1985) algumas fímbrias, como K88 e K99, não reagem (ou a reação é fraca) quando o teste de hemaglutinação é feito em lâmina. É mais apropriado, nestes casos, empregar o teste de micro-hemaglutinação, como descrito por Jones e Rutter (1974).

A amostra de *E. coli* J-1 foi submetida ao teste de micro-hemaglutinação com diferentes hemácias, nos meios de Minca e CFA, e apresentou o mesmo padrão de hemaglutinação verificado no teste realizado em lâmina (Tabela 4).

Estes primeiros resultados sugerem que a amostra de *E. coli* J-1 seria produtora de uma possível nova fímbria, provisoriamente designada de F43ms, uma vez que as fímbrias atualmente conhecidas não possuem o padrão de hemaglutinação apresentado por esta amostra. Além disso, a amostra poderia ser produtora de fímbria tipo 1, pois apresentou hemaglutinação fortemente positiva com hemácias de cobaia na ausência de D-manose, padrão característico da fímbria tipo 1 (Salit & Gotschlich, 1977).

Nakazawa et al. (1986) isolaram uma amostra de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) com padrão de hemaglutinação idêntico ao de tipo 1 (hemaglutinação manose-sensível). Entretanto, em testes de aglutinação utilizando antissoro monoespecífico anti-tipo 1, a reação foi negativa. Isto indica que, possivelmente, trata-se de outra fímbria, diferente de tipo 1. Podemos considerar, através deste dado,

que os testes de hemaglutinação, apesar de extremamente práticos e difundidos como primeiro passo para a detecção de fimbrias, não são suficientes para se determinar a presença ou não de uma adesina, sendo importante estarem associados a testes de microscopia eletrônica, caracterização sorológica e bioquímica (Old, 1985).

As características sorológicas da amostra de *E. coli* J-1 foram testadas utilizando-se antissoros de diferentes fimbrias conhecidas (K88, F42, 987P, EAF 44, FY, 31A, F41 e K99) e antissoro anti PCF O159:H4. Este último, embora associado a *E. coli* de origem humana, foi utilizado por pertencer ao mesmo sorogrupo da amostra em estudo (O159), segundo testes realizados no Instituto Adolfo Lutz.

Os resultados dos testes de aglutinação com os diferentes antissoros foram todos negativos, indicando, juntamente com os resultados de hemaglutinação, que, provavelmente, a amostra em questão não é portadora de nenhum dos antígenos comumente encontrados em amostras isoladas de *E. coli* enterotoxigênica.

Nas fotomicrografias da amostra J-1 (figura 1) podemos observar que a bactéria cultivada a 37°C em meio CFA, apresentou estruturas fimbriais rígidas, com diâmetro aproximado de 7 nm. Estas estruturas são bastante similares às fimbrias tipo 1 (Brinton, 1969 apud Isaacson, 1985) e 987P (Isaacson & Richter, 1981), que apresentam este mesmo padrão morfológico.

Diferentemente das fimbrias tipo 1 e 987P, sujeitas a variação de fase (Brinton, 1959), a expressão das fimbrias na amostra de *E. coli* J-1 aparentemente se mostrou dependente da temperatura. A bactéria mostrou-se intensamente fimbriada quando cultivada a 37°C (figura 1a) e aparentemente sem fimbrias quando cultivada a 16°C (figura 1b).

Na fotomicrografia da amostra de *E. coli* J-1 cultivada em meio líquido, não observamos a presença de fimbrias. Este resultado difere dos encontrados para fimbrias tipo 1 (Orskov et al., 1980), que se manifestam quando a bactéria é cultivada em meio líquido sem aeração e são inibidas quando o cultivo é feito em meio sólido.

No teste de adesão da fimbria F43ms da amostra de *E. coli* J-1, verificamos através de imunofluorescência (figura 3), a capacidade de adesão destas fimbrias aos enterócitos de bezerro. Estes resultados estão de acordo com os testes de adesão realizados *in vitro* com bactérias produtoras de outras fimbrias, como K88, K99, 987P e fimbria tipo 1 (Wilson & Hohmann, 1974; Nagy et al., 1977; Isaacson et al., 1978). Estes autores verificaram que bactérias produtoras de fimbrias apresentavam adesão, enquanto que bactérias desprovidas destas estruturas não eram capazes de aderir às células epiteliais do intestino, indicando a presença de receptores específicos na superfície das células às fimbrias.

Visando determinar se as características apresentadas pela amostra de *E. coli* J-1 eram de natureza plasmidial ou cromossômica, foram realizados estudos para detectar nesta amostra a possível produção de bacteriocina e resistência a antimicrobianos, que pudessem servir como marcadores genéticos.

A amostra J-1 não se mostrou produtora de bacteriocina e apresentou resistência apenas ao antibiótico estreptomicina. A eletroforese em gel de agarose permitiu a visualização de quatro diferentes plasmídios (figura 4).

Através de conjugação com a receptora MS101, procurou-se transferir os plasmídios da amostra J-1. Os transconjugantes resistentes à estreptomicina obtidos apresentaram, na análise eletroforética, apenas o plasmídio de 26 Mda (figura 5). Os mesmos resultados foram obtidos na conjugação utilizando a amostra C600 (dados não apresentados).

Estes resultados indicam que este plasmídio é o responsável pela resistência ao antibiótico estreptomicina e, provavelmente, não é o responsável pela codificação da fímbria Fms e da toxina STa, pois não foi detectada a expressão destas características nos transconjugantes testados.

A ausência de marcadores nos outros plasmídios da amostra J-1 levou-nos a direcionar o trabalho no sentido de obtermos mutantes que não expressassem a fímbria e/ou a

toxina STa. Para isso, utilizou-se a mutagênese por inativação insercional, direcionada para proteínas de exportação (Taylor, 1989).

Empregou-se o plasmídio pRT733, portador do transposon TnphoA que, em meio de cultura contendo BCIP, apresenta colônias azuis apenas quando inserido no quadro de leitura de seqüências codificadoras de proteínas de exportação.

A não obtenção de colônias nas várias conjugações realizadas entre a linhagem SM10 pir, portadora do plasmídio pRT733 e a amostra de *E. coli* J-1 levou-nos a utilizar diferentes grupos de incompatibilidade, procurando curar os plasmídios da amostra J-1. O emprego desta metodologia parte do princípio de que dois ou mais plasmídios pertencentes ao mesmo grupo de incompatibilidade não se mantêm estáveis numa mesma amostra (Novick, 1987; MacConnell, 1981).

As conjugações entre vários plasmídios de diferentes grupos de incompatibilidade e a amostra de *E. coli* J-1 também apresentaram resultados negativos. Segundo Bradley (1989), o sorogrupo ao qual pertence uma amostra pode afetar sensivelmente sua eficiência como receptora. Este autor estudou vários sorogrupos de *E. coli* enteropatogênicas clássica (EPEC) e verificou que alguns sorogrupos, como o O55 e o O128 são bons receptores, enquanto sorogrupos como o O111 e o O119 não o são.

Apesar de não existirem estudos desta natureza em relação a sorogrupos de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), considerou-se esta hipótese para explicar a ineficiência da amostra J-1 como receptora. Não podemos deixar de considerar, entretanto, outros mecanismos que podem estar envolvidos neste processo, como a possibilidade dos próprios plasmídios da amostra J-1 impedirem a entrada de outros do mesmo grupo de incompatibilidade e o sistema de restrição do DNA, que impede a permanência de DNA exógeno (Bradley, 1989).

Agentes intercalantes tais como acriflavina (Mitsunashi et al., 1961), acridina orange (Hirota, 1960), brometo de etídio (Bouanchaud et al., 1969) e outros como SDS (Tomoeda et al., 1967) e novobiocina (Wolfson et al., 1983), têm sido amplamente utilizados na cura de plasmídios. No presente trabalho empregamos novobiocina, brometo de etídio e SDS.

Os resultados negativos na utilização do corante brometo de etídio e do antibiótico novobiocina, diferem dos obtidos por outros autores (Bouanchaud, 1969; Wolfson, 1983), que conseguiram alta porcentagem de cura com estes agentes. Silveira (1986) também não obteve cura em experimentos utilizando acridina orange e brometo de etídio. Segundo este autor, vários fatores podem estar envolvidos, como alta estabilidade dos plasmídios ou uma provável barreira na superfície externa das bactérias, que impediria



a penetração dos agentes utilizados.

A cura com SDS resultou na obtenção de três mutantes sensíveis a estreptomicina. Segundo Tomoeda et al. (1967), este agente é altamente eficaz na eliminação de fatores R (que determinam resistência a antibióticos) presentes em *E. coli*.

O perfil plasmidial dos três mutantes mostrou a perda do plasmídio conjugativo de 26 Mda (figura 6). Estes mutantes continuaram a produzir toxina STa e fímbria. Estes dados confirmam que a resistência a estreptomicina é codificada apenas no plasmídio de 26 Mda e que a toxina STa e a fímbria Fms não são codificadas neste plasmídio.

Através de hibridização utilizando sonda para a toxina STa, determinamos que o gene para esta toxina está localizado no plasmídio de 79 M da. Este resultado está de acordo com o que se encontra na literatura, onde vários autores reportaram que a toxina STa é de caráter plasmidial (Smith et al., 1979; Peneranda, 1980).

Os genes responsáveis pela codificação de fatores de colonização têm sido localizados em plasmídios de alto peso molecular (Shipley et al., 1978; So et al., 1976). Estes dados, aliados ao fato de que os genes para toxina STa e fímbrias têm sido localizados no mesmo plasmídio (Smith et al., 1979; MacConnell et al., 1981; Murray et al., 1983; Silveira et al., 1987), levaram-nos a supor que, se os genes para a fímbria Fms fossem de origem plasmidial,

possivelmente seriam encontrados no plasmídio de 79 Mda, que codifica a toxina STa.

A amostra mutante JS1, sensível à estreptomicina, foi tratada com SDS, visando a eliminação do plasmídio de 79 Mda. As colônias obtidas no tratamento foram avaliadas quanto à produção da toxina STa, a fim de determinar se a cura do plasmídio acarretaria também a não-expressão da fimbria Fms. Das 500 colônias testadas, todas produziram a toxina STa, indicando que o plasmídio de 79 Mda não foi curado.

Como não foi possível a eliminação do plasmídio de 79 Mda, o trabalho foi direcionado no sentido de se tentar marcar este plasmídio com transposons, através de transformação.

O primeiro plasmídio utilizado foi o pMR5, sensível à temperatura, portador de transposon com resistência a ampicilina. Não obtivemos nenhum transformante. Na transformação utilizando o plasmídio pMR5 e a linhagem DH5alfa como receptora, os resultados também foram negativos. Embora existam relatos de transformações bem sucedidas utilizando plasmídios de alto peso molecular (Silveira, 1986), possivelmente os resultados negativos se devam ao alto peso molecular do plasmídio. Segundo Harwood & Feavers (1985), o aumento do peso molecular do plasmídio empregado, diminui a eficiência da transformação.

Na transformação controle utilizando o plasmídio

pBR322, a diferença entre a amostra de *E. coli* J-1 e DH5alfa como receptoras foram bem evidentes. Na transformação com amostra de *E. coli* J-1, apenas três colônias foram obtidas, enquanto que na transformação da amostra DH5alfa obteve-se mais de 200 colônias transformantes por placa.

Estes resultados reforçam a idéia de que a bactéria J-1, por vários motivos, como barreiras a nível de parede celular ou sistema de restrição de DNA, dificulta a entrada de DNA exógeno.

Uma outra transformação foi feita, utilizando-se a amostra mutante JS1 e o plasmídeo pNK862. Este plasmídeo é portador de transposon com promotor tac, que é induzido pela adição de IPTG ao meio de cultura.

Apenas uma colônia transformante foi obtida e na análise eletroforética, não observamos alteração nos plasmídios da amostra JS1 que indicassem transposição (figura 7). Visando aumentar a eficiência de transposição e replicação do transposon, a amostra JSp1, portadora dos plasmídios da amostra JS1 e do plasmídeo pNK862 foi cultivada em meio contendo uma concentração de IPTG 30 vezes maior que a recomendada por Sambrook et al. (1989). Apesar deste aumento na concentração de IPTG, não observamos nenhuma alteração nos plasmídios da amostra JS1.

Objetivando eliminar o plasmídeo pNK862, a amostra JSp1 foi transformada com o plasmídeo pBR322. Pela análise eletroforética observamos a coexistência dos dois plasmídios

na amostra. O plasmídio pNK862 é originário do plasmídio pBR333, que por sua vez é derivado do plasmídio pBR322 (Way et al., 1984). Era esperado, portanto, que por pertencerem ao mesmo grupo de incompatibilidade, estes dois plasmídios não fossem capazes de coexistir na amostra JS1.

Nos primeiros testes realizados neste trabalho, verificaram-se algumas semelhanças entre a fímbria F43ms da amostra de *E. coli* J-1 e a fímbria tipo 1, como hemaglutinação manose-sensível e morfologia em microscopia eletrônica.

As diferenças entre as fímbrias não foram suficientes para inferirmos se a fímbria F43ms seria uma outra fímbria, diferente do tipo 1, ou uma variação desta. Não foi possível determinar, através das várias metodologias empregadas, se os genes responsáveis pela codificação da fímbria F43ms estariam localizados no cromossomo, como é o caso dos genes que codificam a fímbria tipo 1, ou em plasmídios.

A amostra de *E. coli* J-1 foi então avaliada quanto ao perfil eletroforético de proteínas de superfície, juntamente com uma amostra padrão produtora de fímbria tipo 1. As duas amostras apresentaram perfis eletroforéticos bastante semelhantes, com três bandas de aproximadamente 29,9 Kd, 17 Kd e 14,8 Kd. A proteína de 17 Kd foi relacionada à subunidade da fímbria Pil A, que na literatura é descrita com um peso molecular de aproximadamente 17 Kd

(Hanson *et al.*, 1988).

Com base nos resultados obtidos com a amostra de *E. coli* J-1 (microhemaglutinação e morfologia da fímbria) e principalmente no perfil eletroforético de proteínas desta amostra, foi possível concluir que a fímbria Fms é uma fímbria relacionada a fímbria tipo 1.

Relatos quanto ao envolvimento de fímbria tipo 1 na patogenicidade são controversos (Brinton, 1977 apud Moon, 1990). Isaacson *et al.* (1978) demonstraram a capacidade da fímbria tipo 1 aderir a enterócitos *in vitro*. Segundo To *et al.* (1984), esta adesão não é observada em testes *in vivo*. Estes autores também observaram que esta fímbria não confere proteção aos animais quando utilizada como vacina.

Entretanto, Jayappa *et al.* (1985), trabalhando com fímbria tipo 1, encontraram resultados bem diversos. Estes autores obtiveram a adesão da fímbria tipo 1 em testes *in vivo*, além de obter uma boa imunidade quando utilizaram-na como vacina.

O envolvimento de fímbria tipo 1 na patogenicidade em humanos foi estudado por Levine *et al.* (1980), que verificaram que muitas amostras de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) e enteropatogênicas clássicas (EPEC), produtoras apenas de fímbria tipo 1, causavam diarreia em voluntários. Entretanto, a presença de fímbria tipo 1 também foi detectada em 11 das 15 amostras de *E. coli* isoladas do grupo controle de indivíduos sadios, levando estas autores a

questionarem o papel desta fímbria como agente patogênico.

Levine et al. (1983), trabalhando com amostras de *E. coli* enterotoxigênicas isoladas de humanos com diarreia, detectaram a presença de fímbria tipo 1 em 42% das amostras estudadas. Estes autores verificaram, assim como Levine et al. (1980) que esta fímbria, diferentemente das fímbrias CFA I e CFA II, também estava presente em alta porcentagem (49%) das amostras de *E. coli* não enterotoxigênicas isoladas de indivíduos sadios.

Estes dados conflitantes acerca do envolvimento de fímbria tipo 1 em mecanismos de virulência se deve, possivelmente, ao fato de existirem variações entre fímbrias tipo 1 (Adegbola & Old, 1987). Esta hipótese é reforçada no relato de Jayappa (1983 apud Moon, 1990) onde, principalmente baseado em dados não publicados, conclui-se que existam pelo menos 12 diferentes tipos de fímbrias da "família" tipo 1.

Acreditamos que a amostra de *E. coli* J-1 expressa uma fímbria relacionada à fímbria tipo 1 e, embora apresente algumas das características comumente associadas a esta fímbria, apresenta outras que reforçam a idéia da existência de variação entre fímbrias tipo 1. É possível que estudos mais aprofundados com fímbrias inicialmente classificadas como tipo 1, apresentem outras características que as diferenciem, inclusive envolvimento em mecanismos de patogenicidade.

Podemos considerar, portanto, a possibilidade da amostra J-1 ser enteropatogênica para bovinos, uma vez que apresenta alguns fatores comprovadamente envolvidos em patogenicidade, como adesão a enterócitos de bezerro e produção de toxina STa. Estudos posteriores, como avaliação da capacidade de adesão desta amostra *in vivo* e estudos de frequência desta fímbria em *E. coli* isoladas de bovinos com diarreia, certamente contribuirão para elucidar o papel de fímbrias relacionadas a "família" de fímbrias tipo 1 nos mecanismos de patogenicidade de *Escherichia coli*.

## 7. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos nos testes de hemaglutinação, visualização de fímbrias em microscopia eletrônica, reação de aglutinação com diferentes antissoros, adesão a enterócitos, testes de conjugação, transformação, hibridização e eliminação plasmidial, concluímos que:

- A amostra de *E. coli* J-1 apresenta uma fímbria diferente de outras já descritas. Como outros antígenos de aderência de *E. coli*, esta fímbria adere especificamente a enterócitos.

- Em muitos aspectos a fímbria F43ms apresenta características semelhantes à fímbria tipo 1, como morfologia, hemaglutinação na ausência de D-manose e perfil eletroforético de proteínas de superfície semelhante.

- Diferentemente de fímbria tipo 1, a fímbria F43ms se mostra dependente de temperatura, não se expressa quando cultivada em meio líquido e hemaglutina hemácias de rato e carneiro na presença de D-manose.

- A amostra de *E. coli* J-1 possui apenas um plasmídio conjugativo, com marca de resistência à estreptomicina. Este plasmídio não é o responsável pela codificação dos genes de expressão da fímbria e toxina STa.

- No plasmídio de 79 Mda encontram-se os genes responsáveis pela codificação de toxina STa.



## 8. RESUMO

A amostra de *Escherichia coli* J-1, isolada de fezes diarreicas de bovinos, produtora de toxina STa, foi avaliada quanto à produção de toxinas VT, LT-I e bacteriocina, resistência a antimicrobianos, padrão de hemaglutinação frente a diferentes hemácias, produção de fímbrias já descritas através de aglutinação com antissoros e capacidade de adesão a enterócitos. A caracterização de fímbrias foi feita através de microscopia eletrônica e análise eletroforética de proteínas de superfície. Visando determinar a localização dos genes responsáveis pela codificação da fímbria F43ms e da toxina STa, a amostra J-1 foi avaliada quanto ao seu perfil plasmidial e submetida a testes de conjugação, mutação com transposon TnphoA, transformação, hibridização e eliminação plasmidial.

A amostra J-1 não se mostrou produtora de toxinas LT-I, VT, de bacteriocina e de nenhuma das fímbrias comumente encontradas em *E. coli* de origem animal. Nos testes de hemaglutinação, quando cultivada a 37°C, a amostra J-1 hemaglutinou hemácias de rato e carneiro, na presença do açúcar D-manose. Na ausência deste açúcar, hemaglutinou hemácias de cobaia. No cultivo a 16°C, não apresentou hemaglutinação.

Através de microscopia eletrônica, verificamos a presença de fímbrias de aproximadamente 7 nm no cultivo a

37°C. Na análise das proteínas de superfície verificamos uma grande semelhança entre as proteínas da amostra J-1 e da amostra ORN115, produtora de fímbria tipo 1. Através de imunofluorescência, verificamos adesão de fímbrias F43ms a enterócitos de bezerros.

A amostra J-1 apresentou quatro plasmídios, sendo que apenas um, de 26 Mda, com marca de resistência para estreptomicina, se mostrou conjugativo. Não obtivemos transconjugantes nas conjugações utilizando a amostra J-1 como receptora, tanto nos testes de mutação com transposon TnphoA, como no uso de plasmídios de incompatibilidade para eliminação plasmidial.

Não eliminamos os plasmídios da amostra J-1 utilizando agentes como novibiocina e brometo de etídio. Utilizando SDS conseguimos eliminar o plasmídio conjugativo de 26 Mda sem que, no entanto, a produção de fímbrias ou de toxina STa fosse alterada.

Através de hibridização com sonda para toxina STa, determinamos que os genes que codificam esta toxina estão localizados no plasmídio de 79 Mda. Não conseguimos marcar o plasmídio de 79 Mda com transposons para resistência a antimicrobianos, nas várias transformações realizadas. Não foi possível, portanto, determinar a localização dos genes responsáveis pela codificação e expressão da fímbria F43ms.

## 9. SUMMARY

An STa toxin producing strain of *Escherichia coli*, called J-1, was isolated from diarrheic bovines. It was evaluated focusing on five different aspects: (1) the production of bacteriocins, VT and LT-I toxins, (2) antibiotic resistance, (3) hemagglutination pattern facing different eritrocites, (4) occurrence of fimbria, by means of antiserum agglutination and (5) the ability of this strain to adhere to enterocytes. The characterization of the fimbriae was done through electronic microscopy and electrophoretic analysis of surface proteins. In order to determine the location of the genes responsible for coding F43ms fimbriae and STa toxin, the J-1 strain was studied as for its plasmid profile and was subdued to conjugation tests, mutation with TnphoA transposon, transformation, hibridization and plasmid cure.

The J-1 strain did not produce VT and LT-I toxins, bacteriocins and not even fimbria usually found in *E. coli* strains isolated from animals was produced.

In hemagglutination tests, when cultivated at 37°C, the J-1 strain showed positive reaction with sheep and rat eritrocites, in the presence of D-manose. When this sugar was absent, hemagglutination occurred with guinea pig eritrocites. When cultivated at 16°C, the J-1 strain did not show haemagglutination.

Using electronic microscopy, the presence of fimbria with 7 nm in diameter was observed when the bacteria was cultivated at 37°C. Analysing surface proteins, it was verified that there is a great similarity between the J-1 strain surface proteins and that of the ORN115 strain, which produces type 1 fimbriae. Adhesion was observed of F43ms to calf eritrocites through immunofluorescence.

The *E. coli* J-1 showed four plasmids whereas only one of them, of 26 Mda, resistant to streptomycin, was conjugative. We did not obtain transconjugants using J-1 strain as a receptor, either in TnphoA transposon mutation tests or using incompatibility plasmids for plasmid cure.

We did not eliminate the plasmids when using novobiocin or ethyidium bromide. Applying SDS, the conjugative plasmid of 26 Mda was eliminated, without changing STa toxin or fimbriae production.

By means of hibridization with specific probe for STa, it was determined that the genes coding STa toxin are placed in the 79 Mda plasmid. Although several transformations have been undergone, we could not manage to mark this plasmid with antibiotic resistance transposons. It was not possible, therefore, to determine the location of the genes responsible for coding and expressing F43ms fimbria.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adegbola, R. A. and Old, D. C. Antigenic relationships among type 1 fimbriae of enterobacteriaceae revealed by immunoelectronmicroscopy. *J. Med. Microbiol.*, **24**: 21-28, 1987.

Abraham, J. M.; Freitag, C. S.; Clements, J. R. & Eisenstein, B. I. An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 5724-5727, 1985.

Bachmann, B. J. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 7. *Microbiol. Rev.*, **47**: 180-230, 1983.

Bak, A. L.; Christiansen, C.; Christiansen, A.; Stenderup, I. Orskov, I. & Orskov, F. Circular DNA molecules controlling synthesis and transfer of the surface antigen (K88) in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, **73**: 373-385, 1972.

Birnboim, H. C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.*, **7**: 1513-1522, 1979.

Blum, H.; Beier, H. & Gross, H. J. Improved silver staining

- of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, **8**: 93-99, 1987.
- Bolivar, F. & Backman, K. Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. **Methods Enzymol.**, **68**: 245, 1979.
- Bouanchaud, D. H.; Scavizzi, M. R. and Chabbert, Y. A. Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in Enterobacteria and Staphylococci. **J. Gen. Microbiol.**, **54**: 417-425, 1969.
- Bradley, D. E. Interaction of drug resistance plasmids and bacteriophages with diarrheagenic strains of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **57**: 2331-2338, 1989.
- Brinton, C. C., Jr. Non-flagellar appendages of bacteria. **Nature**, **183**: 782-786, 1959.
- Castro, A. F. P.; Serafim, M. B.; Brito, J. R. F.; Barcellos, D. S. E. N. & Colli, I. A. G. Virulence factors present in cultures of *Escherichia coli* isolated from pigs in the region of Concórdia, Santa Catarina, Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, **4**: 109-114, 1984.
- Davis, B. D. & Minglioli, E. S. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12. **J. Bacteriol.**, **60**:

17-28, 1950.

Dean, A. G.; Ching, Y. C.; Willians, R. G. & Harden, L. B.  
Test for *Escherichia coli* enterotoxin of diarrhea in  
children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, **125**: 407-411,  
1973.

de Graaf, F. K. & Klaasen, P. Organization and expression of  
genes involved in the biosynthesis of 987P fimbriae. *MGG*,  
**204**: 75-81, 1986.

de Graaf, F. K. Klemm P. & Gaastra, W. Purification,  
characterization and partial covalent structure of the  
adhesive antigen K99 of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*,  
**33**: 877-883, 1981.

de Graaf, F. K. & Roorda, I. Production, purification and  
characterization of the fimbrial adhesive antigen F41  
isoleted from the calf enteropathogenic *Escherichia coli*  
strain B41 M. *Infect. Immun.*, **36**: 751-753, 1982.

Edwards, P. R. & Ewing, W. H. **Identification of  
Enterobacteriaceae**. 3ed. Minneapolis, Burgess Publishers,  
1972.

Evans, D. G.; Silver, R. P.; Evans, D. J., Jr.; Chase, D. G.

& Gorbach, S. L. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. *Infect. Immun.*, 12: 656-657, 1975.

Evans, D. G. & Evans, D. J., Jr. & Gorbach, S. L. Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect. Immun.*, 8: 725-730, 1973.

Evans, D. G. & Evans, D. J., Jr. New surface-associated heat-labile colonization factor (CFA/II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O6 e O8. *Infect. Immun.*, 21: 638-647, 1978.

Evans, D. G.; Evans, D. J., Jr; Clegg, S. & Pauley, J. A. Purification and characterization of the CFA/I antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 25: 738-748, 1979.

Evans, D. J. Jr.; Evans, D. G.; Young, L. S. & Pitt, J. Hemagglutination typing of *Escherichia coli* definition of seven hemagglutination types. *J. Clin. Microbiol.*, 12: 235-242, 1980.

Gaastra, W. & de Graff, F. S. Host-specific fimbrial adhesin of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains.



**Microbiol Rev.**, **46**: 129-161, 1982.

Graaf, F. K. Genetics of adhesive fimbriae of intestinal *Escherichia coli* In: Jann, K. & Jann, B. (eds.) **Current Topics in Microbiology and Immunology: Bacterial Adhesins**. pp. 29-53., Springer-Verlag, Berlin, 1990.

Guinée, P. A. M.; Veldkamp, J. & Jansen, W. H. Improved Minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **15**: 676-678, 1977.

Guinée, P. A. M. & Jansen, W. H. Detection of enterotoxigenic and attachment factors in *Escherichia coli* strains of human, porcine and bovine origin; a comparative study. **Zentralb. Bacteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. Reihe**, **243**: 245-257, 1979.

Hanson, M. S.; Hempel, J. and Brinton, Jr., C. Purification of the *Escherichia coli* type 1 pilin and minor pilus proteins and partial characterization of the adhesin protein. **J. Bacteriol.**, **170(8)**: 3350-3358, 1988.

Harwood, C. R. and Feavers, I. M. Testing for carriage of virulence factors by plasmids. In: Sussman, M. (ed.) **The virulence of *Escherichia coli* - Reviews and Methods**. cap.

24, pp. 429-443. Academic Press, Newcastle, 1985.

Hirota, Y. The effect of acridin dyes on mating type factors in *Escherichia coli*. **Genetics**, **46**: 57-64, 1960.

Hoefer Scientific Instruments. **Hoefer Electrophoresis Catalog and Exercises (1990-1991)**. San Francisco, 1990.

Honda, T.; Arita, M. & Miwatani, T. Characterization of new hydrophobic pili of human enterotoxigenic *Escherichia coli*: a possible new colonization factor. **Infect. Immun.**, **43**: 959-965, 1984.

Isaacson, R. E. K99 surface antigen of *Escherichia coli*: antigenic characterization. **Infect. Immun.**, **22**: 555-559, 1978.

Isaacson, R. E. Pilus Adhesins. In: Savage, D. C. & Fletcher, M. (eds.) **Bacterial Adhesion**. cap. 11, pp. 307-336. Plenum Press, New York, 1985.

Isaacson, R. E.; Fusco, P. C.; Brinton, C. C. and Moon, H. W. *In vitro* adhesion of *Escherichia coli* to porcine small intestinal epithelial cells: Pili as adhesive factors. **Infect. Immun.**, **21**: 392-397, 1978.

- Isaacson, R. E. and Richter, P. *Escherichia coli* 987P pilus: Purification and partial characterization. *J. Bacteriol.*, **146**: 784-789, 1981.
- Jayappa, H. G.; Goodnow, R. A. and Geary, S. J. Role of *Escherichia coli* type 1 pilus in colonization of porcine ileum and its protective nature as a vaccine antigen in controlling colibacillosis. *Infect. Immun.*, **48**: 350-354, 1985.
- Johnson, W. M.; Lior, H. & Bezanson, G. S. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. *Lancet*, **1**: 76, 1983.
- Jones, G. W. & Rutter, J. M. The association of K88 antigen with haemagglutinating activity in porcine strains of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, **84**: 135-144, 1974.
- Jones, G. W. & Rutter, J. M. Role of K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhoea caused by *Escherichia coli* in piglets. *Infect. Immun.*, **6**: 918-27, 1972.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685, 1970.

- Leite, D. S.; Garcia, M.; Yano, T. & Castro, A. F. P.  
Detecção da adesina FY em amostras de *Escherichia coli*  
isoladas de bezerros com diarreia no Brasil. *Rev.  
Microbiol.*, **20**: 292-295, 1989.
- Levine, M. M.; Reinnels, M.B. Daya, V. & Hughes, T. P.  
Hemmagglutination and colonization factors in  
enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli*  
that cause diarrhoe. *J. Infect. Dis.*, **141**: 733-37, 1980.
- Levine, M.M.; Ristaino, P.; Sack, R.B.; Kaper, J.B.; Orskov,  
F. & Orskov, I. Colonization factor antigens I and II and  
type 1 somatic pili in enterotoxigenic *Escherichia coli*:  
relation to enterotoxin type. *Infect. Immun.*, **39**: 889-97,  
1983.
- Levine, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea:  
enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive,  
enterohemorrhagic and enteroadherent. *J. Infect. Dis.*,  
**155**: 377-89, 1987.
- Lintermans, P. F.; Pohl, P.; Deboeck, F.; Bertels, A.;  
Schillicker, G.; VandeKerckhove, J.; Van Damme, J.; Van  
Montagu, M.; & de Greve, H. Isolation and nucleotide  
sequence of the F17-A gene encoding the structural

protein of the F17 fimbriae in bovine enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **56**: 1475-1484, 1988.

MacConnell, M. M.; Smith, H. R.; Willshaw, G. A.; Field, A. M. and Rowe, B. Plasmids coding for colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin production isolated from enterotoxigenic *Escherichia coli*: Comparison of their properties. **Infect. Immun.**, **32**: 927-936, 1981.

Macrina, F. L.; Kopecko, D. J.; Jones, K. R.; Ayers, D. J. & McCowen, S. M. A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. **Plasmid**, **1**: 417, 1978.

Manfio, G. P. Caracterização eletroforética e expressão das fimbrias FY e 31A de amostras de *Escherichia coli* de origem bovina . Campinas, 1990. 215 p. (Tese de Mestrado - Departamento de Genética e Evolução - Universidade Estadual de Campinas).

Miller, J. H. **Experiments in molecular biology**. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.

Mitsuhashi, S.; Harada, K. and Kameda, M. Elimination of transmissible drug-resistance by treatment with

- acriflavin. **Nature**, 18: 947, 1961.
- Mohammad, A.; Peiris, J. S. M.; Wijewanta, E. A.; Mahalingam, S. & Gunasekara, G. Role of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in cattle and buffalo calf diarrhoea. **FEMS Microbiol. Lett.**, 26: 281-83, 1985.
- Moon, H. W. Colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* in animals. In: Jann, K. & Jann, B. (eds.) **Current Topics in Microbiology and Immunology: Bacterial Adhesins**. pp. 147-165., Springer-Verlag, Berlin, 1990.
- Moon, H. W.; Kohler, E. M.; Schneider, R. A. & Whipp, S. C. Prevalence of pilus antigens, enterotoxin types and enteropathogenicity among K88-negative enterotoxigenic *Escherichia coli* from neonatal pigs. **Infect. Immun.**, 27: 222-230, 1980.
- Morris, J. A.; Chanterm, N. 7 Sherwood, D. Occurrence and properties of FY (Att 25)+ *Escherichia coli* associated with diarrhoea in calves. **The Veter. Rec.**, 121: 189-91, 1987.
- Morris, J. A.; Sojka, W. J. & Ready, R. A. Serological comparison of the *Escherichia coli* prototype strains for

the F(Y) and Att25 adhesins implicated in neonatal diarrhoea in calves. *Res. Vet. Sci.*, **38**: 246-247, 1985.

Morris, J. A.; Stevens, A. E. & Sojka, W. J. Isoelectric point of cell-free K99 antigen exhibiting hemagglutinating properties. *Infect. Immun.*, **19**: 1097-1098, 1978.

Morris, J. A.; Thorns, C. Scott, A. C. Sojka, W. J. & Wells, G. A. Adhesion in vitro and in vivo associated with an adhesine antigen (F41) produced by a K99-mutant of the reference strain *Escherichia coli* B41. *Infect. Immun.*, **36**: 1146-1153, 1982.

Moseley, S. L.; Dougan, G.; Scheneider, R. A. & Moon, H. W. Cloning of chromosomal DNA encoding the F41 adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli* and genetic homology between adhesins F41 and K88. *J. Bacteriol.*, **167**: 799-804, 1986.

Mullany, P.; Field, A. M.; McConnell, M. M.; Scotland, S. M.; Smith, H. R. & Rowe, B. Expression of plasmids coding for colonization factor antigen II (CFA II) and enterotoxin production in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, **129**: 3591-3601, 1983.

Murray B. E.; Evans, D. J.; Peneranda, M. E.; Evans, D. G.  
CFA/I-ST plasmids comparison of enterotoxigenic  
*Escherichia coli* (ETEC) of serogroups 025, 063, 078 e  
0128 and mobilisation from an R-factor-containing  
epidemic ETEC isolate. *J. Bacteriol.*, **153**: 566-570, 1983.

Nagy, B.; Moon, H. W. & Isaacson, R. E. Colonization of  
porcine small intestine by *Escherichia coli*: ileal  
colonization and adhesion by pig enteropathogens that  
lack K88 antigen and by some acapsular mutants. *Infect.*  
*Immun.*, **13**: 1214-1220, 1976.

Nagy, B.; Moon, H. W. & Isaacson, R. E. 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  
enteropathogenic *E. coli* *Infect. Immun.*, **16**: 344-352,  
1977.

Nakazawa, M.; Haritani, M.; Sugimoto, C. and Kashiwasaki, M.  
Colonization of enterotoxigenic *Escherichia coli*  
exhibiting manose-sensitive haemagglutination to the  
small intestine of piglets. *Microbiol. Immunol.*, **30**: 485-  
489, 1986.



Novick, R. P. Plasmid Incompatibility. **Microbiol. Rev.**, **51**: 381-395, 1987.

Old, D. C. Inhibition of the interaction between fimbrial heamagglutinins and erythrocytes by D-mannose and others carbohydrates. **J. Gen. Microbiol.**, **71**: 149-157, 1972.

Old, D. C. Hemagglutination methods in the study of *Escherichia coli*. In: Sussman, M. (ed.) **The virulence of Escherichia coli - Reviews and Methods**. cap. 10, pp. 287-313. Academic Press, Newcastle, 1985.

Ondorff, P. E.; Spears, P. A.; Schauer, D. & Falkow, S. Two models of control of *pil A*, the gene encoding type 1 pilin in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, **164**: 321-330, 1985.

Orskov, I.; Orskov, F.; Smith, H. W. & Sojka, W. J. The establishment of K99, a thermolabile, transmissible *Escherichia coli* K antigen, previously called "Kco", possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. **Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B.**, **83**: 31-36, 1975.

Orskov, I.; Orskov, F.; Sojka, W. J. & Leach, J. M. Simultaneous occurrence of *E. coli* B and L antigens in strains from diseased swine. **Acta Pathol. Microbiol.**

**Scand. Sect. B., 53:** 404-422, 1961.

Orskov, I.; Orskov, F.; Sojka, W. J. & Wittig, W. K antigens K88ab (L) and K88ac (L) in *E. coli*. A new O antigen: O147 and a new K antigen: K89 (B). **Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B., 62:** 439-447, 1964.

Orskov, I. & Orskov, F. Episome carried surface antigen K88 of *Escherichia coli*. In: Transmission of the determinant of K88 antigen and influence on the transfer of chromosomal markers. **J. Bacteriol., 91:** 69-75, 1966.

Orskov, I., Orskov, F. and Birch-Andersen, A. Comparison of *Escherichia coli* fimbrial antigen F7 with Type 1 Fimbriae. **Infect. Immun., 27:** 657-666, 1980.

Peneranda, M. E.; Mann, M. B.; Evans, D. G. & Evans, D. J. Jr. Transfer of an ST:LT:CFA/II plasmid into *Escherichia coli* K12 strain R1 by cotransformation with PSL 301 plasmid DNA. **FEMS Microbiol. Lett., 8:** 251-54, 1980.

Perry, S. H. & Porter, P. Immunological aspects of cell membrane adhesion demonstrated by porcine enteropathogenic *Escherichia coli*. **Immunology, 34:** 41-49, 1978.

Petric, M.; Karmali, S.; Richardson, S. & Cheung, R.

Purification and biological properties of *Escherichia coli* verocytotoxin. **FEMS Microbiol. Lett.**, **41**: 63-68, 1987.

Robinson, M. K.; Benett, P. M., Falkow, S. and Dodd, H. M. Isolation of a temperature-sensitive derivative of RP1. **Plasmid**, **3**: 343-347, 1980.

Salit, I. E. and Gotschlich, E. C. Hemagglutination by purified type 1 *Escherichia coli* pili. **J. Exp. Med.**, **146**: 1169-1180, 1977.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F. & Maniatis, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Shifferli, D. M.; Beachey, E. H. & Taylor, R. K. The 987P fimbrial gene cluster of enterotoxigenic *Escherichia coli* is plasmid encoded. **Infect. Immun.**, **58**: 149-156, 1990.

Shimizu, M.; Sakano, T.; Yamamoto, J. & Kitajima, K. Incidence and some characteristics of fimbriae FY and 31A of *Escherichia coli* isolates from calves with diarrhea in Japan. **Microbiol. Immun.**, **31(5)**: 417-426, 1987.

Shipley, P. L.; Gyles, C. L. & Falkow, S. Characterization

of plasmids that encode for the K88 colonization antigen.  
**Infect. Immun.**, 20: 559-60, 1978.

Silveira, W. D. Estudo plasmidial em amostras enterotoxigênicas de *Escherichia coli* produtoras do novo fator de colonização F42. Ribeirão Preto, 1986. 116 p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo).

Silveira, W. S.; Yano, T.; Azevedo, J. L. & Castro, A. F. P. Plasmid-mediated production of a new colonization factor (F42) in enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Rev. Brasil. Genet. X**, 4: 635-646, 1987.

Smith, H. R.; Cravioto, A.; Willshaw, G. A.; McConnell, M. M.; Scotland, S. M. Gross, R. J & Rowe, B. A plasmid coding for the production of colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin in strains of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 6: 255-60, 1979.

Smith, H. W. & Halls, S. Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods in *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. **J. Pathol. Bacteriol.**, 93: 499-529, 1967.

Smith, H. W. & Halls, S. The transmissible nature of the

- genetic factor in *Escherichia coli* that controls enterotoxin production. *J. Gen. Microbiol.*, 52: 319-34, 1968.
- Smith, H. W. & Linggood, M. A. Further observations on *Escherichia coli* enterotoxins with particular regard to those produced by atypical piglet strains and by calf and lamb strains: the transmissible nature of these enterotoxin and of a K antigen possessed by calf and lamb strains. *J. Med. Microbiol.*, 5: 243-50, 1972.
- Smith, H. R.; Scotland, S. M. & Rowe B. Plasmids that encode for production of colonization factor antigen II and enterotoxin production in strains of *Escherichia coli*. *Infec. Immun.*, 40: 1236-1239, 1983.
- Smyth, C. J. Two mannose-resistant haemagglutinins on enterotoxigenic *Escherichia coli* of serotype O6:K15:H16 or H<sup>-</sup> isolated from travellers' and infantile diarrhoea. *J. Gen. Microbiol.*, 128: 2081-2096, 1982.
- So, M.; Boyer, H. M.; Betlach, M. & Falkow, S. Molecular cloning of an *Escherichia coli* plasmid determinant that encodes for the production of heat-stable enterotoxin. *J. Bacteriol.*, 128: 463-472, 1976.

- Söderlind, O. & Möllby, R. Enterotoxins, O-groups and K88 antigen in *Escherichia coli* from neonatal pigs with and without diarrhoea. *Infect. Immun.*, 24: 611-616, 1979.
- Stirm, S.; Orskov, F.; Orskov, I.; & Birch-Andersen. Episome carried surface antigen K88 of *Escherichia coli*. III-Morphology. *J. Bacteriol.*, 93: 740-748, 1967.
- Tacket, C. O.; Maneval, D. R. & Levine, M. M. Purification, morphology, and genetics of a new fimbrial putative colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* O159:H4. *Infect. Immun.*, 55: 1063-1069, 1987.
- Taylor, R. K.; Manoil, C. and Mekalanos, J. J. Broad-host-range vectors for delivery of TnpA: use in genetic analysis of secreted virulence determinants of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.*, 171(4): 1870-1878, 1989.
- Thomas, L. V.; Cravioto, A.; Scotland, S. M. & Rowe, B. New fimbrial antigenic type (E8775) that may represent a colonization factor in enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans. *Infect. Immun.*, 35: 1119-1124, 1982.
- Thomas, L. V.; McConnell, M. M.; Rowe, B. & Field, A. M. The possession of three novel coli surface antigens by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains positive for the

putative colonization factor PCF8775. *J. Gen. Microbiol.*, **131**: 2319-2326, 1985.

To, S. C.-M.; Moon, H. W. & Runnels, P. L. Type 1 pili (F1) of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*: vaccine trial and tests for production in the small intestine during disease. *Infect. Immun.*, **43**: 1-5, 1984.

Tomoeda, M.; Inuzuka, M; Kubo, N. & Nakamura, S. Effective elimination of drug resistance and sex factors in *Escherichia coli* by sodium dodecyl sulfate. *J. Bacteriol.*, **95** (3): 1078-1089, 1967.

Way, J. C., Davis, M. A., Monsato, D.; Roberts, D. E. and Klekner, N. New Tn10 derivatives for transposon mutagenesis and for construction of lac Z operon fusions by transposition. *Gene*, **32**: 369-379, 1984.

Wilson, M. R. & Hohmann, A. W. Immunity to *Escherichia coli* in pigs: Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to isolated intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.*, **10**: 776-786, 1974.

Wolfson, J. S.; Hooper, D. C.; Swartz, M. N.; Swartz, M. D. and McHugh, G. L. Novobiocin-induced elimination of F'lac and mini-F plasmids from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*,

156: 1165-1170, 1983.

Yano, T.; Garcia, M.; Leite, D. S.; Camargo, I. J. B. de & Castro, A. F. P. Fimbriae-like adhesive factor (EAF 44) from a verocytotoxigenic *Escherichia coli* of bovine origin. *Res. Vet. Sci.*, 45: 418-19, 1988.

Yano, T.; Leite, D. S.; Camargo, I. J. B. de & Castro, A. F. P. A probable new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. *Microbiol. Immunol.*, 30: 495-508, 1986a.

Yano, T.; Tamashiro, W. M. S. C.; Garcia, M. & Castro, A. F. P. Detecção de Vero citotoxina (VT) em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia. *Rev. Microbiol.*, 17(4): 339-341, 1986b.

Yano, T.; Oliveira, M. S.; Fontes, C. F.; Almeida, A. C. P. & Castro, A. F. P. Detection of heat-labile (LT) enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* by radial immune hemolysis test: a modification for clinical use. *Med. Microbiol. Immunol.*, 177: 219-28, 1982.

Young, R. A. & Davis, R. W. Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80: 1194, 1983.