80671

SECRETARIA DE PÓS GRADUAÇÃO

Gilson Paulo Manfio

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À REDAÇÃO FINAL DE TESE DEFENDIDA PELO CANDIDATO GILSON PAULO MANFIO E APROVADA PELA COMISSÃO JULGADORA. 05/12/90

Caracterização Eletroforética e Expressão das Fímbrias FY e 31A de Amostras de *Escherichia coli* de Origem Bovina

BC/13111
IB/80671

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Area de Concentração: Genética.

Orientador: **Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira**

Campinas - SP

1990

T/UNICAMP
M313c

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

CM00010975-2

CLASSIF. I
AUTOR M313c
V. ..... EX. .....
TOMBO BC/ 13111

CM00068709

`A Maeve, à Sacha e à Yasmim ...

Agradecimentos

Ao Wanderley, professor, orientador, amigo e "chefe", por ter me iniciado na pesquisa e pela companhia e incentivo nestes 6 anos que estamos juntos.

`A Fabiana, Cleide, Feto (Bruno), Brochi e Valéria, pelo carinho e alegria que compartilhamos juntos.

`A Sílvia e Yano, pelas discussões, incentivo e momentos agradáveis no L5, e ao Yano pela participação na pré-banca.

Ao Mingo, pelas amostras bacterianas únicas, antissoros divinos, LT's e pelas discussões e dicas.

`A Stella --- sem a qual tudo seria muito mais difícil --- pela ajuda no laboratório e amizade.

Ao seu Manoel, pelas viagens ao fim do mundo para buscar sangue e pela ajuda com os animais.

`A Dra. Marlene Serafim, pela ajuda recebida e empréstimos de material e equipamento e à Isildinha, pela colaboração nos momentos de correria atrás de reagentes.

Ao Dr. Antonio F. Pestana de Castro, pelo incentivo durante a realização do trabalho e pela inestimável participação durante a pré-banca.

`A Lucila, pelo apoio e amostras bacterianas fornecidas.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica, em especial à Profa. Maria Alice Cruz Höffling, pelo apoio e empréstimo das facilidades para a realização das micrografias eletrônicas e fotografias.

`A Terezinha, pela inestimável ajuda que prestou nas realização das fotografias.

Ao Celso, pelas dicas nos géis, amizade e disponibilidade demonstrada em todas as horas.

Ao Prof. Avelino, pelo empréstimo de seu laboratório e pelas horas amenas na sua câmara fria.

Ao Vanderlei Canhos, pelo estímulo, apoio e oportunidades que abriu na minha carreira científica.

`A Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", pelo empréstimo dos equipamentos e da fantástica cuba de eletroforese.

`A Yoko, pelo apoio, amizade, participação na pré-banca e dicas.

Ao Luís Fernando, pelo grande trabalho de acabamento nas fotos.

Ao Maurinho, pela ajuda fantástica nos últimos momentos...

`A Diléa e Cláudio, pelo apoio desde o início.

`A Maeve, pela ajuda na elaboração e revisão do manuscrito, pela paciência e incentivo durante a redação deste trabalho.

`A Salsbury, pelo fornecimento de material.

`A Capes, pela concessão da Bolsa de Mestrado.

`A FAPESP, CNPq e FINEP, que pela conceção de auxílios para pesquisa, direta ou indiretamente, subsidiaram este trabalho.

Conteúdo

1. Introdução **1**

1.1. Adesão Bacteriana 3

1.2. Antígenos de Superfície de *Escherichia coli* 11

1.3. Classificação de *Escherichia coli* Patogênicas e Tipos de Fímbrias Associadas 14

1.3.1. *Escherichia coli* Uropatogênicas (UPEC) 16

1.3.2. *Escherichia coli* Meningíticas 20

1.3.3. *Escherichia coli* Enteropatogênicas (EPEC) 21

1.3.4. *Escherichia coli* Enterotoxigênicas (ETEC) 26

1.3.5. *Escherichia coli* Enteroinvasivas (EIEC) 34

1.3.6. *Escherichia coli* Enterohemorrágicas (EHEC) 35

1.3.7. *Escherichia coli* Enteroaderentes (EAEC) e *Escherichia coli* Enteroaderente-Agregativas (EA-AggEC) 37

1.4. *Escherichia coli* Patogênicas para Bovinos 40

2. Objetivos **43**

3. Material **44**

3.1. Amostras Bacterianas 44

3.2. Meios de Cultura 49

3.2.1. Agar Glicose Tamponado (AG) 49

3.2.2. Agar Sangue (AS) 50

3.2.3. BHI ("Brain-Heart Infusion Broth") 51

3.2.4. BHIA ("BHI Agar, Brain-Heart Infusion Agar") ...52

3.2.5. Caldo Simples 52

3.2.6. CAYE ("Casaminoacids-Yeast Extract") 53

3.2.7. CFA ("Colonization Factor Agar") 54
3.2.8. Meio LB ("Luria-Bertani Medium") 56
3.2.9. Meio LA ("Luria-Bertani Agar") 57
3.2.10. Meio LAXP ("Luria-Bertani Agar" + BCIP 40 *ug*/ml) 58
3.2.11. Agar MacConkey 59
3.2.12. Meio de Manutenção 59
3.2.13. MINCA 60
3.2.14. Meio Mínimo (MM) 61
3.2.15. Meio NB ("Nutrient Broth") 63
3.2.16. Meio NA ("Nutrient Agar") 64
3.2.17. TSB ("Tripticase Soy Broth") 64
3.2.18. Meio de Eagle (ME) 65
3.3. Soluções-Estoque de Antimicrobianos 66
3.3.1. Preparo dos Estoques de Antimicrobianos 66
3.3.2. Concentrações de Uso dos Antimicrobianos 67
3.4. Soluções e Reagentes de Uso Geral 68
3.4.1. Solução Salina 0,85% 68
3.4.2. Tampão PBS pH 7,4 68
3.4.3. Solução NaOH 5 N 69
3.4.4. Solução NaOH 10 N 69
3.4.5. Solução HCl 1 N 70
3.4.6. Solução EDTA 0,5 M (pH 8,0) 70
3.4.7. Solução SDS 10% 71
3.4.8. Solução SDS 20% 71
3.4.9. Soro Fetal Inativado de Bovino (SFIB) 72

3.5. Soluções para Preparação de Proteínas Totais, de Superfície e de Membrana 72
3.5.1. Solução de Tratamento 2X 72
3.5.2. Solução TCA 40% (w/v) 73
3.5.3. Solução Etanol-Éter Etílico (1v/1v) 73
3.5.4. Tampão Tris-Cl 3,3 mM (pH 7,4) 74
3.5.5. Tampão Tris-Cl 0,1 M - EDTA 10 mM (pH 7,2) 74
3.5.6. Tampão Tris-Cl 0,1 M - $MgCl_2$ 10 mM (pH 7,2) ... 74
3.5.7. Tampão Glicina-Sacarose (pH 9,2) 75
3.5.8. Tampão Tris-Cl 85 mM (pH 6,8) 75
3.5.9. Solução Triton X100 10% (v/v) 76
3.6. Soluções para SDS-PAGE 76
3.6.1. Solução de Monômero (30%T 2.7%C_{bis}) 76
3.6.2. Tampão de Gel de Corrida 4X 77
3.6.3. Tampão de Gel de Empacotamento 4X 77
3.6.4. Catalisador 77
3.6.5. "Overlay" de Gel de Corrida 78
3.6.6. Tampão de Corrida 78
3.7. Soluções para "Western Blotting" 79
3.7.1. Tampão de Transferência 79
3.7.2. Solução de Bloqueio PBS-SFIB 80
3.7.3. Solução de Lavagem PBS-Tween 80
3.7.4. Solução de Bloqueio Tris-NaCl-SFIB 80
3.7.5. Solução de Lavagem Tris-NaCl 81
3.8. Soluções para Revelação de Fosfatase Alcalina 81
3.8.1. Solução de Dimetilformamida 70% 81
3.8.2. Solução Estoque de NBT 82

3.8.3. Solução Estoque de BCIP 82
3.8.4. Tampão para Fosfatase Alcalina (pH 9,5) 82
3.8.5. Substrato Cromogênico para Fosfatase Alcalina 83
3.9. Soluções para Coloração de Prata 83
3.9.1. Fixador 84
3.9.2. Solução de Etanol 50% 84
3.9.3. Solução de Pré-Tratamento 84
3.9.4. Solução de Impregnação 85
3.9.5. Solução Reveladora 86
3.9.6. Solução de Bloqueio da Revelação 86
3.9.7. Solução de Metanol 50% 87
3.9.8. Solução de Preservação I 87
3.9.9. Solução de Preservação II 87
3.10. Soluções para Coloração de Coomassie Blue 88
3.10.1. Solução Estoque de Coomassie Blue R-250 1% .. 88
3.10.2. Solução Corante Coomassie Blue 88
3.10.3. Solução de Descoloração I 89
3.10.4. Solução de Descoloração II 89
3.11. Marcadores de Peso Molecular para SDS-PAGE 90
3.12. Soluções para Extração de DNA Plasmidial 91
3.12.1. Solução I 91
3.12.1. Solução II 91
3.12.3. Solução Acetato de Sódio 3 M 92
3.12.4. Solução III 92
3.12.5. Solução Estoque RNAse A 92
3.12.6. Solução de Resuspensão 6X 93

3.13. Soluções para Eletroforese de DNA em Gel de Agarose 94
3.13.1. Tampão TEB 5X 94
3.13.2. Tampão TEB 1X (pH 8,0) 94
3.14. Soluções para Visualização de DNA em UV 95
3.14.1. Solução Estoque de Brometo de Etídio 1% 95
3.14.2. Solução Corante de Brometo de Etídio 95
3.15. Soluções para Teste de Hemaglutinação 96
3.15.1. Solução de Alsevier 96
3.15.2. Tampão PBS pH 7,2 96
3.15.3. Tampão PBS/D-manose 1% 96
3.16. Soluções para Teste de Toxina STI 97
3.16.1. Solução Azul de Evans 2% 97
3.17. Soluções para Teste de Toxina LT 97
3.17.1. Tampão Salina-Veronal pH 7,4 97
3.18. Soluções para Teste de Adesão a Células Hela 98
3.18.1. Tampão de Sorensen pH 7,3 98
3.18.2. Solução Estoque May-Grünwald 2% 99
3.18.3. Corante de May-Grünwald (1:2) 99
3.18.4. Solução Estoque Giemsa 100
3.18.5. Corante de Giemsa (1:3) 100
3.19. Soluções para Preparação de Telas de Microscopia Eletrônica e Coloração Negativa 101
3.19.1. Solução de Parlódio 0,5% 101
3.19.2. Solução de Citocromo-c 101
3.19.3. Solução de PTA 1% 101

4. Métodos **103**

4.1. Teste de Pureza, Preservação e Manutenção dos Estoques das Amostras Bacterianas 103

4.2. Determinação do Nível de Resistência a Antimicrobianos 105

4.3. Determinação do Padrão de Hemaglutinação com Diferentes Eritrócitos 106

4.3.1. Crescimento das Amostras Bacterianas 106

4.3.2. Preparo dos Eritrócitos 106

4.3.3. Testes de Hemaglutinação em Lâmina 107

4.3.4. Testes de Micro-Hemaglutinação em Placa 108

4.3.5. Classificação dos Padrões de Hemaglutinação das Amostras Bacterianas 109

4.4. Visualização de Fímbrias Através de Microscopia Eletrônica de Transmissão 110

4.4.1. Preparo das Telas de Microscopia Eletrônica .. 110

4.4.2. Preparo das Amostras, Coloração Negativa com PTA e Visualização 112

4.5. Testes da Produção de Toxinas STI, LT, VT e Hemolisina 113

4.5.1. Teste da Produção de STI 113

4.5.2. Teste da Produção de LT 114

4.5.3. Teste da Produção de VT 115

4.5.4. Teste da Produção de Hemolisina 116

4.6. Testes de Aglutinação com Antissoros 117

4.6.1. Produção e Preparo dos Antissoros 117

4.6.2. Reações de Aglutinação 119

4.7. Extração e Eletroforese de DNA Plasmidial 119
4.7.1. Crescimento das Amostras Bacterianas e Extração de DNA Plasmidial 120
4.7.2. Eletroforese de DNA Plasmidial 122
4.8. Extração e Eletroforese de Proteínas 123
4.8.1. Proteínas Totais 123
4.8.2. Proteínas de Superfície 124
4.8.2.1. Extração de Proteínas de Superfície por "Shearing" 124
4.8.2.2. Extração de Proteínas de Superfície por Aquecimento a 60° C 126
4.8.2.3. Preparação de Proteínas de Superfície para SDS-PAGE 126
4.8.3. Proteínas de Membrana 127
4.8.4. Eletroforese de Proteínas em SDS-PAGE 128
4.8.5. Coloração de Coomassie Blue para Proteínas em Gel de SDS-PAGE 130
4.8.6. Coloração de Prata para Proteínas em Gel de SDS-PAGE 131
4.8.7. Preservação e Secagem dos Géis de SDS-PAGE.... 132
4.9. "Western Blotting" 133
4.10. Análises de Conjugação 135
4.11. Mutação com Transposon TnphoA 136
4.12. Teste de Adesão a Células HeLa 137
4.12.1. Cultivo e Preparo das Células HeLa 137
4.12.2. Crescimento das Amostras Bacterianas e Teste de Adesão 138

4.13. Teste de Patogenicidade em Camundongos 139

5. Resultados..... 142

5.1. Caracterização Biológica das Amostras Bacterianas.... 142

5.1.1. Resistência a Drogas 142

5.1.2. Produção de Toxinas ST, LT, VT e Hemolisina .. 144

5.1.3. Hemaglutinação com Diferentes Eritrócitos 146

5.1.3.1. Hemaglutinação em Lâmina 146

5.1.3.2. Micro-hemaglutinação 150

5.2. Caracterização Sorológica 152

5.3. Visualização de Fímbrias Através de Microscopia Eletrônica de Transmissão 157

5.4. Caracterização Eletroforética das Amostras Bacterianas 167

5.4.1. Padrão Eletroforético de Proteínas de Superfície 167

5.4.2. Padrão Eletroforético de Proteínas de Membrana 177

5.4.3. Perfil de DNA Plasmidial 179

5.5. Análises Genéticas por Conjugação 182

5.5.1. Transconjugantes Obtidos com a Amostra MS101 182

5.5.2. Análise de Hemaglutinação dos Transconjugantes 184

5.5.3. Análise Plasmidial dos Transconjugantes 184

5.6. Mutagênese com Transposon TnphoA 185

5.7. Teste de Adesão a Células HeLa 185

5.8. Teste de Patogenicidade em Camundongos 188

6. Discussão 189

7. Conclusão 208

8. Perspectivas 210

9. Resumo 211

10. Abstract 213

11. Referências Bibliográficas 215

Indice de Quadros e Tabelas

Quadro 1. Exemplos de processos infecciosos causados por microrganismos nos quais a adesão microbiana atua como fator importante, segundo Christensen *et alii* (1985) 7

Quadro 2. Tipos de hemaglutinação de *Escherichia coli*, segundo Evans *et alii* (1980) 13

Quadro 3. Principais fímbrias de *Escherichia coli* associadas a processos de patogenicidade 39

Tabela 3.1. Amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes bovinas diarréicas e não-diarréicas 45

Tabela 3.2a. Amostras de *Escherichia coli* utilizadas nos experimentos de caracterização fenotípica e genética 46

Tabela 3.2b. Plasmídios utilizados nos experimentos de caracterização fenotípica e genética 48

Tabela 3.3. Concentrações, diluentes e armazenamento das soluções estoque de antimicrobianos 67

Tabela 3.4. Concentrações de uso de antimicrobianos em meios sólido e líquido..... 67

Tabela 5.1. Padrão de resistência a drogas das amostras bacterianas 143

Tabela 5.2. Padrão de produção de toxinas STI, LT, VT e hemolisina (HL) 145

Tabela 5.3. Padrão de hemaglutinação em lâmina das amostras bacterianas cultivadas em meio CFA a 37° C 148

Tabela 5.4. Padrão de hemaglutinação em lâmina das amostras bacterianas cultivadas em meio AG a 37° C 148

Tabela 5.5. Padrão de hemaglutinação em lâmina das amostras bacterianas cultivadas em meio MINCA a 37° C 149

Tabela 5.6. Padrão de hemaglutinação em lâmina das amostras bacterianas cultivadas em meio MM a 37° C 149

Tabela 5.7. Padrão de micro-hemaglutinação com eritrócitos de boi das amostras bacterianas cultivadas em meio CFA, AG, AG- e MINCA a 37° C 151

Tabela 5.8. Reação de aglutinação das amostras bacterianas crescidas em meio CFA a 37° C com os antissoros policlonais a-31A+ e a-FY+ absorvidos e não-absorvidos 155

Tabela 5.9. Reação de aglutinação das amostras bacterianas crescidas em meio CFA a 16° C com os antissoros policlonais a-31A+ e a-FY+ absorvidos e não-absorvidos 155

Tabela 5.10. Reação de aglutinação das amostras bacterianas mutantes BZ43xp4 e BZ43 xp6 crescidas em meio CFA a 37° C com antissoros policlonais a-31A+ não-absorvidos e absorvidos 156

Tabela 5.11. Fenótipos dos transconjugantes Att25 x MS101 selecionados em meio LB com antibióticos 183

Tabela 5.12. Fenótipos dos transconjugantes 31A x MS101 selecionados em meio LB com antibióticos 183

Tabela 5.13. Fenótipos dos transconjugantes BZ2468 x MS101 selecionados em meio LB com antibióticos 183

Indice de Figuras

Figura 5.1. Micrografia eletrônica da amostra de *Escherichia coli* Att25 crescida a 37° C (a) e a 16° C (b), em coloração negativa com PTA 159

Figura 5.2. Micrografia eletrônica da amostra de *Escherichia coli* 54-5 crescida a 37° C (a) e a 16° C (b), em coloração negativa com PTA 160

Figura 5.3. Micrografia eletrônica da amostra de *Escherichia coli* 2147-4 crescida a 37° C (a) e a 16° C (b), em coloração negativa com PTA 161

Figura 5.4. Micrografia eletrônica da amostra de *Escherichia coli* 11a crescida a 37° C (a) e a 16° C (b), em coloração negativa com PTA 162

Figura 5.5. Micrografia eletrônica da amostra de *Escherichia coli* 31A crescida a 37° C (a) e a 16° C (b), em coloração negativa com PTA 163

Figura 5.6. Micrografia eletrônica da amostra de *Escherichia coli* BZ2468 crescida a 37° C (a) e a 16° C (b), em coloração negativa com PTA 164

Figura 5.7. Micrografia eletrônica da amostra de *Escherichia coli* BZ43 crescida a 37° C (a) e a 16° C (b), em coloração negativa com PTA 165

Figura 5.8. Micrografia eletrônica das amostras de *Escherichia coli* BZ43xp4 (a) e BZ43xp6 (b), mutagenizadas com TnphoA, crescidas a 37° C, em coloração negativa com PTA 166

Figura 5.9. Perfil eletroforético de proteínas de superfície das amostras FY+ (incluindo amostra 11a) em PAGE (12,5%), coradas com prata 169

Figura 5.10. Perfil eletroforético de proteínas de superfície das amostras 31A+ em PAGE (12,5%), coradas com prata 170

Figura 5.11. Perfil eletroforético de proteínas de superfície das amostras FY+ em PAGE (12,5%), coradas com prata 171

Figura 5.12. Perfil eletroforético de proteínas de superfície das amostras 31A+ (incluindo amostra 11a) em PAGE (12,5%), coradas com prata 172

Figura 5.13. Perfil eletroforético de proteínas de superfície da amostras 11a e fímbrias K99 e F41 purificadas, em PAGE (12,5%), coradas com prata 173

Figura 5.14. Perfil eletroforético de proteínas de superfície das amostras mutantes BZ43xp4 e BZ43xp6 em relação ao perfil da amostra BZ43, em PAGE (12,5%), coradas com prata 175

Figura 5.15. Perfil eletroforético de proteínas de totais das amostras mutantes BZ43xp4 e BZ43xp6 em relação ao perfil da amostra BZ43, em PAGE (12,5%), coradas com Coomassie Blue 176

Figura 5.16. Perfil eletroforético de proteínas de membrana das amostras 31A+, FY+ e dos mutantes BZ43xp4 e BZ43xp6, em PAGE (12,5%), coradas com prata 178

Figura 5.17. Perfil eletroforético de DNA plasmidial das amostras FY+ (incluindo 11a) em gel de agarose (0,6%) 180

Figura 5.18. Perfil eletroforético de DNA plasmidial das amostras 31A+ em gel de agarose (0,6%) 181

Figura 5.19. Adesão da amostra BZ43 a células HeLa em cultura de tecido 187

Abreviações

+	= resultado positivo
-	= resultado negativo
60S	= extrato de proteínas de superfície p/ aquecimento a 60°C
° C	= graus Celsius
a-31A$^+$	= antisoro anti-31A$^+$
a-FY$^+$	= antisoro anti-FY$^+$
abs.	= antisoro absorvido
AG	= meio ágar Glicose
Ap	= ampicilina
aprox.	= aproximadamente
BCIP	= 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BHI	= meio "Brain Heart Infusion"
BHIA	= meio "Brain Heart Infusion Agar"
boi	= eritrócitos de boi
cav	= eritrócitos de cavalo
CFA	= meio "Colonization Factor Agar"
Cm	= cloranfenicol
cob$^-$	= eritrócitos de cobaia na ausência de D-manose
cob^{Dm}	= eritrócitos de cobaia na presença de D-manose
Da	= Daltons
DNA	= ácido desoxirribonucleico
EA-AggEC	= *Escherichia coli* enteroaderente-agregativa
EAEC	= *Escherichia coli* enteroaderente
EAF	= fator de aderência de EPEC
EDTA	= ácido etilenodiaminotetra-acético
EHEC	= *Escherichia coli* enterohemorrágica
EIEC	= *Escherichia coli* enteroinvasiva
EPEC	= *Escherichia coli* enteropatogênica
esteril.	= esterilizada
ETEC	= *Escherichia coli* enterotoxigênica
F	= antígeno fimbrial de *Escherichia coli*
f	= reação fraca
fim	= fímbria
fla	= flagelo

g = grama
gal = eritrócitos de galinha
H = antígeno flagelar de *Escherichia coli*
h = hora
hs = horas
H? = antígeno H de *Escherichia coli* não-tipável
HL = hemolisina
hum = eritrócitos humanos de sangue tipo A^+
K = antígeno capsular de *Escherichia coli*
kDa = 10^3 Daltons
Km = canamicina
l = litro
LAXP = meio "Luria Agar" + BCIP 40 ug/ml
LT = toxina termolábil de *Escherichia coli*
MDa = 10^6 Daltons
mg = miligrama
Mili-Q = água destilada deionizada Mili-Q (Millipore)
min. = minuto(s)
ml = mililitro
MM = meio Mínimo
mm = milímetro
MRHA = hemaglutinação manose-resistente
MSHA = hemaglutinação manose-sensível
MW = peso molecular
n-abs. = antisoro não-absorvido
NA = meio "Nutrient Agar"
Nal = ácido nalidíxico
NBT = nitro blue tetrazolium
nd = não determinado / não realizado
NM = imóvel, ausência do antígeno H de *Escherichia coli*
O = antígeno somático de *Escherichia coli*
PBS = Tampão Salina-Fosfato
PT = extrato de proteínas totais
PTA = ácido fosfotúngstico
q.s.p. = quantidade suficiente para
RNA = ácido ribonucleico

S = sensível
s/d = sem diluição
SDS = dodecil sulfato de sódio; lauril sulfato
SDS-PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS
SFIB = soro fetal inativado de bovino
SH = extrato de proteínas de superfície por "shearing"
Sigma, MBG = "Sigma, Molecular Biology Grade"
SLT = "Shiga-like toxin", Verotoxina
Sm = estreptomicina
STI = toxina termoestável tipo I de *Escherichia coli*
Tc = tetraciclina
TCA = ácido tricloroacético
TEB = tampão Tris-EDTA-Borato
TEMED = N,N,N´N´,-tetrametil-etilenodiamino
Tris = TRIZMA base (Tris[hidroxi-metil]aminometano)
Tris-Cl = tampão Tris cujo pH foi ajustado com HCl
TSB = meio "Triptic Soy Broth"
U.F.C. = unidade formadora de colônia
ug = micrograma
ul = microlitro
UPEC = *Escherichia coli* uropatogênica
UV = luz ultra-violeta
VETEC = *Escherichia coli* verotoxigênica
VT = verotoxina ou "Shiga-like toxin"

1. Introdução

MDL90[1]

0> pili, bacterial or bacterial adhesion
1 : P=303 references

0> 1 and escherichia coli
2 : P=82 references

0> 2 and not human
3: P=43 references

A bactéria *Escherichia coli* é a espécie-tipo do gênero *Escherichia*, pertencente à família Enterobacteriaceae. Estes microrganismos, na sua maioria não-patogênicos, são bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, adaptados à existência comensal ou simbiótica por longos períodos como parte das comunidades microbianas intestinais normais de mamíferos e aves (Drasar & Hill, 1974; Hison & Williams, 1989).

Algumas amostras, contudo, apresentam características individuais que possibilitam o desenvolvimento de doenças infecciosas nos seus hospedeiros.

Estas características, denominadas **determinantes de virulência** ou **fatores de patogenicidade**, habilitam as amostras portadoras a serem patogênicas, através de processos como colonização, invasão e/ou destruição de tecidos, produção de toxinas, ou captação de produtos essenciais ao hospedeiro (Curtiss III *et alii*, 1988).

---

1 - Busca realizada nos arquivos da base de dados MEDLINE, referentes ao 1° semestre de 1990. Cortesia da Biblioteca Central, UNICAMP.

A diversidade de doenças infecciosas descritas na literatura médica e veterinária relacionando *E. coli* como o agente causal, vem sofrendo atualizações cada vez mais freqüentes com a descoberta de novos mecanismos de patogenicidade e também, com a elucidação dos processos infecciosos de doenças já descritas (Levine, 1987). Estas doenças compreendem desde diarréias e disenterias em neonatos e adultos até infecções urinárias, meningites e septicemias (Hison & Williams, 1989; Levine, 1984, 1985, 1987).

O estabelecimento da infecção é determinado por uma combinação de fatores dependentes da amostra bacteriana e da constituição do organismo hospedeiro. Como exemplos, a existência de determinantes na superfície bacteriana capazes de reconhecer receptores específicos no epitélio do hospedeiro, permitindo a adesão, multiplicação da bactéria e colonização deste epitélio; a presença ou não de receptores para os determinates bacterianos nas células do tecido-alvo; ou ainda a capacidade do sistema imune do hospedeiro em evitar o estabelecimento da infecção. Assim, o processo infeccioso deve ser encarado como uma interação dinâmica entre o parasita e o hospedeiro.

1.1. Adesão Bacteriana

Em infecções por amostras de *Escherichia coli* enteropatogênicas, a capacidade de aderir a tecidos específicos do hospedeiro antes da colonização pode ser mediada por organelas na superfície microbiana, denominadas **adesinas** ou **fatores de colonização**. A adesão bacteriana ao tecido hospedeiro através de adesinas promove resistência às forças peristálticas, que tendem continuamente a removê-las (Christensen *et alii*, 1985).

As adesinas bacterianas podem ser classificadas, de maneira geral, em estruturas proteicas ou exopolissacarídicas. As adesinas proteicas normalmente são estruturas filamentosas, não flagelares, capazes de promover adesão a células do organismo hospedeiro. As adesinas de natureza polissacarídica compreendem os polissacarídeos capsulares bacterianos, capazes de promover adesão inespecífica a células e outras superfícies (Christensen *et alii*, 1985).

Fímbrias são estruturas protéicas filamentosas com estrutura e diâmetro regulares, mas que não necessariamente apresentam capacidade de adesão. Fímbria e adesina têm sido empregados normalmente como sinônimos, porém uma distinção clara deve ser feita quanto ao uso destas, pois uma fímbria pode não apresentar capacidade de adesão e uma adesina não é necessariamente uma estrutura fimbrial, com estrutura e diâmetro regulares (Christensen *et alii*, 1985).

Pili é uma denominação reservada a outro grupo de organelas, semelhantes a fímbrias, capazes de promover adesão entre células procarióticas para o processo de transferência de informação genética através de conjugação (Christensen *et alii*, 1985).

Uma outra categoria de adesinas protéicas bacterianas engloba as adesinas não-fimbriais, que se apresentam como estruturas amorfas ou como fibrilas de diâmetro muito reduzido em relação ao tamanho das fímbrias (às vezes menor que 3 nm), dificilmente visualizadas pela metodologia usual de coloração com ácido fosfotúngstico (PTA) (Hinson & Williams, 1989).

A adesão com o envolvimento de fímbrias pode ser específica, quando a fímbria reconhece e se liga a um receptor específico na superfície da célula hospedeira, ou inespecífica, quando se liga a uma variedade de receptores, permitindo a adesão a vários substratos. A adesão específica pode ser diferenciada da inespecífica através da constatação do bloqueio da adesão em três situações experimentais: 1) na presença de um excesso de receptores livres (ou análogos do receptor) ou na presença de um excesso de fímbrias isoladas (ou análogos da fímbria); 2) após um tratamento químico ou enzimático do microrganismo ou da superfície da célula hospedeira; e, 3) na presença de um anti-receptor ou de anticorpos anti-fímbria. Na primeira situação os receptores livres, em excesso em uma solução, se ligam aos sítios de adesão das fímbrias e a bactéria não dispõem de sítios

ligantes livres para adesão aos receptores na superfície da célula alvo. O excesso de fímbrias isoladas atuaria de maneira semelhante, bloqueando os receptores disponíveis na célula hospedeira, fazendo com que não sobrem receptores livres para ligação com as fímbrias do microrganismo. Na segunda situação um tratamento químico ou enzimático da bactéria ou superfície de adesão pode remover ou inativar os receptores e/ou fímbrias, impedindo a adesão. Na terceira situação, ocorre o bloqueio ou inativação dos receptores ou das fímbrias pela ligação do anti-receptor ou do anticorpo anti-fímbria a estes (Christensen *et alii*, 1985).

Um terceiro tipo de adesão descrita, denominada coagregação, está relacionada com a formação de agregados de células bacterianas, geralmente pertencentes a espécies ou gêneros diferentes. As bactérias de uma espécie aderem ao epitélio. Em seguida aderem a elas, bactérias de uma segunda espécie, colonizando, indiretamente, o epitélio (Derek & Handley, 1989).

A adesão bacteriana é o estágio inicial do processo de patogenicidade em amostras de *Escherichia coli* entéricas. Para que esta bactéria tenha sucesso como patógeno é necessário que ela colonize o epitélio intestinal onde aderiu e desencadeie o processo de patogenicidade, seja pela produção de toxinas relacionadas à ocorrência de diarréia, destruição do epitélio ou invasão dos tecidos (Christensen *et alii*, 1985; Levine, 1985).

Christensen *et alii* (1985) referem-se a quatro categorias de evidências experimentais para ressaltar a importância da adesão microbiana no processo de patogenicidade (Quadro 1).

Quadro 1. Exemplos de processos infecciosos causados por microrganismos nos quais a adesão microbiana atua como fator importante, segundo Christensen *et alii* (1985).

a. Exemplos nos quais a aderência bacteriana *in vitro* se correlaciona com a aderência bacteriana *in vivo*.

Infecção (hospedeiro)	Microrganismo	Descrição
Cistite (camundongo)	*Escherichia coli*	Infecção experimental correlacionada com a presença de adesinas, fímbrias tipo I.
Pielonefrite (camundongo e humana)	*Escherichia coli*	Infecção experimental (camundongo) e natural correlacionadas com adesinas, fímbria P.
Diarréia (humana)	*Escherichia coli*	Infecção experimental e natural correlacionadas com adesinas, CFA/I, CFA/II e outras.
Uretrite (humana)	*Neisseria gonorrhoeae*	Infecção experimental e natural correlacionadas com adesinas, fímbrias e proteínas de membrana externa tipo II.
Endocardite (coelho)	*Streptococcus sanguis*	Infecção experimental correlacionada com adesinas.
Endocardite (humana)	Várias bactérias	Infecção natural correlacionada com adesão às válvulas cardíacas.
Otite média (humana)	*Streptococcus pneumoniae*	Infecção natural correlacionada com adesão às células epiteliais faríngeanas.
Infecção de catéter intravascular (humana)	*Staphylococcus* spp. coagulase-negativos	Infecção natural correlacionada com adesão ao catéter.
Mastite (bovina)	*Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp.	Infecção natural correlacionada com adesão ao epitélio do ducto.
Vaginite (humana)	*Candida* spp.	Colonização correlacionada com a adesão às células epiteliais vaginais.

Quadro 1. Continuação.

b. Exemplos nos quais a especificidade de hospedeiro se correlaciona com a aderência bacteriana *in vitro* a tecidos do hospedeiro.

Infecção (hospedeiro)	Microrganismo	Descrição
Diarréia (humana)	*Escherichia coli* enterotoxigênicas	Amostras humanas aderem a células ileais humanas; amostras enterotoxigênicas isoladas de porco, boi e coelho não aderem.
Diarréia (coelho)	*Escherichia coli* (amostra RDEC-1)	Amostras de coelhos aderem apenas a células ileais de coelho e não aderem a células ileais de rato, cobaia, porco ou humana.
Disenteria (cobaia)	*Shigella flexneri*	*Shigella* produz disenteria em humano e cobaia, amostras humanas aderem a células epiteliais do cólon de cobaia em maior freqüência que a células de rato, coelho e hamster.
Inflamação pélvica (humana)	*Neisseria gonorrhoeae*	Adesão ao oviduto humano e não adesão aos ovidutos de coelho, porco ou bovino.
Microflora oral (humana)	*Streptococcus* spp. e difteróides	Amostras humanas e de rato aderem apenas a esfregaços de mucosa lingual do hospedeiro homólogo e não aos esfregaços heterólogos.

Quadro 1. Continuação.

c. Exemplos nos quais os tropismos a tecidos correlacionam-se com a aderência bacteriana *in vitro* a tecidos do hospedeiro.

Tecido alvo (hospedeiro)	Microrganismo	Descrição
Nasofaringe (humana)	*Neisseria meningitidis*	Adere mais a células nasofaringeanas que a células epiteliais da boca, bexiga e do epitélio nasal anterior.
Nasofaringe (coelho)	*Pasteurella multocida*	Adere mais a células nasofaringeanas escamosas que a células nasofaringeanas ciliadas ou células de outros tecidos.
Cólon (cobaia)	*Shigella flexneri*	Adere melhor ao cólon descendente, em menor grau ao cólon transverso e pouco ao cólon ascendente; não adere ao íleo, jejuno ou duodeno.
Bexiga (humana)	*Staphylococcus saprophyticus*	Adere mais a células urogenitais que a células epiteliais da pele e boca.
Pele e orofaringe (humana)	*Streptococcus pyogenes*	Amostras de pele e orofaringe aderem melhor ao tecido homólogo que ao tecido heterólogo.
Traquéia e brônquio (humana)	*Pseudomonas aeruginosa*	Adere mais a células nasais e traqueais que a células do epitélio bucal.
Epitélio urinário (bovino)	*Corynebacterium renale*	Adere mais a células superficiais do epitélio urinário que a células basais.
Traquéia (hamster)	*Bordetella pertussis*	Adere apenas a epitélio ciliado.

Quadro 1. Continuação.

d. Exemplos nos quais a susceptibilidade do hospedeiro correlaciona-se com a aderência bacteriana *in vitro* a tecidos do hospedeiro.

Hospedeiro susceptível	Microrganismo	Descrição
Pacientes com fibrose cística	*Pseudomonas aeruginosa*	Adesão a células do epitélio bucal é maior em pacientes susceptíveis à fibrose cística.
Portadores de *Staphylococcus aureus* na cavidade nasal	*Staphylococcus aureus*	Adesão a células da mucosa nasal é maior nos pacientes portadores de *S. aureus*.
Pacientes com febre reumática	*Staphylococcus pyogenes*	Adesão a células faringeanas é maior nos pacientes com febre reumática.
Pacientes com infecção do trato urinário	*Escherichia coli*	Adesão a células dos epitélios vaginal, bucal e urinário é maior em pacientes com infecção urinária freqüente.
Septicemia neonatal (humana)	*Streptococcus agalactiae*	Adesão a células do epitélio bucal de neonatos é maior nas células de nenonatos com infecção que nas de neonatos sadios; adesão a células de neonatos é maior que a adesão a células de adultos.
Gonorréia (mulheres)	*Neisseria gonorrhoeae*	Adesão a células do epitélio vaginal é maior em mulheres em pós-menopausa sob tratamento com estrógeno (equivalentes a mulheres jovens) que em mulheres em pós-menopausa sem tratamento com estrógeno.

1.2. Antígenos de Superfície de *Escherichia coli*

Escherichia coli possue, associada à sua superfície, uma variedade de proteínas e polissacarídeos com capacidade antigênica.

Os antígenos de superfície de *E. coli* são divididos em três grupos, segundo as proposições e terminologias de Weil & Felix (1918a,b, *apud* Gaastra & Graaf, 1982), Kauffmann & Vahlne (1946, *apud* Gaastra & Graaf, 1982) e Kauffmann (1947, *apud* Levine, 1987), em: antígenos somáticos, simbolizados pela letra **O**; antígenos flagelares, simbolizados pela letra **H**; e antígenos capsulares, simbolizados pela letra **K**.

Os 171 antígenos somáticos O conhecidos em *E. coli* são lipopolissacarides, formando complexos associados à membrana externa da bactéria. São termoestáveis e não são inativados à temperaturas de 100° C ou 121° C (Gaastra & de Graaf, 1982; Levine, 1987).

Os antígenos flagelares H são proteicos e termosensíveis, sendo inativados a 100° C (Gaastra & de Graaf, 1982). São conhecidos 56 antígenos H em *Escherichia coli* (Levine, 1987).

Os antígenos K, introduzidos por Kauffman & Vehlne (1946), são polissacarídeos, geralmente acídicos, que formam um envelope ou cápsula ao redor da parede celular da bactéria e podem promover a adesão a superfícies (Gaastra & de Graaf, 1982; Levine, 1987).

Os antígenos O e H constituem o sistema de classificação O:H, introduzido por Kauffman em 1947 (Levine, 1987), o qual é empregado na caracterização dos sorotipos de amostras patogênicas de *Escherichia coli*. A sorogrupagem[2] é também fundamental na definição do grupo de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC) (Levine, 1987) e auxilia a definição dos outros grupos de amostras patogênicas entéricas: *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC) e enteroemorrágica (EHEC), descritos a seguir.

Uma classificação complementar, proposta por Evans *et alii* (1979, 1980) refere-se aos padrões de hemaglutinação de eritrócitos na presença de D-manose nas amostras de *E. coli* patogênicas. A capacidade de alguns tipos de fímbrias de *E. coli* de promoverem adesão a receptores específicos confere especificidade na infecção e na colonização do hospedeiro ou do grupo de hospedeiros. Uma descrição dos padrões de hemaglutinação e dos tipos de fímbrias de *Escherichia coli* encontra-se nos Quadros 2 e 3.

---

2 - Classificação baseada apenas em antígenos somáticos (O).

Quadro 2. Tipos de hemaglutinação de *Escherichia coli*, segundo Evans *et alii* (1980).

Grupos de Hemaglutinação	Hemaglutinação com Eritrócitos de: hum	boi	gal	mac	cob	Tipo de Hemaglutinação Produzida[3]
I-A	R	R	R	-	-	MR com eritrócitos hum, boi e gal
I-B	R	R	R	S	S	
II-A	-	R	R	-	-	MR com eritrócitos boi e gal
II-B	-	R	R	S	S	
II-C	S	R	R	S	S	
III-A	-	-	S	S	S	MS com eritrócitos gal, mac e cob
IV-A	S	-	S	S	S	MS com eritrócitos hum, gal, mac e cob
IV-B	-	-	-	-	-	Hemaglutinação não-detectável
V-A	R	-	-	-	-	MR monoespecífica
V-B	-	R	-	-	-	
V-C	-	-	R	-	-	
V-D	-	-	-	R	-	
V-E	-	-	-	-	R	
V-F	R	-	S	S	S	
V-G (outros)						
VI-A	R	-	R	R	-	MR com eritrócitos hum e mac
VI-B	R	-	R	R	S	
VI-C	R	-	-	R	-	
VI-D	R	-	S	R	S	
VI-E	R	-	R	R	R	
VI-F	R	-	S	R	R	
VI-G (outros)						
VII-A	R	R	-	-	-	MR com eritrócitos hum e boi
VII-B	R	R	-	S	S	
VII-C	R	R	S	S	S	
VII-D (outros)						

Eritrócitos: hum = humano tipo A boi = bovino
gal = galinha cob = cobaia
mac = macaco verde africano
R, MR = hemaglutinação manose-resistente (MRHA).
S, MS = hemaglutinação manose-sensível (MSHA).
\- = hemaglutinação negativa.

3 - Descrição da padrão principal do grupo. Variações, principalmente quanto à hemaglutinação manose-sensível, são designadas por subgrupos.

1.3. Classificação de *Escherichia coli* Patogênicas e Tipos de Fímbrias Associadas

Escherichia coli pode apresentar diversos fatores de patogenicidade associados a entidades clínicas diferentes, como diarréia, disenteria, cistite, pielonefrite, meningite e septicemia (Hanson *et alii*, 1988; Hinson & Williams, 1989; Levine, 1980, 1987; O'Brien & Holmes, 1987).

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

1. ***Escherichia coli* uropatogênicas (UPEC)**: causadoras de infecções a nível do trato urinário, mais freqüentemente infecção urinária (cistite) e pielonefrite.

2. ***Escherichia coli* meningíticas**: causadoras de meningite purulenta em neonatos.

3. ***Escherichia coli* enteropatogênicas clássicas (EPEC)**: causadoras de infecções a nível intestinal, classicamente, diarréia neonatal, de natureza epidêmica. Podem ser subdivididas em dois subgrupos: EPEC I e II, de acordo com o tipo característico da adesão a células em cultura de tecidos.

4. ***Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC)**: causadoras de diarréia infantil em países em desenvolvimento e diarréia de viajantes ("traveler's diarrhea"), através da produção de enterotoxina termoestável (ST) e termolábil (LT).

5. ***Escherichia coli* enteroinvasivas (EIEC)**: causadoras de disenteria febril semelhante a disenteria causada por *Shigella.*

6. ***Escherichia coli* enterohemorrágicas (EHEC)**: causadoras de colite hemorrágica e síndrome urêmica hemorrágica; diferenciável da diarréia causada por EIEC devido à ausência de febre e leucócitos fecais.

7. ***Escherichia coli* enteroaderentes (EAEC)**: associadas à ocorrência de diarréia, porém pouco se sabe sobre sua patogenicidade e epidemiologia.

A classificação adotada para amostras de *Escherichia* coli de origem humana não é adequada, contudo, para a classificação de algumas amostras de origem não-humana, como é o caso de amostras associadas a mastite e infecções septicêmicas em animais, amostras produtoras de verotoxina (VETEC), e amostras uropatogênicas e meningíticas, as quais são ainda pouco estudadas em animais (T. Yano, comunicação pessoal, 1990).

Os parâmetros para caracterização destas diferentes classes de *Escherichia coli* patogênicas são:

1) sítio da lesão e tipo de resposta clínica ocasionada e características da infecção (febre, diarréia sanguínea, leucocitose, cólicas, disenteria);
2) grau de invasibilidade da bactéria no organismo hospedeiro e tipo de lesão característica;
3) produção de toxinas: termoestáveis (STI ou STII), termolábeis (LTI e LTII) e verocitotoxina ou "Shiga-like toxin" (SLT ou VT);

4) sorogrupo (O) ou sorotipo (O:H) ao qual pertence a amostra envolvida; e,
5) característica de adesão a células epiteliais *in vivo* ou *in vitro*.

1.2.1. *Escherichia coli* Uropatogênicas (UPEC)

A definição deste grupo é baseada no tipo de infecção promovida pela bactéria, como, por exemplo, amostras isoladas de trato urinário responsáveis pela ocorrência de infecções urinárias, cistites ou pielonefrites, o que permite a subdivisão funcional deste grupo em dois subgrupos: amostras associadas a pielonefrite (*Escherichia coli* pielonefríticas) e amostras associadas a infecção do trato urinário (*E. coli* cistíticas) (Levine, 1984).

A caracterização das amostras de UPEC e dos subgrupos é feita através da detecção de fímbrias específicas e determinação de sorogrupos. Aproximadamente 70% das amostras isoladas de pacientes com pielonefrite e 55% das amostras de pacientes com cistite se enquadram nos sorogrupos O1, O2, O4, O6, O7, O16, O18 e O75 e dentre os antígenos K mais freqüentes encontram-se K1, K2, K3, K5, K12 e K13 (Levine, 1984).

Amostras de *E. coli* uropatogênicas podem apresentar normalmente fímbrias do tipo I e fímbrias tipo P, classificadas de acordo com o tipo de receptor envolvido na

adesão destas fímbrias e hemaglutinação de eritrócitos (Aronson *et alii*, 1979; Christensen *et alii*, 1985; Van Die *et alli*, 1988; Hagberg *et alii*, 1983; Hagbert *et alii*, 1981; Leffler & Svanborg-Eden, 1981; de Ree *et alii*, 1985).

Fímbrias tipo I reconhecem resíduos de D-manose como receptores específicos e podem aderir a quase todos os tecidos humanos, como células sanguíneas (hemácias e leucócitos), células do epitélio bucal, enterócitos, células uroepiteliais e uromucóide (proteína de Tamm-Horsfall) (Davis *et alii*, 1981; Duguid & Old, 1980; Firon *et alii*, 1982). Fímbrias tipo I são tubulares, com diâmetro de 7 nm, e compostas por três subunidades proteicas em menor quantidade (28.000, 16.500 e 14.500 Da) associadas à estrutura tubular composta por subunidade de pilina de 17.000 Da (Hanson *et alii*, 1988). Hanson *et alii* (1988) caracterizaram a subunidade de 28.000 Da como sendo a subunidade da porção proteica ligante ao resíduo de manose, responsável pela capacidade de adesão. A sua regulação não é temperatura-dependente e o controle genético é cromossômico. Apresenta a característica de variação de fase, com a subseqüente perda de expressão durante várias gerações da bactéria, devido à inversão de um fragmento de 314 pb contendo o promotor do gene *fimA*, codificador da subunidade da fímbria (Hinson & Williams, 1987; Maurer & Orndorff, 1987).

Apesar da sua capacidade de colonizar vários epitélios, não se encontrou uma associação de *Escherichia*

coli portadoras de fímbrias tipo I e diarréia causada por ETEC (Gaastra & DeGraaf, 1982).

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

A associação de *E. coli* portadora de fímbrias tipo I e pielonefrite humana foi descrita por Rene & Silverblatt (1982), que verificaram a ocorrência de uma resposta imune específica contra fímbria tipo I nos pacientes infectados. Esta associação, contudo, não foi confirmada em trabalhos posteriores (Hagbert *et alii*, 1981; Leffler & Svanborg-Eden, 1981).

Ofek *et alii* (1981) sugerem que a ocorrência de fímbrias tipo I em *Escherichia coli* uropatogênicas é mais importante no processo de iniciação da infecção que na persistência da infecção no trato urinário.

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

Fímbrias tipo **pap** reconhecem a alfa-D-galactose-(1,4)-beta-D-galactose como receptor específico, a qual está associada ao tipo sanguíneo P (Van Die *et alii*, 1988). Portadores do fenótipo P ou P2, por expressarem o receptor em maior quantidade, são mais susceptíveis à adesão bacteriana que os portadores de fenótipo p (Levine, 1984).

As fímbrias do grupo **prs** reconhecem o antígeno de Forssman, constituinte de eritrócitos de carneiro, o qual também está presente no epitélio da pelvis renal humana, ligando-se ao resíduo de galactose-N-acetil-alfa(1--3)galactose-N-acetil, (Arthur *et alii*, 1989).

O grupo de fímbrias P, congrega vários sorotipos distintos, reconhecidos como F7 a F13 (van Die *et alii*, 1988). Alguns sorotipos foram codificados por Orskov & Orskov (1983), como F7 a F11, e apresentam hemaglutinação manose-resistente com eritrócitos humanos. Algumas destas fímbrias encontram-se clonadas (van Die *et alii*, 1988; de Ree *et alii*, 1985). No caso da fímbria F11, a propriedade de hemaglutinação de eritrócitos, e portanto de adesão ao receptor, e a expressão da fímbria são características distintas, mediadas por subunidades proteicas diferentes, codificadas independentemente no "cluster" gênico clonado. Mutantes fimbriados sem capacidade de aglutinação de eritrócitos e mutantes hemaglutinantes sem fímbria são fenótipos passíveis de ocorrência neste caso.

O mecanismo de montagem das fímbrias tipo P encontra-se descrito e compreende um operon com 9 genes associados à regulação, síntese, transporte e montagem da subunidade do pilus e à codificação da adesina específica (Arthur *et alii*, 1989). Os operons *pap* e *prs* são diferentes, contudo estudos de transcomplementação demonstraram que a codificação das adesinas específicas é a única diferença funcional entre estes dois operons, sendo que o gene *papG*

codifica a adesina específica para eritrócitos do tipo sanguíneo P e o gene *prsG* codifica a adesina específica para o antígeno de Forssman (Arthur *et alii*, 1989).

1.2.2. *Escherichia coli* Meningíticas

Overall (1970, *apud* Levine, 1984), num estudo sobre sobre meningite neonatal com 54.535 crianças apontou a ocorrência de 25 casos de meningite neonatal, resultando numa relação de 0.45 em cada 1000 nascidos vivos. Numa estimativa geral, 40-80% dos casos de meningite neonatal são devido a infecções por *Escherichia coli* meningíticas e aproximadamente 80% das amostras isoladas apresentam antígeno capsular K1.

O antígeno K1, denominado ácido colomínico, é um polissacarídeo acídico formado por um homopolímero 2-->8-alfa do ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico). O antígeno K1 de *E. coli* é idêntico em estrutura química ao polissacarídeo ácido do grupo B de *Neisseria meningitidis*, com o qual apresenta identidade imunológica completa (Levine, 1984).

A infecção por *Escherichia coli* K1 provem da flora natural materna (o cólon de 20-40% dos indivíduos é colonizado por amostras K1), e em 1 entre 2000-4000 neonatos, *E. coli* K1 invade a corrente circulatória e desenvolve meningite (Levine, 1984).

O polissacarídeo K1 apresenta ainda propriedades antifagocíticas, conferindo à bactéria resistência a fagocitose por polimorfonucleares (Levine, 1984).

Contudo, nem todas as amostras portadoras do antígeno K1 apresentam a capacidade de invasão e desenvolvimento de meningite. A ocorrência de amostras patogênicas parece estar restrita a alguns sorogrupos específicos, todos associados ao antígeno capsular K1: O18a.c:K1, O7:K1, O1:K1, e em menor freqüência O75:K1 (Levine, 1982).

1.2.3. *Escherichia coli* Enteropatogênicas (EPEC)

As amostras de *Escherichia coli* classificadas como EPEC constituem um grupo controverso de amostras, causadoras de diarréia, vômito e febre em crianças e neonatos. São agrupadas com base em seus sorogrupos e sorotipos, sendo altamente enteroadesivas (Knutton *et alii*, 1987), e não apresentam produção de toxinas ST e LT, nem capacidade de invasão de tecidos (Levine, 1987).

A determinação do antígeno somático O era o único método diagnóstico para EPEC até o início de 1970, uma vez que os testes e modelos animais disponíveis até então não permitiam a distinção entre as bactérias patogênicas das amostras da flora normal (Levine, 1987).

A definição dos principais sorogrupos envolvidos neste tipo de diarréia foi realizada com base em evidências

epidemiológicas, estudos com voluntários e através da compilação dos dados de Ewing *et alii* (1963, *apud* Levine, 1987) e Taylor (1961, *apud* Levine, 1987).

Os sorogrupos de EPEC apresentam a seguinte subdivisão quanto ao grau de envolvimento das amostras do grupo como patógenos: 1) Classe I, agrupa os sorogrupos mais importantes. Geralmente apresentam o "fator de adesão de EPEC" (EAF^+) e adesão do tipo localizada a células Hep-2 (Nataro *et alii*, 1985; Scaletsky *et alii*, 1984): (026)[4], 055, 086, 0111, 0119, 0125, 0126, 0127, 0128ab e 0142[5]. 2) Classe 2: agrupa os sorogrupos menos importantes, raramente apresentam EAF^+ e apresentam aderência negativa ou do tipo difusa a células Hep-2: 018, 044, 0112, 0114.

A subdivisão das EPEC quanto à característica de adesão a células Hep-2 foi proposta por Cravioto *et alii* (1979), os quais demonstraram que aproximadamente 80% das amostras de EPEC da coleção do "Colindale Laboratory" (England) apresentaram adesão a células Hep-2 em cultura de tecido, o que é raramente observado em amostras dos outros grupos e amostras da flora normal. A propriedade de adesão foi posteriormente definida por Baldini *et alii* (1983) como sendo codificada por um plasmídio de aproximadamente 60 Mda, responsável pela expressão do "fator de adesão de EPEC", conhecido como EAF. Coube a Scaletsky *et alii* (1984) e Nataro *et alii* (1985) a diferenciação entre adesão

4 - Amostras do sorogrupo 026 foi posteriormente classificadas como EHEC.

5 - O sorogrupo 0142 foi definido como um sorogrupo importante de EPEC clássica apenas no início da década de 70.

localizada e difusa a células Hep-2 e HeLa e a associação da adesão localizada em Hep-2 à existência de um plasmídio de 60 MDa.

Uma controvérsia quanto à utilização de apenas sorogrupagem como metodologia de identificação de EPEC foi levantada por Smith *et alii* (1990) após o estudo de 449 amostras isoladas de pacientes com diarréia relacionadas a 13 sorogrupos O de EPEC. Estes autores demostraram que a grande maioria das amostras dos sorogrupos de EPEC não apresentam EAF ou produção de VT em ensaios de hibridização com sondas de DNA. Na hibridização com sonda para EAF apenas 36 amostras, pertencentes aos sorotipos clássicos de EPEC, foram positivas para EAF. Testes de hibridização com sonda para VT1 e VT2 revelaram a presença de 16 amostras $VT1^+$ ou $VT2^+$, todas EAF^-, das quais 15 pertenciam aos sorogrupos O26 e O128. Entretanto, a utilização de EAF como marcador para caracterização de EPEC parece não ser válida, pois estudos anteriores realizados por Knutton *et alii* (1987) demonstraram que apesar da eliminação da expressão de EAF (cura do plasmídio de 60 MDa), amostras de EPEC (O:127:H6) apresentavam a capacidade de adesão à mucosa intestinal e de destruição de microvilosidades.

O mecanismo de patogenicidade de EPEC começou a ser elucidado na década de 70, com os estudos histopatológicos de Polotsky *et alii* (1977) com sorogrupos clássicos de EPEC em alça ligada intestinal de coelho; seguidos de Ulshen & Rollo (1980), com uma amostra do

sorotipo clássico O125ac:H21 em biópsia intestinal de criança; e Rothbaun *et alii* (1982) em um surto de diarréia por EPEC do sorogrupo O119 em crianças.

Estes estudos revelaram a presença de microcolônias de *Escherichia coli* fortemente aderidas a células da extremidade das vilosidades intestinais com a destruição da células epiteliais. Nos estudos de microscopia eletrônica as amostras de EPEC produziam uma lesão característica, aderindo fortemente a células epiteliais com destruição da bordadura em escova, mas sem invasão das células ou do tecido. Freqüentemente eram obervadas bactérias sobre um "pedestal" de microvilosidades destruídas. Estudos mais recentes reproduziram tais lesões em porcos gnotobióticos, privados de colostro, infectados com EPEC de origem humana (Moon *et alii*, 1983).

O envolvimento do EAF na patogenicidade de EPEC foi avaliado em estudos com voluntários, que ingeriram uma amostra O127:H6 portadora de EAF ou a mesma amostra cuja expressão do EAF foi abolida (cura plasmidial). Nove em 10 voluntários tiveram diarréia no primeiro caso e apenas 2 em 10 apresentaram diarréia suave no segundo teste (Levine *et alii*, 1985), indicando que EAF parece conferir às amostras portadoras uma maior virulência, apesar das amostras com expressão de EAF abolida ainda apresentarem capacidade de adesão à mucosa intestinal e de destruição de microvilosidades (Knutton *et alii*, 1987).

Os mecanismos moleculares através dos quais EPEC causa diarréia ainda não se encontram claramente elucidados. Algumas amostras de EPEC apresentam a produção de uma toxina semelhante à toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1 (SLT-I), altamente potentes contra células Vero e HeLa em cultura (revisão em O'Brien & Holmes, 1987). A produção de outra classe de citotoxinas, SLT-II, também foi relatada em amostras de EPEC humanas (sorogrupo O128:B12) e isoladas de leitão (sorogrupo O138:K81) (O'Brien & Holmes, 1987). Sugere-se que a produção de citotoxinas possa ter um papel importante no processo de diarréia em alguns grupos de EPEC (Cleary *et alii*, 1985; Marques *et alii*, 1986; O'Brien & Holmes, 1987; O'Brien *et alli*, 1982).

Levine (1987) ressalta que em estudos anteriores de EPEC citotoxigênica, muitas das amostras classificadas como pertencentes aos sorogrupos e sorotipos de EPEC (Cleary *et alii*, 1985; Marques *et alii*, 1986) deveriam ter sido reclassificadas como enterohemorrágicas (EHEC), em especial as amostras do sorotipo O26:H11, consideradas como EHEC típicas.

Yano *et alii* (1988) isolaram amostras de origem não-humana de *E. coli* O125 enteropatogênicas de fezes diarréicas de bovino produtoras do fator de colonização EAF44 (hemaglutinação manose-resistente com eritrócitos humanos, tipo A^+), verotoxina, hemolisina e que apresentaram aderência difusa a células HeLa.

1.2.4. *Escherichia coli* Enterotoxigênicas (ETEC)

Este grupo se caracteriza pela produção de duas classes de toxinas bacterianas: toxinas termoestáveis (ST) e toxinas termolábeis (LT).

As toxinas termoestáveis de *E. coli* são heterogêneas, apresentando-se em duas classes: ST-I (ou STa) ST-II (ou STb) (Whipp *et alii*, 1981). ST-I é solúvel em metanol e detectável através do teste com camundongos recém-nascidos (Dean *et alii*, 1973). Sua ação baseia-se na estimulação da atividade da enzima guanilato ciclase presente e na conseqüente elevação dos níveis de GMPc no jejuno e íleo (Greenberg & Guerrant, 1980; Hughes *et alii*, 1978), resultando na secreção de líquido para a luz intestinal, promovendo diarréia. ST-I apresenta ainda variantes encontradas em amostras bacterianas isoladas de porcos (STp ou ST-Ia) e de humanos (STh ou ST-Ib), com pequenas alterações na seqüência de aminoácidos. ST-II é insolúvel em metanol e detectável através do teste em alças intestinais ligadas de leitão (Gyles, 1979), mas não no teste do camundongo recém-nascido (Dean *et alii*, 1973). ST-II parece não estar relacionada com patogenicidade em humanos (Echeverria *et alii*, 1984).

As toxinas termolábeis de *E. coli* também apresentam heterogeneidade, sendo possível determinar duas classes: LT-I e LT-II. A classe LT-I engloba as toxinas semelhantes à toxina colérica (CT), apresentando identidade

imunológica e neutralização pelo anti-soro anti-CT. Nesta classe encontram-se as toxinas LTh (ou LT humana) e LTp (ou LT porcina), que diferem em apenas um resíduo de aminoácido (Dykes *et alii*, 1985; Yamamoto *et alii*, 1987). O modo de ação de LT-I e LT-II é semelhante, e se dá através da ativação da adenilato-ciclase e do aumento do nível de AMPc, resultando na secreção de líquido para a luz intestinal, promovendo, também, diarréia (Chang *et alii*, 1987). LT-II é imunologicamente distinta de LT-I, não sendo neutralizada pelo anti-soro anti-LT-I ou anti-CT (Green *et alii*, 1983). Dois variantes antigênicos com características bioquímicas e de toxicidade diferentes, LT-IIa e LT-IIb, podem ser diferenciados através da ativação da toxicidade por tratamento com tripsina.

A ação de LT-I e LT-II pode ser avaliada através da indução de alterações morfológicas no teste com células adrenais Y-1 e do aumento da permeabilidade vascular da pele quando injetadas na epiderme de coelho. LT-I apresenta ainda atividade secretória no ensaio de alças ileais ligadas em coelho, ao contrário de LT-II (Holmes, 1986). A importância clínica de LT-II em diarréia humana parece não ser significante (Echeverria *et alii*, 1984).

A ocorrência de amostras enterotoxigênicas relacionadas a diarréia é elevada, sendo estas infecções diarréicas mais freqüentes em países em desenvolvimento, onde as condições de higiene permitem a disseminação de ETEC através de alimentos e da água. As infecções por ETEC são

endêmicas e sazonais, sendo mais comuns nos períodos quentes, quando a proliferação bacteriana em alimentos é facilitada. Nas regiões endêmicas, a contaminação afeta principalmente crianças de até 2 anos, onde o veículo de transmissão mais comum é alimento contaminado (Levine, 1984). Viajantes são também um grupo freqüentemente sujeito a infecções por ETEC, principalmente em visita a países em desenvolvimento (Levine, 1984).

Em animais as infecções devido a ETEC afetam principalmente recém-nascidos e animais jovens em rebanhos de gado, suínos ou carneiros. A freqüência deste grupo entre amostras isoladas de casos de diarréia é alta, como observado por Castro *et alii* (1984) em suínos com diarréia aguda, nos quais aproximadamente 30% das amostras de *E. coli* isoladas eram ETEC (1.67% LT; 18.02% STa e 12.53% STb).

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

As fímbrias comumente associadas a ETEC de origem humana subdividem-se nos tipos principais: CFA/I, CFA/II, CFA/III, 8775 (ou CFA/IV) e PCFO159:H4.[6]

6 - PCF significa "putative colonization factor", ou seja, um novo fator de colonização proposto, porém ainda não oficializado.

CFA/I foi a primeira a ser descrita (Evans *et alii*, 1975, 1978) nos sorogrupos de ETEC O15, O25, O63, O78, O128, O153, apresentando hemaglutinação manose-resistente com eritrócitos humano, bovino e de galinha (Christensen *et alii*, 1985).

Evans & Evans (1978) posteriormente descreveram o tipo CFA/II, a qual apresentava hemaglutinação manose-resistente apenas com eritrócitos de galinha e de boi (Christensen *et alii*, 1985). A complexidade estrutural de CFA/II é grande, apresentando três antígenos diferentes, os quais se expressam de acordo com o sorotipo e biotipo da bactéria hospedeira (Cravioto *et alii*, 1982; Smith, 1982). Os determinantes antigênios foram denominados CS1 (16,3 KDa), CS2 (15,3 KDa) e CS3 (14,7 KDa). A expressão de CFA/II é heterogênea e pode se dar através da expressão de CS1 ou CS2 em combinação ou não com CS3, formando os fenótipos CS1/CS3, CS2/CS3 ou apenas CS3.

CS3 é um antígeno não-fimbrial, fibrilar, com 2-3 nm em diâmetro em microscopia eletrônica, comum a praticamente todas as amostras CFA/II$^+$. CS1 e CS2 são antígenos fimbriais rígidos, com 6-7 nm de diâmetro, semelhantes a CFA/I. CS1 ocorre nos sorogrupos O6 e O139, CS2 no sorogrupo O6 e CS3 nos sorogrupos O6, O8, O80, O85 e O139.

A fímbria 8775 (CFA/IV) (Thomas *et alii*, 1982) apresenta hemaglutinação manose-resistente com eritrócitos bovinos, apresentando também um sistema de antígenos

semelhantes aos de CFA/II (Thomas *et alii*, 1985; McConnell *et alii*, 1986), com os antígenos CS4, CS5 e CS6. CS4 e CS5 compreendem estruturas fimbriais rígidas com 6-7 nm de diâmetro e CS6 é não-fimbrial, porém fibrilar como CS3. Estes antígenos apresentam ocorrência independente em vários sorogrupos de ETEC: CS4 no sorogrupo O25, CS5 nos sorogrupos O92 e O115; e CS6 nos sorogrupos O25, O27, O92, O115, O148 e O169.

Honda *et alii* (1984) descreveram um fator de colonização em uma amostra de *E. coli* do sorogrupo O25:H$^-$, que era sorologicamente distinta de CFA/I e CFA/II, sendo denominada CFA/III. A amostra original empregada na caracterização de CFA/III apresentava também a expressão de CS6 (McConell *et alii*, 1986).

O antígeno putativo PCFO159 é não-hemaglutinante e apresenta subunidades de 19.000 Da. Foi descoberto comparando-se extrações de proteína de superfície de uma amostra O159:H4, isolada de um caso clínico de paciente com diarréia, crescida a 37° C e a 18° C, em géis de poliacrilamida-SDS (Tacket *et alii*, 1987 *apud* Levine, 1987). A expressão de PCFO159 foi associada a um plasmídio de 27 MDa ligada à codificação de ST e LT, sendo posteriomente demonstrado em diversas outras amostras de *E. coli* do mesmo sorotipo.

Os antígenos de origem animal associados a ETEC compreendem várias fímbrias com características hemaglutinantes: K88, K99, F41 e tipo I; e uma fímbria não-

hemaglutinante: 987P. Uma revisão sobre o assunto pode ser encontradas em Gaastra & De Graaf (1982).

K88 ocorre em amostras de origem suína, apresentando hemaglutinação manose-resistente com eritrócitos de cobaia e galinha e regulação temperatura-dependente. Caracteriza-se por filamentos com 2,1 nm de diâmetro, subunidades protéicas com 27.540 Da e ponto isoelétrico em pH 4,2 (Gaastra & De Graaf, 1982). A codificação é plasmidial (Strim *et alii*, 1966) e a fímbria pode apresentar variantes denominados K88ab, K88ac e K88ad, com o antígeno comum K88a. Estes variantes divergem imunologicamente e apresentam propriedades adesivas ligeiramente alteradas. A seleção para os variantes de K88 parece estar relacionada à heterogeneidade do receptor específico da fímbria na população suína. Certos indivíduos na populações possuem "resistência" à colonização por um determinado tipo de K88, através de alterações do sítio receptor para a fímbria. As variantes de K88 ab, ac e ad podem representar uma seleção de fenótipos $K88^+$ heterogêneos frente aos diferentes fenótipos de receptor dos animais em populações suínas (Hinson & Williams, 1989).

Em amostras de origem suína, a ocorrência de $K88^+$ pode estar associada com maior freqüência à produção de LT que à produção de LT^+/ST^+ ou de STa e STb isoladamente (Castro *et alii*, 1984, Guineé & Jansen, 1979). Uma exceção deve ser feita em relação ao sorogrupo O149, no estudo de Franklin *et alli* (1981, em que a maioria das amostras

analisadas apresentaram coexistência estável dos plasmídios K88/Raf, ST e LT.

K99 é um antígeno encontrado em amostras de *E. coli* isoladas de bovinos, carneiros e suínos. Apresenta hemaglutinação manose-resistente com eritrócitos de cavalo e carneiro e regulação temperatura-dependente. A estrutura da fímbria é um filamento helicoidal, com 4,8 nm de diâmetro, composto por subunidades de 18.500 Da, com ponto isoelétrico em pH 9,75 (Gaastra & De Graaf, 1982). A codificação é plasmidial e o nível de expressão parece estar associado ao fenótipo do hospedeiro (Embden *et alii*, 1980).

Em amostras de origem suína, K99+ pode estar associado a STa, porém não se encontrou uma associação com a produção de LT (Castro *et alii*, 1984). Em amostras de origem bovina, a ocorrência de STa está sempre relacionada à presença de K99 (Guinée & Jansen, 1979).

F41, um antígeno fimbrial encontrado em amostras de *Escherichia coli* de origem suína e bovina, apresenta hemaglutinação manose-resistente com eritrócitos humano, de cobaia, cavalo e carneiro. A estrutura é filamentar, com diâmetro de 3,2 nm, composta por subunidades proteicas de 29.500 Da e com ponto isoelétrico em pH 4,6 (De Graaf & Roorda, 1982). F41 encontra-se associada freqüentemente a produção de K99. A codificação genética para a produção da fímbria é cromossômica e apresenta regulação temperatura-dependente (Anderson & Moseley, 1988; Christensen *et alii*, 1985; Gaastra & De Graaf , 1982). Os sorogrupos envolvidos

são O9 e O101, os mesmos associados à produção de K99 (Anderson & Moseley, 1988).

O envolvimento de fímbrias tipo I como fator de patogenicidade em amostras enteropatogênicas é controverso, sendo descrito por Jayappa *et alii* (1985) em suínos, porém não confirmado em trabalhos posteriores (A. F. Pestana de Castro, comunicação Pessoal, 1990).

O antígeno 987P, na sua forma nativa, não é hemaglutinante com eritrócitos de cavalo, cobaia, coelho, carneiro, porco ou bovino, mas pode apresentar reação de hemaglutinação quando tratado com glutaraldeído (D. S. Leite, comunicação pessoal, 1990). Apresenta-se como uma fímbria rígida, com diâmetro de 7 nm, constituída por subunidades com aproximadamente 20.000 Da e ponto isoelétrico em pH 3,7 (Gaastra & De Graaf, 1982). A codificação de 987P é cromossômica e sua regulação genética acontece por variação de fase, semelhante à regulação das fímbrias tipo I (De Graaf & Klaasen, 1986). A ocorrência de 987P está relacionada a amostras de *E. coli* de origem suína, sempre associada à produção de ST (Guinée & Jansen, 1979; Moon *et alii*, 1980).

Em relação aos sorotipos e sorogrupos associados a ETEC em amostras de origem animal, Castro *et alii* (1984) relatou, para amostras de origem suína, a ocorrência dos sorogrupos O10, O35, e O108, além dos sorogrupos O8, O9, O64, O108, O138, O139, O141, O147, O149 e O157, normalmente associados a amostras STa^+ (Gyles, 1979; Moon *et alii*,

1980). As amostras STb+ encontradas pertenciam aos sorogrupos O9, O10, O35, O139, O149 e O157 e as amostras LT+ (geralmente STb+) ao sorogrupo O149. Guineé & Jansen (1979) associaram ainda a produção de LT com amostras do sorogrupo O8. Em amostras de origem bovina, STa encontra-se sempre associado a K99, distribuindo-se nos sorogrupos O8:K25, O8:K85, O9:K30, O9:K35, O9:K(A), O20:K?, O101:K18, O101:K30 e O101:K(A) (Guinée & Jansen, 1979). O mesmo é encontrado para amostras 987P em suínos, onde a ocorrência do antígeno 987P está associada à presença de ST, distribuindo-se nos sorogrupos O9, O20 e O141 (Gaastra & De Graaf, 1982).

1.2.5. *Escherichia coli* Enteroinvasivas (EIEC)

Escherichia coli enteroinvasivas apresentam capacidade de invasão das células do cólon e de produção de diarréia e disenteria, semelhante à promovida por *Shigella* (DuPont *et alii*, 1971; Formal & Hornick, 1978; Wanger *et alii*, 1988). A capacidade de invasão de EIEC foi associada à presença de um plasmídio de alto peso molecular (aprox. 140 MDa), que codifica várias proteínas de membrana externa relacionadas a este processo (Hale *et alii*, 1983).

A identificação de EIEC pode ser feita através da sorotipagem das amostras envolvidas em diarréia (Toledo & Trabulsi, 1983), através do teste de invasibilidade em olho de cobaia, conhecido como "teste de Serény" (Serény, 1955; Toledo & Trabulsi, 1983), ou através da utilização de sondas

moleculares contruídas a partir do plasmídio de virulência de *Shigella flexneri* (Wanger *et alii*, 1988).

O mecanismo de patogenicidade destas amostras é semelhante ao apresentado por *Shigella*, que envolve a invasão das células epiteliais do cólon e morte celular, ocasionando febre, cólicas abdominais e diarréia aquosa seguida de disenteria com produção de muco, sangue e leucócitos (DuPont *et alii*, 1971; Levine, 1987).

Os sorogrupos associados a EIEC em alguns trabalhos epidemiológicos são: O28a,c:K73, O124:K72, O143:K?, O144:K?, (DuPont *et alii*, 1971; Silva *et alii*, 1980; Toledo & Trabulsi, 1983; Wranger *et alii*, 1988), entre outros.

1.2.6. *Escherichia coli* Enterohemorrágicas (EHEC)

Escherichia coli enterohemorrágica apresenta um quadro clínico semelhante a EIEC, porém caracterizado pela ocorrência de diarréia afebril intensa, sanguinolenta, mas sem leucócitos, ao contrário de diarréia causada por EIEC (Levine, 1987). Outra entidade clínica ocasionada por EHEC é a síndrome urêmica hemolítica (HUS).

Amostras de *E. coli* tipicamente associadas a esta categoria pertencem aos sorotipos O157:H7 e O26:H11 (Levine, 1987; Riley *et alii*, 1982). Estas amostras apresentam a produção de citotoxinas codificadas por fagos, ativas em células HeLa e Vero (Levine, 1987) e não produzem toxinas ST

ou LT. Outros sorotipos também foram relacionados a EHEC, isolados de pacientes com síndromes clínicas compatíveis: O157:NM, O111:H8, O111:NM, O4:NM, O5:NM, O45:H2, O91:H21, O91:NM, O103:H2, O113:H2, O121:H19, O125:NM, O145:NM, O[]:H8 e O[]:NM (Boop *et alii*, 1987; Karmali *et alii*, 1985; Levine *et alii*, 1987; Smith *et alii*, 1987).

Das citotoxinas de EHEC, a Verotoxina 1 (VT1 ou SLT-I) apresenta grande semelhança à toxina de *Shigella*, podendo ser inativada pelo mesmo antissoro (O'Brien & Holmes, 1987). Outra classe de citotoxinas de EHEC, Verotoxina 2, denominada VT2 (Scotland *et alii*, 1985) ou SLT-II (Strockbine *et alii*, 1986), não é neutralizada por anticorpos anti-toxina de *Shigella* e apresentam atividade contra células Vero e HeLa. Outra variante de Verotoxina, semelhante a SLT-II, ativa em células Vero mas não em HeLa (O'Brien & Holmes, 1987), foi isolada de amostras de *E. coli* associadas à doença do edema em porcos (Marques *et alii*, 1987). As toxinas SLT agem através da interferência na síntese protéica pela inativação da subunidade ribossômica 60S (O'Brien & Holmes, 1987).

Outra característica de amostras EHEC é a presença de um plasmídio de 60 MDa na maioria das amostras, associado com a codificação de uma fímbria não-hemaglutinante, capaz de promover adesão a células Henle 407 mas não a células Hep-2. A construção de uma sonda de DNA a partir deste plasmídio apresentou 99,8% de especificidade na detecção de EHEC (Levine *et alii*, 1987).

O mecanismo de patogenicidade de EHEC é semelhante ao de EPEC, com a adesão a células epiteliais do intestino e destruição das microvilosidades, acarretando morte celular e diarréia. Em experimentos com leitões gnotobióticos a adesão de EHEC é restrita ao ceco e cólon, enquanto EPEC adere em toda a extensão do intestino (Levine, 1987).

Amostras de *Escherichia coli* de origem não-humana produtoras de verotoxina (VTEC) têm sido isoladas (Mohammad *et alli*, 1985; Yano *et alii*, 1988). A produção de VT em algumas destas amostras pode ou não estar associada à produção das toxinas LT e ST (Mohammad *et alli*, 1985). A terminologia EHEC, contudo, não tem sido empregada para a designação destas amostras, que são geralmente classificadas como *Escherichia coli* verotoxigênicas (VETEC), de acordo com o sorogrupo a que pertencem (Yano *et alii*, 1988).

1.2.7. *Escherichia coli* Enteroaderentes (EAEC) e *Escherichia coli* Enteroaderente-Agregativas (EA-AggEC)

O grupo de *Escherichia coli* enteroaderente compreende amostras de origem humana, EAF-negativas, de sorogrupos não clássicos, identificadas apenas pela característica de adesão a células Hep-2, conforme descrito por Mathewson *et alii* (1985) e Mathewson *et alii* (1986). Estas amostras estão associadas a diarréia não-hemorrágica e sem leucócitos fecais.

EAEC apresenta um padrão de adesão a células Hep-2 do tipo agregativo, distinto da adesão localizada e difusa de EPEC, não produzem toxinas do tipo LT, ST ou SLT, e não invadem células epiteliais intestinais (Levine, 1987).

A aceitação do grupo das EAEC é controversa, pois estudos posteriores aos de Mathewson e colaboradores (referências em Vial *et alii*, 1988) encontraram resultados conflitantes. A metodologia de adesão a células Hep-2 utilizada nos ensaios de Mathewson e colaboradores difere do protocolo experimental determinado por Cravioto *et alii* (1979) para diferenciação dos tipos de adesão difusa e localizada. Mathewson e colaboradores utilizaram a incubação por 1 hora das amostras com as células em cultura, seguida de lavagem e incubação por mais 2 horas, enquanto o protocolo original de Cravioto *et alii* (1979) recomenda uma incubação contínua por 3 horas. Vial *et alii* (1988) sugerem que esta é uma falha metodológica do trabalho de Mathewson e colaboradores e propõem uma reclassificação das amostras do grupo definido por aqueles autores.

A proposta de Vial *et alii* (1988) denomina o grupo como *Escherichia coli* enteroaderente-agregativa (EA-AggEC). As amostras deste grupo apresentam um padrão de adesão a células Hep-2 típico, com a formação de agregados de bactérias aderidas a porções das células em cultura e ao vidro do substrato. Os sorogrupos O envolvidos eram na sua maioria não tipáveis ou tipo rugoso, e os antígenos H encontrados foram H2, H10, H33 e H:NM.

Quadro 3. Principais fímbrias de *Escherichia coli* associadas a processos de patogenicidade (compilado de várias fontes).

Fímbria	Hospedeiro	Grupo de *E. coli*	Hemaglutinação com Eritrócitos						Expressão Fenotípica	Codificação Genética	MW (Da) Subunidade	pI	Forma e Diâmetro
			Hum	Boi	Car	Cav	Cob	Gal					
K88	suíno	ETEC	-	-	-	-	R	R	temperatura dependente	plasmidial	27,540 homopol.	4,2	filamento 2,1 nm
K99	bovino suíno carneiro	ETEC ETEC ETEC	-	-	R	R	-	-	temperatura dependente	plasmidial	18,500 homopol.	9,7	filamento helicoidal 4,8 nm
F41	suíno bovino	ETEC ETEC	R	-	R	R	R	-	temperatura dependente	plasmidial/ cromossômica	29,500 homopol.	4,6	filamento 3,2 nm
F42	bovino	ETEC	R	-	R	R	R	R	temperatura dependente	plasmidial	30,000	3,2	rígida -
987P	suíno	ETEC	-	-	-	-	-	-	variação de fase	cromossômica	20,000	3,7	tubular 7,0 nm
Tipo I	humano suíno	UP,EP,ETEC ETEC	S	-	S	S	S	-	variação de fase	cromossômica	17,100 (28, 16.5, 14.5 K)	-	tubular 7,0 nm
CFA/I	humano	ETEC	R	R	-	-	-	R	variação de fase	plasmidial	15,058 homopol.	4,8	filamento 3,2 nm
CFA/II (CS1, CS2 e CS3)	humano	ETEC	-	R	-	-	-	R	temperatura dependente	plasmidial	CS1 16,300 CS2 15,300 CS3 14,700		filamento 6-7 nm filamento 6-7 nm fibrilar 2-3 nm
8775 (CFA/IV) (CS4, CS5 e CS6)	humano	ETEC	R	R	-	-	"R" (CS5)	-	temperatura dependente	plasmidial	CS4 - CS5 - CS6 -		filamento 7 nm filamento 7 nm não-fimbrial
PCFO159	humano	ETEC	-	-	-	-	-	-	temperatura dependente	plasmidial	19,000	-	- -
P (pap) (prs)	humano	UPEC	R	-	-	-	-	-	temperatura dependente	cromossômica	17 - 22 K heteropol.	-	tubular 5-7 nm
EAF44	bovino	EPEC (VTEC)	R	-	-	-	-	-	temperatura dependente	plasmidial	- ?	-	filamento -
CS31a	bovino	?	-	-	-	-	-	-	temperatura dependente	plasmidial (cromossômica?)	29,000 homopol.	-	filamento 6-7 nm
FY	bovino	?	-	R	-	-	-	-	temperatura dependente	cromossômica (plasmidial?)	20,000 ?	-	filamento 4,2 nm
31A	bovino	?	-	R	-	-	-	-	temperatura dependente	cromossômica (plasmidial?)	19,000 ?	-	filamento -

Eritrócitos: Hum = humano tipo A; Boi = bovino; Car = carneiro; Cav = cavalo; Cob = cobaia; Gal = galinha

S = hemaglutinação manose-sensível; R = hemaglutinação manose-resistente; MW = peso molecular em Daltons

homopol. = homopolimérica; heteropol. = heteropolimérica; pI = ponto isoelétrico

1.4. *Escherichia coli* Patogênicas para Bovinos

Em bovinos, *Escherichia coli* pode atuar como patógeno associado a diarréia neonatal, diarréia hemorrágica, septicemia e mastite (Erskine *et alii*, 1989; Janke *et alii*, 1990; Lohuis *et alii*, 1989; Morris *et alii*, 1987; Pearson *et alii*, 1989; Reynolds *et alii*, 1986; Schukken *et alii*, 1989; Shimizu *et alii*, 1987; Snodgrass *et alii*, 1986).

Os fatores de patogenicidade envolvidos em alguns destes casos estão associados a amostras de *E. coli* enterotoxigênicas produtoras de STI (Lintermans *et alii*, 1988; Shimizu *et alii*, 1987; Mouricout *et alii*, 1990); a amostras tipo AEEC[7] ("attatching-effacing *E. coli*") SLT- (Pearson *et alii*, 1989); e a amostras enteropatogênicas tipo AEEC produtoras de SLT (Moxley & Francis, 1986) e de SLT-I e SLT-II (Wray *et alii*, 1989).

A ocorrência de septicemia ainda é um processo de patogenicidade não claramente elucidado, porém, alguns passos iniciais fora definidos, como a adesão ao epitélio (Lintermans *et alii*, 1988), produção de colicina V associada a produção de sideróforo e presença de plasmídio *vir* (A. F. Pestana de Castro, comunicação pessoal, 1990).

Lintermans *et alii* (1988) descrevem a presença de uma fímbria, denominada F17, com características de adesão a vilosidades intestinais de bovinos isolada de uma amostra de

7 - Terminologia que designa amostras de *Escherichia coli* com a propriedade de adesão e destruição de microvilosidades de enterócitos.

Escherichia coli enterotoxigênica (ST^+) associada a diarréia e septicemia. A fímbria F17 apresentou peso molecular de 20,000 Da, hemaglutinação negativa com eritrócitos de boi, ovelha, cobaia, humano e galinha. Na análise com antissoros específicos esta foi sorologicamente distinta de K88, K99, F41 e 987P e apresentou homologia com FY.

Outros tipos de fímbrias comumente encontradas em amostras de *E. coli* isoladas de casos de diarréia em bovinos são K99 e F41. Outras fímbrias, como a FY e 31A, também ocorrem em frequência relativamente alta em alguns estudos epidemiológicos recentes (Leite *et alii*, 1989; Shimizu *et alii*, 1987).

Amostras de *E. coli* associadas a diarréia e septicemia portadoras de fímbrias tipo FY e 31A foram isoladas na França por Girardeau *et alii* (1980), na Bélgica por Pohl *et alii* (1984), na Inglaterra por Morris *et alii* (1985, 1987), no Japão por Shimizu *et alii* (1987) e no Brasil por Leite *et alii* (1990).

As amostras bacterianas portadoras de FY e 31A não apresentaram a produção de toxinas, com excessão de uma amostra FY^+ isolada por Morris *et alii* (1987), que apresentou a produção de STI associada a produção de F41.

Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos de patogenicidade destas amostras bacterianas e do papel das fímbrias FY e 31A como fatores de patogenicidade nestas amostras.

Shimizu *et alii* (1987) estudaram a infecção experimental em bezerros pela amostra BZ2468 (31A$^+$), verificando que esta é septicêmica e letal quando associada a infecções simultâneas com uma outra amostra de *E. coli* enterotoxigênica (STI). Uma outra amostra FY$^+$ estudada pelos autores apresentou uma resposta semelhante, sendo isolada de diversos órgãos do animal infectado quando inoculada simultaneamente com a amostra STI$^+$.

Frente à falta de informações relativas à patogenicidade e mecanismos de patogenicidade das amostras de *Escherichia coli* de origem bovina portadoras das fímbrias FY e 31A, decidimos realizar um estudo para determinar a localização da expressão genética das fímbrias 31A e FY de amostras isoladas de diarréia e septicemia, visando, a médio prazo, a clonagem dos genes envolvidos no processo de patogenicidade destas amostras. A análise das propriedades associadas a estas fímbrias, como padrão de hemaglutinação, adesão específica a células em cultura de tecido e a epitélio intestinal de bovinos também foram estudadas, no sentido de permitir uma melhor caracterização das mesmas. O enfoque adotado foi a eliminação da expressão destas fímbrias através da utilização de mutagênese dirigida para proteínas de exportação, com o emprego do transposon TnphoA, e a caracterização eletroforética das subunidades proteicas associadas à expressão das fímbrias FY e 31A.

2. Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo a análise genética da expressão dos fatores de colonização FY e 31A, presentes em amostras de *Escherichia coli* associadas a diarréia e septicemia em bovinos, visando, principalmente:

1. Determinar a presença de outras características que podem estar associadas ao processo de patogenicidade, tais como: resistência múltipla a antibióticos; produção de toxinas termoestável (ST), termolábil (LT) e verotoxina (VT); produção de hemolisina; presença de outras fímbrias; habilidade de adesão a células animais (HeLa) em cultura de tecidos; e patogenicidade em outros modelos animais.
2. Caracterizar eletroforeticamente as sub-unidades proteicas das fímbrias FY e 31A presentes nas amostras de *Escherichia coli* estudadas.
3. Determinar a natureza genética da expressão das fímbrias FY e 31A, relacionando a sua ocorrência a plasmídios ou ao cromossomo bacteriano.
4. Eliminar a expressão destes fatores de colonização e avaliar o comportamento das amostras mutantes frente às características de hemaglutinação, adesão a células em cultura de tecidos e patogenicidade em modelo animal.

3. Material

3.1. Amostras Bacterianas

As amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes bovinas diarréicas e não-diarréicas, e as amostras bacterianas de referência e plasmídios utilizados nos experimentos de caracterização fenotípica e genética (Tabelas 3.1, 3.2a e 3.2b), foram cedidas pela coleção de Culturas do Departamento de Microbiologia e Imunologia (DMI) do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

Tabela 3.1. Amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes bovinas diarréicas e não-diarréicas.

Amostras	Fenótipo	Origem (coleção e/ou referência)
Att25 (25 KH9)	FY$^+$ (padrão)	C. Wray, Inglaterra.[8] Morris *et alii* (1985)
54-5	FY$^+$	DMI, Unicamp. Leite *et alii* (1989)
2147-4	FY$^+$	DMI, Unicamp. Leite *et alii* (1989)
11a	FY$^+$, O101:K32 K99$^+$,F41$^+$,STI	M. Conterpois, França.[9] Morris *et alii* (1985)
31A	31A$^+$ (padrão) O153:K$^-$:H$^-$	M. Conterpois, França. Girardeau *et alii* (1988)
BZ43	31A$^+$	M. Shimizu, Japão.[10] Shimizu *et alii* (1987)
BZ2468	31A$^+$	M. Shimizu, Japão. Shimizu *et alii* (1987)
11aSm	Sm^r,31A$^+$	mutante derivada da amostra 11a
BZ43Sm	Sm^r,31A$^+$	mutante derivada da amostra BZ43
BZ43xp4	Sm^r,Km^r,31A$^-$, phoA$^+$, não-fimbriada	mutante hemaglutinação-negativa derivada da amostra BZ43
BZ43xp6	Sm^r,Km^r,31A$^-$, phoA$^+$,fimbriada	mutante hemaglutinação-negativa derivada da amostra BZ43

8 - Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey KT15 3NB, England.

9 - Laboratoire de Microbiologie, Institut National de la Recherche Angronomique/Centre de Recherche de Clermont-Ferrand-Theix, 63122 Ceyrat, France.

10 - Bacteriology and Parasitology Section, Zen-noh Institute of Animal Health, Sakura, Chiba 285, Japan.

Tabela 3.2a. Amostras de *Escherichia coli* utilizadas nos experimentos de caracterização fenotípica e genética.

Amostras	Fenótipo	Origem (coleção e/ou referência)
E. coli MS101	tipo I^+,Nal^r,lac^-	DMI - IB, UNICAMP.[11]
E. coli B41	$K99^+$,$F41^+$,STI,O101:K^-	M. Conterpois, França.[12] Girardeau *et alii* (1988)
E. coli B41M	$F41^+$,O101:K^-, derivada da B41	M. Conterpois, França. Girardeau *et alii* (1988)
E. coli SM10 lambda *pir*	hospedeira do plasmídio pRT733, thi,thr,leu,tonA,lacY,supE, recA::RP4-2Tc::Mu::,Tra, portadora do bacteriófago lambda *pir*	Simon *et alii* (1983) Taylor *et alii* (1989)
E. coli J53	F^-,pro,met, hospedeira de plasmídios referência de peso molecular	DMI - IB, UNICAMP.
E. coli J53-1	Nal,F^-,pro,met, hospedeira de plasmídios referência de peso molecular	DMI - IB, UNICAMP.
E. coli HB101	hsd520(r^-_B, m^-_B),recA13,ara-14, proA2,leu,lacY1,Sm^r,galK2, rpsL20(Sm^r),xyL-5,mtl-1,supE44, hospedeira de plasmídios referência de peso molecular	Boyer & Roulland-Dussoix (1969) Bolivar & Backman (1979)
E. coli 711F^-	lac^+, hospedeira de plasmídios referência de peso molecular	DMI - IB, UNICAMP.
E. coli V517	8 plasmídios referência de peso molecular (1.36 a 35.8 Md)	Plasmid, 1: 417 (1978)

11 - Dr. Wanderley Dias da Silveira, DMI - IB, UNICAMP, 13081 Campinas, SP.

12 - Laboratoire de Microbiologie, Institut National de la Recherche Angronomique/Centre de Recherche de Clermont-Ferrand-Theix, 63122 Ceyrat, France.

Tabela 3.2a. Continuação.

Amostras	Fenótipo	Origem (coleção e/ou referência)
E. coli H10.407	LTh$^+$,ST$^+$, amostra padrão	Serafim et alii (1979)[13]
E. coli 40T	LTh$^+$,ST$^+$, amostra padrão	Serafim et alii (1979)[14]
E. coli H3	STI$^+$, amostra padrão	Serafim et alii (1977)
E. coli H30	SLT$^+$, amostra padrão	DMI - IB, UNICAMP.
E. coli J2	SLT$^+$, amostra padrão	DMI - IB, UNICAMP.
E. coli C600	F$^-$,phe,his,pro,trp,lacY,Nal^r, amostra padrão de aderência negativa em células HeLa	Appleyard (1954) Young & Davis (1983)
E. coli 362	Amostra padrão de aderência localizada em células HeLa	F. Fantinatti, UNICAMP.[15]
E. coli 364	Amostra padrão de aderência difusa em células HeLa	F. Fantinatti, UNICAMP.

13 - Dra. M. B. Serafim, DMI - IB, UNICAMP, 13081 Campinas, SP.
14 - L. C. Ricci, DMI - IB, UNICAMP, 13081 Campinas, SP.
15 - Fabiana Fantinatti, DMI - IB, UNICAMP, 13081 Campinas, SP.

Tabela 3.2b. Plasmídios utilizados nos experimentos de caracterização fenotípica e genética.

Plasmídio	Hospedeira	M.W.	Fenótipo	Origem (coleção e/ou referência)
pR40a	*E. coli* J53-1	96 MDa	Ap Km Su, Inc C	DMI - IB, UNICAMP.
pRA1	*E. coli* J53	86 MDa	Tc Su, Inc A	"
pR1	*E. coli* J53	62 MDa	Ap Sm Cm Km Su, Inc F II	"
p307	*E. coli* 711F⁻	54 MDa		"
pRP4	*E. coli* J53-1	36 MDa	Ap Km Tc, Inc P	"
pSa	*E. coli* J53-1	23 MDa	Cm Km Sm Su, Inc W	"
pBR322	*E. coli* HB101	2,6 MDa	Ap Tc, elevado número de cópias	"
pRT733	*E. coli* SM10 lambda *pir*	-	Ap, Km, vetor suicida para a passagem do transposon TnphoA para bactérias Gram negativas	Taylor *et alii* (1989)

3.2. Meios de Cultura

Na formulação dos meios de cultura e soluções adicionais, utilizados para a manutenção, cultivo e ensaio das amostras bacterianas, foram empregados reagentes de grau P.A. e H_2O destilada ou deionizada (Mili-Q), conforme a necessidade.

3.2.1. Agar Glicose Tamponado (AG)

O meio AG foi empregado no crescimento das amostras para os testes de hemaglutinação. O preparo do meio seguiu a formulação de Jones & Rutter (1974).

a) Caldo Simples (vide item 3.2.5)

b) Solução Estoque de Glicose 20%

Glicose anidra ..... 20 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p. ..... 100 ml

A glicose anidra (REAGEN) foi dissolvida em 70 ml de H_2O Mili-Q esterilizada e o volume da solução foi completado para 100 ml em balão volumétrico. A solução foi esterilizada por filtração em membrana Millipore 0.22 *um* (Swinex, 0.47 mm) e armazenada a 4° C em frasco esterilizado.

c) Meio de AG

KH_2PO_4	0,45 g
Na_2HPO_4	0,81 g
Agar bacteriológico	8 g
Caldo Simples	1000 ml

Os sais (REAGEN) foram dissolvidos no Caldo Simples para o preparo do meio basal. O meio basal foi distribuído em erlenmeyers contendo Agar bacteriológico (Difco Lab.) na concentração adequada (8 g/l) e o meio base foi esterilizado em autoclave a 121° C por 20 min.

Ao meio de cultura frio foi adicionado glicose a partir da Solução Estoque de Glicose para uma concentração final de 0.1% no meio.

3.2.2. Agar Sangue (AS)

O meio AS foi empregado no ensaio das amostras bacterianas para a produção de hemolisina.

a) Sangue de Carneiro Desfibrinado

O sangue de carneiro foi colhido em condições de assepsia em recipiente de 500 ml esterilizado contendo pérolas de vidro, sob agitação constante, sendo a seguir deixado em repouso por 12-18 horas a 4° C.

b) Meio de AS Base

Agar bacteriológico ..... 20 g
H_2O destilada ..... 1000 ml

O meio basal foi preparado adicionando-se a H_2O destilada a erlenmeyers contendo Agar bacteriológico (Difco Lab.) na concentração adequada (20 g/l) e o meio foi esterilizado em autoclave a 121° C por 20 minutos.

O sangue desfibrinado foi adicionado ao meio AS base esterilizado resfriado a 60° C. O meio foi homogeneizado e o vertido em placas de Petri em seguida. As placas preparadas foram invertidas e incubadas a 37° C por 12-18 horas para teste de esterilidade.

3.2.3. BHI (*Brain-Heart Infusion Broth*)

O meio BHI (Difco Lab.) foi empregado para o crescimento das amostras bacterianas para extração de plasmídios e no preparo de pré-inóculos em geral.

O meio foi reconstituído dissolvendo-se 37 g do meio preparado em 1000 ml de H_2O destilada sob agitação suave. O meio preparado foi distribuído em tubos de ensaio ou erlenmeyers e esterilizado em autoclave a 121° C por 20 minutos.

3.2.4. BHIA (BHI Agar) (*Brain-Heart Infusion Agar*)

O meio BHI ágar (BHIA) foi empregado para crescimento das amostras bacterianas em placa, no preparo de placas mestra e de placas e tubos para estoques temporários.

BHI	37 g
Agar bacteriológico	15 g
H_2O destilada	1000 ml

O meio foi preparado dissolvendo-se 37 g do meio BHI (Difco Lab.) em 1000 ml de H_2O destilada sob agitação suave. O meio pronto foi dispensado em erlenmeyers contendo ágar bacteriológico (Difco Lab.) na concentração adequada (15 g/l); ou, no preparo de tubos, o ágar foi adicionado ao meio em um béquer e fundido em forno de microondas antes de ser distribuído nos tubos. O meio pronto distribuído foi esterilizado em autoclave a 121° C por 20 minutos.

3.2.5. Caldo Simples

O Caldo Simples foi utilizado como meio basal no preparo do meio Agar Glicose Tamponado (AG) (item 3.2.1) (Jones & Rutter, 1974) e do meio de Manutenção (item 3.2.12).

Extrato de carne ..... 1 g
Peptona ..... 10 g
NaCl ..... 5 g
H_2O destilada ..... 1000 ml

O meio foi preparado dissolvendo-se o extrato de carne (Biobrás), peptona (Difco Lab.) e NaCl (ECIBRA) em H_2O destilada sob agitação suave.

O meio preparado foi empregado na formulação do meio AG base conforme descrito no item 3.2.1.

3.2.6. CAYE (Casaminoacids-Yeast Extract)

O meio CAYE ("Casaminoacids-Yeast Extract") foi empregado no crescimento das amostras para os ensaios de verocitotoxina (VT) em culturas de células Vero e de toxina termoestável (STa) no teste do camundongo recém-nascido. O preparo do meio seguiu a formulação de Evans *et alli* (1973).

a) Solução de Sais de CAYE

$MgSO_4$ ..... 5 g
$FeCl_3$ ..... 0,5 g
H_2SO_4 1 mM q.s.p. ..... 100 ml

A Solução de Sais de CAYE preparada foi dissolvendo-se os sais (REAGEN) em 80 ml da solução de H_2SO_4 1 mM sob agitação constante. O volume foi completado para 100 ml em balão volumétrico e a solução foi esterilizada por filtração

em membrana Millipore 0.45 *um* (Swinex 47 mm) e armazenada a 4° C em frasco esterilizado.

b) Meio de CAYE Base

Extrato de levedura	6 g
Casaminoácidos	20 g
NaCl	2,5 g
K_2HPO_4	8,75 g
H_2O destilada	1000 ml
	pH final 8,2

O meio de CAYE basal foi preparado dissolvendo-se o extrato de levedura (Difco Lab.), casaminoácidos (Difco Lab.) e sais (ECIBRA) em H_2O destilada sob agitação suave. O pH foi ajustado com HCl 1N ou NaOH 5N para o pH final 8.2. O meio preparado foi distribuído em erlenmeyers (10 ml/erlenmeyer 125 ml) e esterilizado em autoclave a 121° C por 20 min.

Ao meio de cultura frio foi adicionado 1 ml da Solução de Sais de CAYE para cada 100 ml de meio preparado.

3.2.7. CFA (*Colonization Factor Agar*)

O meio CFA ("Colonization Factor Agar") foi empregado no crescimento das amostras para os testes de hemaglutinação e absorção de antissoros. O preparo do meio seguiu a formulação de Evans *et alli* (1980).

a) Solução de Sais A de CFA

$MgSO_4$. 7 H_2O ..... 0,05 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p. ..... 50 ml

A Solução de Sais A foi preparada dissolvendo-se o $MgSO_4$. 7 H_2O (REAGEN) em 40 ml de H_2O Mili-Q esterilizada sob agitação suave. O volume foi completado para 50 ml em balão volumétrico e a solução foi esterilizada em autoclave a 121° C por 20 min.

b) Solução de Sais B de CFA

$MnCl_2$. 4 H_2O ..... 0,39 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p. ..... 50 ml

A Solução de Sais B foi preparada dissolvendo-se o $MnCl_2$. 4 H_2O (REAGEN) em 40 ml de H_2O Mili-Q esterilizada sob agitação suave. O volume foi completado para 50 ml em balão volumétrico e a solução foi esterilizada em autoclave a 121° C por 20 min.

c) Meio CFA base

Extrato de levedura ..... 1,5 g
Casaminoácidos ..... 10 g
Agar bacteriológico ..... 20 g
H_2O destilada ..... 1000 ml
pH final 7,4

O meio CFA base foi preparado dissolvendo-se o extrato de levedura (Difco Lab.) e casaminoácidos (Difco Lab.) em 1000 ml de H_2O destilada. O pH ajustado com HCl 1 N ou NaOH 5 N para pH final 7,4. O meio foi distribuído em erlenmeyers contendo ágar na concentração adequada (20 g/l) e esterilizado em autoclave a 121° C por 20 min.

Ao meio de cultura esterilizado foi adicionado 1 ml das Soluções de Sais A e B de CFA para cada 100 ml de meio preparado.

3.2.8. Meio LB (*Luria-Bertani Medium*)

O meio LB ("Luria-Bertani Medium") foi utilizado como meio rico para o crescimento de amostras bacterianas em pré-inóculos e para crescimento em meio líquido na presença de antibióticos. O preparo do meio seguiu a formulação de Miller (1972).

Triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	10 g
H_2O destilada	1000 ml
	pH final 7,0

O meio LB foi preparado em dissolvendo-se a triptona (Difco Lab.), extrato de levedura (Difco Lab.) e NaCl (ECIBRA) em 900 ml de H_2O destilada sob agitação suave. O pH

foi ajustado com NaOH 5 N (aprox. 0,2 ml) e o volume foi completado para 1000 ml em proveta. O meio foi distribuído em erlenmeyers ou tubos de ensaio e esterilizado em autoclave a 121° C por 20 min. A adição de antibióticos foi feita ao meio esterilizado já frio.

3.2.9. Meio LA (*Luria-Bertani Agar*)

O meio LA foi utilizado como meio rico para o crescimento de amostras bacterianas em placa nas análises de conjugação e para o crescimento em placa na presença de antibióticos. O meio foi preparado segundo a formulação de Miller (1972).

Agar bacteriológico ..... 15 g
Meio LB pH 7.0 ..... 1000 ml

O meio LB pH 7.0 (item 3.2.8) foi distribuído em erlenmeyers contendo ágar na concentração adequada (15 g/l) e esterilizado em autoclave a 121° C por 20 min. A adição de antibióticos foi feita ao meio esterilizado e resfriado a 60° C antes do preparo das placas.

3.2.10. Meio LAXP (Luria-Bertani Agar + BCIP 40 *ug*/ml)

O meio LAXP (meio LA + BCIP 40 *ug*/ml) foi utilizado como meio de seleção de mutantes fosfatase-alcalina-positivos nos experimentos de mutagênese com transposon TnphoA. O preparo seguiu a formulação de Millan *et alii* (1989).

a) Solução de BCIP (4 mg/ml)

BCIP	4 mg
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p.	1 ml

A solução foi preparada em tubo Eppendorf (1,5 ml) esterilizado pouco antes de ser utilizada. O BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato, sal disódico, Sigma) foi dissolvido em 1 ml de H_2O Mili-Q esterilizada por agitação vigorosa em "vortex". A solução foi filtrada com seringa descartável em Millipore 0.22 *um* (Swinex 13 mm), sendo transferida para outro tubo Eppendorf esterilizado e mantida no escuro até o momento da adição ao meio LA. A solução de BCIP em água é instável e portanto não foi armazenada.

b) Meio LAXP Base

Solução de BCIP (4 mg/ml)	1 ml
Agar bacteriológico	15 g
Meio LB pH 7.5	1000 ml
	pH 7,5

O meio LB (item 3.2.8) foi preparado com pH 7.5, distribuído em erlenmeyers contendo ágar bacteriológico (Difco Lab.) na concentração adequada (15 g/l) e esterilizado em autoclave a 121° C por 20 min. A adição da solução de BCIP e antibióticos foi feita ao meio esterilizado e resfriado a 60° C antes do preparo das placas.

3.2.11. Agar MacConkey

O meio ágar MacConkey (Difco Lab.) foi empregado como meio seletivo no reisolamento das amostras bacterianas.

O meio MacConkey foi reconstituído dissolvendo-se 50 g do preparado em 1000 ml de H_2O destilada sob agitação suave. O meio foi distribuído em erlenmeyers e esterilizado em autoclave a 121° C por 20 minutos.

3.2.12. Meio de Manutenção

O meio de Manutenção foi empregado no preparo de estoques das amostras bacterianas para armazenamento de longa duração.

Gelatina Nutriente ..... 5 g
Agar bacteriológico ..... 5.8 g
Caldo Simples pH 7,4 ..... 1000 ml
pH 7,4

O pH do Caldo Simples (item 3.2.5) foi ajustado com HCl 1N ou NaOH 5N para o pH final 7,4. Dissolveu-se o ágar bacteriológico (Difco Lab.) e a gelatina nutriente ("Nutrient Gelatin" - Difco Lab.) e o meio foi derretido e distribuído em tubos de ensaio (120 x 13 mm, aprox. 8 ml/tubo). Os tubos foram esterilizados em autoclave a 121° C por 20 min e após a solidificação do meio foram fechados com rolhas de borracha e armazenados a 4° C até o momento de uso.

3.2.13. MINCA

O meio MINCA foi empregado no crescimento das amostras para os testes de hemaglutinação. O preparo do meio seguiu a formulação de Guinée *et alii* (1977), com modificações.

a) Solução de Sais de MINCA

$MgSO_4 . 7 H_2O$	1 g
$MnCl_2 . 4 H_2O$	0,1 g
$FeCl_3 . 6 H_2O$	0,013 g
$CaCl_2 . 2 H_2O$	0,04 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p.	100 ml

A Solução de Sais de MINCA foi preparada dissolvendo-se os sais (REAGEN) em 80 ml de H_2O Mili-Q esterilizada sob agitação suave. O volume foi completado para 100 ml em balão

volumétrico. A solução foi esterilizada por filtração em membrana Millipore 0.45 *um* (Swinex 47 mm) e armazenada a 4° C em frasco esterilizado.

b) Meio MINCA base

Extrato de levedura	1 g
Casaminoácidos	1 g
KH_2PO_4	1,36 g
Na_2HPO_4 . 2 H_2O	10,1 g
Agar bacteriológico	12 g
H_2O destilada	1000 ml

O meio MINCA base foi preparado dissolvendo-se o extrato de levedura (Difco Lab.), casaminoácidos (Difco Lab.) e sais (REAGEN) em 1000 ml de H_2O destilada sob agitação suave. O meio preparado foi distribuído em erlenmeyers com ágar (Difco Lab.) na concentração adequada (12 g/l) e esterilizado em autoclave a 121° C por 20 min.

Ao meio de cultura esterilizado foi adicionado 1 ml da Solução de Sais de MINCA para cada 1000 ml de meio.

3.2.14. Meio Mínimo (MM)

O MM foi empregado no crescimento das amostras bacterianas em placas de Petri nos testes de expressão de fímbria. O preparo seguiu a formulação de Davis & Minglioli (1950).

a) Solução Estoque MM-20X

a.1)

Citrato de sódio ..... 10 g
K_2HPO_4 ..... 140 g
KH_2PO_4 ..... 30 g
$(NH_4)_2SO_4$ ..... 20 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p. ..... 800 ml

a.2)

$MgSO_4$. 7 H_2O ..... 2 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p. ..... 200 ml

A Solução Estoque MM-20X foi preparada dissolvendo-se os sais (REAGEN) da formulação **a.1** em 600 ml de H_2O Mili-Q esterilizada sob agitação e o volume completado para 800 ml em balão volumétrico. O sal da formulação **a.2.** foi dissolvido em 100 ml de H_2O Mili-Q esterilizada sob agitação e o volume foi completado para 200 ml em balão volumétrico. As duas soluções foram esterilizada separadamente em autoclave a 121° C por 20 min. A solução **a.2** foi adicionada à solução **a.1**, homogeneizada e armazenada à temperatura ambiente.

b) Meio Mínimo Base

Solução Estoque MM-20X	50 ml
Agar bacteriológico	20 g
H_2O destilada q.s.p.	1000 ml
	pH final 7,0

A solução estoque MM-20X foi adicionada a 800 ml de H_2O destilada sob agitação e o pH do meio foi ajustado com NaOH 5 N ou HCl 1 N para o pH final 7,0. O meio preparado foi dispensado em erlenmeyers contendo ágar (Difco Lab.) na concentração adequada (20 g/l) e esterilizado em autoclave a 121° C por 20 min.

3.2.15. Meio NB (*Nutrient Broth*)

O meio NB ("Nutrient Broth") foi empregado no crescimento de pré-inóculo das amostras bacterianas para os testes de resistência a antibióticos em placas e na elaboração do meio NA. O meio foi preparado segundo a formulação original do fabricante (Difco Lab.).

Extrato de carne	3 g
Peptona	5 g
H_2O destilada	1000 ml
	pH final 6.8

O meio NB foi preparado dissolvendo-se o extrato de carne (Biobrás) e peptona (Difco) em 1000 ml de H_2O

destilada sob agitação suave. O pH foi ajustado com NaOH 5 N ou HCl 1 N para o pH final 6.8 e o meio foi dispensado em erlenmeyers ou tubos de ensaio e esterilizado em autoclave a 121° C por 20 minutos.

3.2.16. Meio NA (*Nutrient Agar*)

O meio NA ("Nutrient Agar") foi empregado na determinação dos níveis de resistência das amostras bacterianas a antibióticos em placas. O meio foi preparado segundo a formulação original do fabricante (Difco Lab.).

Meio NB ..... 1000 ml
Agar bacteriológico ..... 15 g

Ao meio NB (item 3.2.15) foi dispensado em erlenmeyers contendo ágar na concentração adequada (15 g/l) e esterilizado em autoclave a 121° C por 20 minutos. A adição de antibióticos foi feita ao meio esterilizado e resfriado a 60° C antes do preparo das placas.

3.2.17. TSB (*Tripticase Soy Broth*)

O meio TSB ("Tripticase Soy Broth") foi empregado para crescimento das amostras bacterianas para o teste de adesão a células HeLa, segundo determinado por Scaletsky *et alii* (1984).

O meio TSB (Difco Lab.) foi reconstituído dissolvendo-se 40 g em 1000 ml de H_2O destilada sob agitação suave. O meio preparado foi distribuído em tubos de ensaio ou erlenmeyers e esterilizado em autoclave a 121° C por 20 minutos.

3.2.18. Meio de Eagle (ME)

O meio de Eagle (ME) foi empregado para crescimento das células HeLa e Vero em cultura de tecido para os testes de detecção de verocitotoxina (Yano *et alii*, 1988) e de adesão a células HeLa (Scaletsky *et alii*, 1984).

O ME (Instituto Adolfo Lutz, SP) foi preparado de acordo com as especificações do fabricante. O pH do meio foi ajustado com uma solução de citrato de sódio a 10%, quando necessário, e o meio foi esterilizado por filtração em membrana Millipore 0,22 *um* e armazenado a 4° C.

Para as culturas celulares o meio de Eagle foi suplementado com soro fetal inativado de bovino (SFIB), livre de micoplasma (Instituto Adolfo Lutz, SP), em concentrações de 5% ou 10%, de acordo com o tipo celular cultivado.

3.3. Soluções-Estoque de Antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos utilizados foram de procedência Sigma, a seguir: ácido nalidíxico (sal sódico, cristalino); ampicilina (sal sódico, cristalino); cloranfenicol (cristalino); canamicina (sulfato ácido, cristalino, aprox. 650 *ug*/mg); estreptomicina (sulfato); gentamicina (sulfato, cristalino, aprox. 600 *ug*/mg) e tetraciclina (base livre, cristalina).

3.3.1. Preparo dos Estoques de Antimicrobianos

As soluções estoque de antimicrobianos foram preparadas sob condições de assepsia em tubos de ensaio esterilizados com capacidade para 25 ml, contendo como diluentes H_2O Mili-Q esterilizada, etanol (Merck) ou metanol (Merck), conforme a droga a ser diluída. As soluções foram homogeneizadas até a completa dissolução da droga, acondicionadas em tubos Eppendorfs esterilizados (0,5 ml por tubo) e armazenadas a -20° C no escuro. O Eppendorf com a solução estoque foi descongelado à temperatura ambiente por alguns minutos antes da utilização da droga.

As concentrações utilizadas no preparo dos estoques, diluentes empregados e condições de armazenamento encontram-se na tabela 3.3.

Tabela 3.3. Concentrações, diluentes e armazenamento das soluções estoque de antimicrobianos.

Droga	Concentração	Armazenamento
Ap (ampicilina)	25 mg/ml em H_2O Mili-Q	-20° C escuro
Cm (cloranfenicol)	25 mg/ml em metanol	-20° C escuro
Gm (gentamicina)	8 mg/ml em H_2O Mili-Q	4° C escuro
Km (canamicina)	25 mg/ml em H_2O Mili-Q	-20° C escuro
Sm (estreptomicina)	20 mg/ml em H_2O Mili-Q	-20° C escuro
Tc (tetraciclina)	12,5 mg/ml em metanol	-20° C escuro
Nal (ácido nalidíxico)	25 mg/ml em NaOH 0,2 N	-20° C escuro

3.3.2. Concentrações de Uso dos Antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos foram sempre adicionados ao meio líquido frio, após esterilização em autoclave, ou ao meio sólido esterilizado resfriado a 60° C, nas concentrações especificadas na Tabela 3.4. As placas ou tubos preparados eram deixados em repouso por 12 horas para difusão da droga antes do uso ou armazenamento (Tabela 3.4).

Tabela 3.4. Concentrações de uso de antimicrobianos em meios sólido e líquido.

Droga	Conc. (ug/ml) no meio		Armazenamento (a 4° C)
	sólido	líquido	
Ap (ampicilina)	100	150-200	< 2 d.
Cm (cloranfenicol)	20	40	5 d.
Gm (gentamicina)	-	50	-
Km (canamicina)	100	150	5 d.
Sm (estreptomicina)	50	60	5 d.
Tc (tetraciclina)	30	40	5 d., escuro
Nal (ácido nalidíxico)	20	40	7 -14 d.

3.4. Soluções e Reagentes de Uso Geral

3.4.1. Solução Salina 0,85% (w/v)

A solução salina 0,85% foi utilizada na diluição de suspensões bacterianas em diversos protocolos.

NaCl	8,5 g
H_2O destilada q.s.p.	1000 ml

NaCl (ECIBRA) foi dissolvido em H_2O sob agitação constante. A solução foi acondicionada em frascos de diluição (10 ml por frasco) ou recipientes adequados e esterilizada em autoclave a 121° C por 20 min. A solução esterilizada foi armazenada à temperatura ambiente.

3.4.2. Tampão PBS pH 7,4 (Phosphate Buffered Saline)

A solução salina-fosfato tamponada foi utilizada na diluição de suspensões bacterianas nos protocolos de hemaglutinação, na coloração de May-Grünwald e na metodologia de "Western Blotting".

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na_2HPO_4	1,44 g
KH_2PO_4	0,24 g
H_2O Mili-Q q.s.p.	1000 ml
	pH 7,4

Os sais (ECIBRA) foram dissolvidos em 800 ml de H_2O e o pH foi ajustado para 7,4 com HCl 1 N ou NaOH 5 N. O volume foi completado para 1000 ml e a solução foi esterlizada em autoclave a 121° C por 20 min e armazenada a 4° C.

3.4.3. Solução NaOH 5 N

A solução de NaOH 5 N foi utilizada no ajuste de pH dos meios de cultura e soluções tampão, quando especificado.

NaOH ..... 20 g
H_2O Mili-Q q.s.p. ..... 100 ml

NaOH (REAGEN) foi dissolvido em 60 ml de H_2O sob agitação constante. O volume foi completado para 100 ml e a solução foi armazenada à temperatura ambiente em frasco plástico.

3.4.4. Solução NaOH 10 N

A solução de NaOH 10 N foi utilizada na preparação das soluções de extração de DNA plasmidial.

NaOH ..... 40 g
H_2O Mili-Q q.s.p. ..... 100 ml

NaOH (REAGEN) foi dissolvido em 40 ml de H_2O sob agitação constante. O volume foi completado para 100 ml e a solução foi armazenada à temperatura ambiente em frasco plástico.

3.4.5. Solução HCl 1 N

A solução de HCl 1 N foi utilizada no ajuste de pH dos meios de cultura e soluções tampão, quando especificado.

HCl (MERCK)	8,62 ml
H_2O Mili-Q q.s.p.	100 ml

A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.4.6. Solução EDTA 0,5 M (pH 8,0)

A solução de EDTA 0,5 M foi utilizada no preparo das soluções de extração de DNA plasmidial e na metodologia de "Western blotting".

EDTA . 2 H_2O	18,61 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p.	100 ml
	pH 8,0

O EDTA . 2 H_2O (ácido etilenodiaminotetra-acético, sal disódico diidratado) (REAGEN) foi adicionado a 80 ml de H_2O.

O pH foi ajustado para 8,0 dissolvendo-se pastilhas de NaOH (REAGEN) sob agitação constante (aprox. 2 g). O volume foi completado para 100 ml e a solução foi dispensada em frascos de 20 ml e esterilizada em autoclave a 121° C por 20 min. A solução estoque foi armazenada a -20° C.

3.4.7. Solução SDS 10% (w/v)

A solução de SDS 10% foi utilizada no preparo das soluções de extração de proteínas, nos tampões de corrida e na confecção de géis de poliacrilamida-SDS.

SDS ..... 50 g
H_2O Mili-Q q.s.p. ..... 500 ml

O SDS (dodecil sulfato de sódio, Sigma, MBG) foi dissolvido sob agitação suave em 400 ml de H_2O a 68° C. O volume foi completado para 500 ml. A solução foi filtrada em papel Whatmann n° 3 e armazenada à temperatura ambiente.

3.4.8. Solução SDS 20% (w/v)

A solução de SDS 20% foi utilizada no preparo das soluções de extração de DNA plasmidial.

SDS ..... 100 g
H_2O Mili-Q q.s.p. ..... 500 ml

O SDS (dodecil sulfato de sódio) (Sigma, MBG) foi dissolvido com agitação suave em 300 ml de H_2O a 68° C. O volume foi completado para 500 ml. A solução foi filtrada em papel Whatmann n° 3 e armazenada à temperatura ambiente.

3.4.9. Soro Fetal Inativado de Bovino (SFIB)

O soro fetal bovino foi empregado como complemento do meio de cultura para crescimento de células HeLa e Vero e no preparo das soluções de bloqueio de "Western Blotting".

O SFB (Cultilab) foi inativado por aquecimento em banho-maria a 60° C por 40 min. O soro fetal inativado de bovino foi distribuído em tubos de ensaio com rosca esterilizados (10 ml/tubo), sob condições assépticas e armazenado a -20° C.

3.5. Soluções para Preparação de Proteínas Totais, de Superfície e de Membrana

3.5.1. Solução de Tratamento 2X (Tris-Cl 0,125 M pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%)

Tampão de gel de separação 4X	2,5 ml
Solução SDS 10%	4 ml
Glicerol	2 ml
2-mercaptoetanol	1 ml
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p.	10 ml

As soluções do tampão de gel de separação 4X e glicerol (REAGEN) foram dissolvidas em uma proveta graduada, adicionando-se por último o SDS e o 2-mercaptoetanol (Sigma). O volume foi completado para 10 ml com H_2O. A solução foi homogeneizada, distribuída (5 ml/frasco) e armazenada a -20° C.

3.5.2. Solução TCA 40% (w/v) (Acido tricloroacético 40%)

Acido tricloroacético ..... 40 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p. ..... 100 ml

O TCA (REAGEN) foi dissolvido em um volume mínimo de H_2O e o volume completado para 100 ml. A solução foi armazenada em frasco plástico a -20° C.

3.5.3. Solução Etanol-Éter Etílico (1v/1v)

Etanol ..... 50 ml
Éter etílico ..... 50 ml

Etanol (MERCK) e éter etílico (Grupo Química) foram misturados em frasco de vidro com tampa hermética. A solução foi armazenada a -20° C.

3.5.4. Tampão Tris-Cl 3,3 mM (pH 7,4)

Tris	0,3996 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p.	1000 ml
	pH 7,4

Tris (Sigma) foi dissolvido em 800 ml de H_2O sob agitação constante. O pH foi ajustado para 7,4 com HCl e o volume completado para 1000 ml. A solução foi armazenada a 4° C.

3.5.5. Tampão Tris-Cl 0,1 M - EDTA 10 mM (pH 7,2)

Tris	12,11 g
EDTA . 2 H_2O	3,722 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p.	1000 ml
	pH 7,2

Tris (Sigma) e EDTA (REAGEN) foram dissolvidos em 800 ml de H_2O sob agitação constante. O pH foi ajustado para 7,2 com HCl e o volume completado para 1000 ml. A solução foi armazenada a 4° C.

3.5.6. Tampão Tris-Cl 0,1 M - $MgCl_2$ 10 mM (pH 7,2)

Tris	12,11 g
$MgCl_2$. 6 H_2O	2,033 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p.	1000 ml
	pH 7,2

Tris (Sigma) e $MgCl_2$ (REAGEN) foram dissolvidos em 800 ml de H_2O sob agitação constante. O pH foi ajustado para 7,2 com HCl e o volume completado para 1000 ml. A solução foi armazenada a 4° C.

3.5.7. Tampão Glicina-Sacarose (Glicina 0,1 M pH 9,2, Sacarose 0,75 M)

Glicina	7,34 g
Sacarose	256,73 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p.	1000 ml
	pH 9,2

Glicina (ECIBRA) e sacarose (REAGEN) foram dissolvidos em 700 ml de H_2O sob agitação constante. O pH foi ajustado para 9,2 com NaOH 5 N e o volume foi completado para 1000 ml. A solução foi armazenada a -20° C.

3.5.8. Tampão Tris-Cl 85 mM (pH 6,8)

Tris	1,0294 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p.	100 ml
	pH 6,8

Tris (Sigma) foi dissolvido em 80 ml de H_2O sob agitação constante. O pH foi ajustado para 6,8 com HCl e o volume completado para 100 ml. A solução foi armazenada a 4° C.

3.5.9. Solução Triton X100 10% (v/v)

Triton X100 ..... 10 ml
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p. ..... 100 ml

O Triton (MERCK) foi dissolvido em 80 ml de H_2O sob agitação suave e o volume completado para 100 ml. A solução foi armazenada a 4° C.

3.6. Soluções para SDS-PAGE

A formulação das soluções e tampões utilizados no preparo dos géis de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) descontínuos, segundo o sistema de Laemmli (1970), seguiu as especificações do "Hoefer Electrophoresis Catalog and Exercises (1990-1991)".

3.6.1. Solução de Monômero (30%T 2.7%C_{bis})

Acrilamida ..... 58.4 g
Bis-acrilamida ..... 1.6 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p. ..... 200 ml

Acrilamida e bis-acrilamida (Sigma, MBG) foram dissolvidas em 150 ml de H_2O e o volume da solução foi completado para 200 ml. A solução foi filtrada em papel Whatmann n° 3 e armazenada em frasco escuro a 4° C.

3.6.2. Tampão de Gel de Corrida 4X (Tris-Cl 1.5 M pH 8.8)

Tris ..... 36,33 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p. ..... 200 ml
pH 8,8

Tris (Sigma) foi dissolvido em 150 ml de H_2O. O pH da solução foi ajustado para 8,8 com HCl (MERCK) e o volume foi completado para 200 ml. A solução foi filtrada em papel Whatmann nº 3 e armazenada a 4º C.

3.6.3. Tampão de Gel de Empacotamento 4X (Tris-Cl 0,5 M pH 6,8)

Tris ..... 3,0275 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p. ..... 50 ml
pH 6,8

Tris (Sigma) foi dissolvido em 30 ml de H_2O. O pH da solução foi ajustado para 6,8 com HCl (MERCK) e o volume foi completado para 50 ml. A solução foi filtrada em papel Whatmann nº 3 e armazenada a 4º C.

3.6.4. Catalisador (Persulfato de amônia 10% [w/v])

Persulfato de amônia ..... 5 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p. ..... 50 ml

Persulfato de amônia (Sigma, MBG) foi dissolvido em 40 ml de H_2O e o volume foi completado para 50 ml. A solução foi filtrada em papel Whatmann nº 3 e distribuída em Eppendorfs (500 μl/tubo de 0,5 ml), sendo armazenada em freezer a -20º C no escuro. Um tubo foi descongelado à temperatura ambiente imediatamente antes de sua utilização.

3.6.5. "Overlay" de Gel de Corrida (Tris-Cl 0,375 M pH 8.8, 0,1% SDS)

Tampão de Gel de Corrida 4X ..... 25 ml
SDS 10% ..... 1 ml
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p. ..... 100 ml

As soluções foram homogeneizadas sob agitação suave em 80 ml de H_2O e o volume foi completado para 100 ml. A solução foi armazenada a 4º C.

3.6.6. Tampão de Corrida (Tris 0,025 M pH 8.3, Glicina 0,192 M, SDS 0,1%)

Tris ..... 12,11 g
Glicina ..... 57,6 g
Solução de SDS 10% ..... 40 ml
H_2O destilada q.s.p. ..... 4000 ml

Tris (Sigma) e glicina (ECIBRA) foram dissolvidos sob agitação constante em 1000 ml de H_2O. Adicionou-se o SDS 10% e o volume foi completado para 4000 ml. O pH neste tampão

não precisa ser ajustado. O tampão foi armazenado à temperatura ambiente.

A solução do tampão de corrida da cuba inferior foi reutilizada 4 a 5 vezes e a solução da cuba superior foi descartada após cada corrida.

3.7. Soluções para "Western Blotting"

3.7.1. Tampão de Transferência (Tris 48 mM pH 8,3, glicina 39 mM, SDS 0,037%, metanol 20%)

Tris	17,4384 g
Glicina	8,7 g
SDS 10%	11,1 ml
Metanol	600 ml
H_2O Mili-Q q.s.p.	3000 ml
	pH 8,3

Tris (Sigma) e glicina (ECIBRA) foram dissolvidos sob agitação constante em 2000 ml de H_2O. Adicionou-se SDS 10% e metanol (MERCK). O pH foi ajustado para 8,3 com NaOH 5 N e o volume foi completado para 3000 ml. O tampão foi armazenado à temperatura ambiente.

3.7.2. Solução de Bloqueio PBS-SFIB (PBS pH 7,4, SFIB 10%, Tween 20 0,5%)

Soro fetal inativado de bovino (SFIB) . 4 ml
Tween 20 ..... 0,2 ml
PBS pH 7,4 q.s.p ..... 40 ml

SFIB (Cultilab) e Tween 20 (MERCK) foram homogeneizados sob agitação suave em 30 ml de PBS e o volume foi completado para 40 ml. A solução foi preparada imediatamente antes de sua utilização.

3.7.3. Solução de Lavagem PBS-Tween (PBS pH 7,4, Tween 20 0,5%)

Tween 20 ..... 5 ml
PBS pH 7,4 q.s.p ..... 1000 ml

Tween 20 (MERCK) foi homogeneizado sob agitação suave em 800 ml de PBS e o volume completado para 1000 ml. A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.7.4. Solução de Bloqueio Tris-NaCl-SBFI (Tris-Cl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, SFIB 10%)

Soro fetal inativado de bovino (SFIB) . 1 ml
Sol. Lavagem Tris-NaCl q.s.p. ..... 10 ml
pH 7,5

O SFIB foi dissolvido na solução de Lavagem Tris-NaCl imediatamente antes de sua utilização.

3.7.5. Solução de Lavagem Tris-NaCl (Tris-Cl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM)

Tris	9,0825 g
NaCl	13,1468 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p.	1500 ml
	pH 7,5

Tris (Sigma) e NaCl (ECIBRA) foram dissolvidos sob agitação em 1200 ml de H_2O. O pH ajustado para 7,5 com HCl (MERCK) e o volume foi completado para 1500 ml. A solução foi armazenada a 4° C.

3.8. Soluções para Revelação de Fosfatase Alcalina

3.8.1. Solução de Dimetilformamida 70% (v/v)

Dimetilformamida	700 *u*l
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p.	300 *u*l

Dimetilformamida (MERCK) e H_2O foram homogeneizados sob agitação em tubo Eppendorf e a solução foi utilizada em seguida.

3.8.2. Solução Estoque de NBT

NBT ..... 0,05 g
Dimetilformamida a 70% ..... 1 ml

NBT ("nitro blue tetrazolium - Grade III", cristalino) (Sigma) foi dissolvido sob agitação em dimetilformamida 70%. A solução foi armazenada à temperatuta ambiente no escuro.

3.8.3. Solução Estoque de BCIP

BCIP ..... 0,05 g
Dimetilformamida ..... 1 ml

BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato, sal dissódico, Sigma) foi homogeneizado na dimetilformamida (MERCK) sob agitação. A solução foi armazenada à temperatuta ambiente no escuro.

3.8.4. Tampão para Fosfatase Alcalina (Tris-Cl 0,1 M pH 9,5, NaCl 0,1 M, $MgCl_2$ 5 mM)

Tris ..... 1.211 g
NaCl ..... 0,5843 g
$MgCl_2$. 6 H_2O ..... 0,1017 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p. ..... 100 ml
pH 9,5

Tris (Sigma), NaCl (ECIBRA) e $MgCl_2$ (REAGEN) foram dissolvidos em 80 ml de H_2O sob agitação. O pH foi ajustado para 9,5 com NaOH 5 N e o volume completado para 100 ml. A solução foi armazenada a 4° C.

3.8.5. Substrato Cromogênico para Fosfatase Alcalina

Solução estoque NBT ..... 66 *u*l
Solução estoque BCIP ..... 33 *u*l
Tampão para fosfatase alcalina ..... 10 ml

Adicionaram-se 66 *u*l da solução estoque de NBT a 10 ml do tampão para fosfatase alcalina. Após dissolução completa adicionaram-se 33 *u*l da solução estoque de BCIP, com homogeneização vigorosa. A solução cromogênica foi preparada imediatamente antes do uso.

3.9. Soluções para Coloração de Prata

O preparo das soluções para coloração de prata, seguiu a formulação de Blum *et alii* (1987), com modificações.

3.9.1. Fixador (Etanol 50%, ácido acético 12%, 0,5 ml/l formaldeído a 37%)

Etanol	500 ml
Acido acético glacial	120 ml
Formaldeído a 37%	0,5 ml
H_2O Mili-Q esteril.	380 ml

Etanol (MERCK) e ácido acético glacial (MERCK) foram homogeneizados em H_2O e adicionou-se o formaldeído. A solução foi armazenada à temperatura ambiente em frasco hermeticamente fechado.

3.9.2. Solução de Etanol 50% (v/v)

Etanol (MERCK)	500 ml
H_2O Mili-Q	500 ml

A solução foi armazenada à temperatura ambiente em frasco hermeticamente fechado.

3.9.3. Solução de Pré-Tratamento (Tiossulfato de sódio 0,02%)

$Na_2S_2O_3 \cdot 5\ H_2O$	0,06 g
H_2O Mili-Q	300 ml

Tiossulfato de sódio (REAGEN) foi dissolvido sob agitação na H_2O. Esta solução foi preparada pouco tempo antes de ser utilizada.

Importante: a pureza deste reagente é importante para o sucesso da coloração de prata, pois esta é inibida pela presença de íons de cloro nos reagentes e na água empregados.

3.9.4. Solução de Impregnação (Nitrato de prata 0,2%, 0,75 ml/l formaldeído a 37%)

$AgNO_3$	0,6 g
Formaldeído a 37%	225 *ul*
H_2O Mili-Q	300 ml

Nitrato de prata (REAGEN) foi manipulado com espátula de vidro ou plástico, evitando-se qualquer contato com superfícies metálicas, e dissolvido na H_2O. Adicionou-se o formaldeído e a solução foi mantida a temperatura ambiente em frasco hermeticamente fechado até o momento de uso. Esta solução foi preparada pouco tempo antes de ser utilizada.

3.9.5. Solução Reveladora (Carbonato de sódio 6%, tiosulfato de sódio 0,4 mg%, 0,5 ml/l formaldeído a 37%)

Na_2CO_3	18 g
Solução de Pré-tratamento	6 ml
Formaldeído a 37%	150 *u*l
H_2O Mili-Q q.s.p.	300 ml

Carbonato de sódio (REAGEN) foi dissolvido em 250 ml de H_2O Mili-Q. Adicionou-se o formaldeído e a alíquota da solução de Pré-tratamento. O volume foi completado para 300 ml. A solução foi resfriada a 20º C e mantida em frasco hermeticamente fechado até o momento de uso. Esta solução foi preparada pouco tempo antes de ser utilizada.

3.9.6. Solução de Bloqueio da Revelação (Metanol 50%, ácido acético 12%)

Metanol (MERCK)	500 ml
Acido acético glacial (MERCK)	120 ml
H_2O Mili-Q	380 ml

A solução foi armazenada à temperatura ambiente em frasco hermeticamente fechado.

3.9.7. Solução de Metanol 50% (v/v)

Metanol (MERCK) ..... 500 ml
H_2O Mili-Q q.s.p. ..... 500 ml

A solução foi armazenada à temperatura ambiente em frasco hermeticamente fechado.

3.9.8. Solução de Preservação I (Metanol 30%)

Metanol ..... 300 ml
H_2O Mili-Q ..... 700 ml

A solução foi armazenada à temperatura ambiente em frasco hermeticamente fechado.

3.9.9. Solução de Preservação II (Glicerol 3%)

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

O glicerol (REAGEN) foi dissolvido em 800 ml de H_2O destilada e o volume completado para 1000 ml. A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.10. Soluções para Coloração de Coomassie Blue

O preparo das soluções para coloração de Coomassie Blue seguiu o "Hoefer Electrophoresis Catalog and Exercises (1990-1991)".

3.10.1. Solução Estoque de Coomassie Blue R-250 1%

Coomassie Blue R-250 ..... 1 g
H_2O Mili-Q ..... 100 ml

Coomassie Blue R-250 (Polysciences, Inc.) foi dissolvido em 100 ml de H_2O sob agitação constante. A solução foi filtrada em papel Whatman nº 3 e armazenada em frasco escuro à temperatura ambiente.

3.10.2. Solução Corante Coomassie Blue (Coomassie Blue R-250 0,125%, metanol 40%, ácido acético 7%)

Solução Coomassie Blue 1% ..... 62,5 ml
Metanol ..... 400 ml
Acido acético glacial ..... 70 ml
H_2O Mili-Q q.s.p. ..... 1000 ml

A solução estoque de Coomassie Blue 1% (Coomassie Blue R-250), o metanol (MERCK) e o ácido acético glacial (MERCK) foram dissolvidos em 800 ml de H_2O sob agitação constante e o volume foi completado para 1000 ml. A solução foi filtrada

em papel Whatman nº 3 e armazenada à temperatura ambiente em frasco escuro hermeticamente fechado. Uma vez utilizada na coloração de géis a solução corante foi descartada.

3.10.3. Solução de Descoloração I (Metanol 50%, ácido acético 10%)

Metanol	500 ml
Acido acético glacial	100 ml
H_2O destilada	400 ml

A solução foi armazenada à temperatura ambiente em frasco hermeticamente fechado.

Uma vez utilizada na descoloração do gel, a solução foi reciclada para reutilização através da remoção do corante com carvão ativado. A solução usada foi mantida com carvão ativado (aprox. 0,05%) por várias horas e filtrada em papel de filtro duplo. A solução foi descartada após a quinta reciclagem.

3.10.4. Solução de Descoloração II (Metanol 5%, ácido acético 7%)

Metanol	50 ml
Acido acético glacial	70 ml
H_2O destilada	880 ml

A solução foi armazenada à temperatura ambiente em frasco hermeticamente fechado.

Uma vez utilizada na descoloração do gel, a solução foi reciclada como a solução de Descoloração I.

3.11. Marcadores de Peso Molecular para SDS-PAGE

Foi utilizado o kit de marcadores de peso molecular para géis de poliacrilamida-SDS de procedência Sigma (MW-SDS-70).

Proteínas	MW
Lisozima	14,300
Beta-lactoglobulina	18,400
Tripsinogênio (PMSF)	24,000
Pepsina[16]	34,700
Albumina de ovo	45,000
Albumina bovina	66,000

As soluções estoque de proteínas indicadoras foram preparadas separadamente dissolvendo-se 13,5 mg de cada proteína referência em 500 *u*l da Solução de Ressuspensão 2X.

A solução de marcadores para utilização nos géis foi preparada misturando-se 100 *u*l da solução estoque de cada padrão em um tubo Eppendorf com rosca. A mistura foi fervida em banho-maria a 100° C por 5 minutos.

As soluções de proteínas foram armazenadas a -20° C.

16 - Segundo a especificação do fabricante a pespina não é adequada para ser utilizada como marcador de peso molecular no sistema de eletroforese descontinuo de Laemmli. Esta proteina apresenta migração lenta neste sistema, não indicando o peso molecular corretamente.

3.12. Soluções para Extração de DNA Plasmidial

3.12.1. Solução I (Tris-Cl 25 mM pH 8,0; glicose 50 mM; EDTA 10 mM)

Tris	0,3028 g
Glicose anidra	0,9008 g
Solução estoque EDTA 0.5 M	2 ml
H_2O Mili-Q q.s.p.	100 ml

Tris (Sigma), glicose (REAGEN) e solução estoque de EDTA 0.5 M foram dissolvidos em 70 ml de H_2O. O pH da solução foi ajustado para 8,0 com HCl (MERCK) e o volume foi completado para 100 ml em balão volumétrico. A solução foi aliquotada em frascos de 20 ml e autoclavada a 121° C por 20 min. Os estoque foram armazenados a -20° C e as soluções em uso a 4° C.

3.12.2. Solução II (NaOH 0.2 N; SDS 1%)

Solução NaOH 10 N	200 *ul*
Solução SDS 10%	100 *ul*
H_2O Mili-Q esteril.	9,7 ml

A solução de NaOH 10 N diluída em H_2O adicionou-se a solução de SDS 10%. A solução foi homogeneizada e armazenada à temperatura ambiente por 1 a 2 semanas.

3.12.3. Solução Acetato de Sódio 3 M

Acetato de sódio . 3 H_2O ..... 27,21 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p. ..... 200 ml

O acetato de sódio (REAGEN) foi dissolvido em volume mínimo de H_2O sob agitação constante. A solução foi aquecida à temperatura de 25° C para completa dissolução do sal. Completou-se o volume 200 ml em a solução estoque foi armazenada a -20° C.

3.12.4. Solução III (Acetato de sódio)

Solução de acetato de sódio 3 M ..... 60 ml
Acido acético glacial ..... 11.5 ml
H_2O Mili-Q esteril. ..... 28,5 ml
pH 4,8

`A solução de acetato de sódio 3 M diluída em água foi adicionado o ácido acético glacial (MERCK) sob agitação constante. A solução foi aliquotada (10 ml/frasco) e armazenada a 4° C.

3.12.5. Solução Estoque RNAse A (RNAse 10 mg/ml, Tris-Cl 15 mM pH 7,5, NaCl 15 mM)

RNAse A ..... 100 mg
Tris ..... 0,0182 g
NaCl ..... 0,0088 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p. ..... 10 ml

RNAse A (Sigma), Tris (Sigma) e NaCl (MERCK) foram dissolvidos em 8 ml de H_2O sob agitação. O volume foi completado para 100 ml. A solução foi fervida em banho-maria a 100° C por 15 min. para destruição de traços de DNAse. A solução resfriada foi aliquotada em tubos Eppendorf (500 *u*l/tubo) e armazenada a -20° C.

3.12.6. Solução de Ressuspensão 6X (Ficoll 400 15%, azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol FF 0,25%, RNAse A 0,1 mg/ml)

Ficoll 400	7,5 g
Azul de bromofenol	0,125 g
Xileno cianol FF	0,125 g
Solução estoque RNAse	500 *u*l
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p.	50 ml

Ficoll 400 (Pharmacia), azul de bromofenol (Sigma), xileno cianol FF (Sigma) e solução estoque de RNAse foram dissolvidos em 25 ml de H_2O. O volume foi completado para 50 ml em balão volumétrico. A solução foi aliquotada (5 ml/frasco) e os estoques foram armazenados a -20° C. A solução de trabalho foi armazenada à temperatuta ambiente.

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 0.5 M	20 ml
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p.	1000 ml
	pH 8,0

Tris (Sigma), ácido bórico (Heidel) e solução de EDTA 0,5 M foram dissolvidos em 800 ml de H_2O. O pH foi ajustado para o 8,0 com HCl (MERCK) e o volume completado para 1000 ml. A solução estoque foi armazenada à temperatura ambiente.

3.13.2. Tampão TEB 1X (Tris-borato 0,09 M pH 8,0; EDTA 2 mM)

O tampão TEB 1X foi utilizado nas corridas eletroforéticas e no preparo dos géis de agarose para eletroforese de DNA plasmidial.

Tampão TEB 5X	200 ml
H_2O destilada q.s.p.	1000 ml
	pH 8,0

O tampão TEB 1X foi preparado a partir de 200 ml da solução estoque de tampão TEB 5X, completando-se o volume

para 1000 ml com H_2O. O pH final não foi ajustado. O tampão foi armazenado à temperatura ambiente, sendo utilizado em corridas eletroforéticas por 5 a 6 vezes e descartado.

3.14. Soluções para Visualização de DNA em UV

3.14.1. Solução Estoque Brometo de Etídio 1%

Brometo de etídio ..... 1 g
H_2O Mili-Q esteril. ..... 100 ml

O brometo de etídio (cristalino, Sigma) foi dissolvido em H_2O sob agitação suave por várias horas. A solução foi armazenada em frasco escuro, hermeticamente fechado, a 4º C por vários meses.

3.14.2. Solução Corante de Brometo de Etídio (0,5 *ug*/ml)

Solução estoque de brometo
de etídio 1% ..... 50 *u*l
H_2O destilada ..... 100 ml

A solução corante foi preparada adicionando-se a solução estoque de brometo de etídio 1% em H_2O na própria cuba de coloração. A solução foi utilizada na coloração de vários géis, sendo descartada após algumas semanas de uso.

3.15. Soluções para Teste de Hemaglutinação

3.15.1. Solução de Alsevier

Glicose anidra	20,5 g
Citrato de sódio	8 g
NaCl	4,2 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p.	1000 ml
	pH 6,5

Glicose (REAGEN), citrato de sódio (ECIBRA) e NaCl (MERCK) foram dissolvidos em 800 ml de H_2O. O pH foi ajustado para 6,5 com uma solução de ácido cítrico 1 M. A solução, com volume completado para 1000 ml, foi esterilizada por filtração em membrana Millipore 0,45 *um* e armazenada a 4° C.

3.15.2. Tampão PBS pH 7,2

O preparo do Tampão PBS pH 7,2 seguiu a mesma formulação do Tampão PBS pH 7,4 (item 3.4.2), exceto no ajuste do pH para 7,2 com HCl 1 N.

3.15.3. Tampão PBS/D-manose 1%

D-manose	1 g
Tampão PBS pH 7,2	100 ml

D-manose (Reidel) foi dissolvida no tampão PBS pH 7,2 sob agitação constante. A solução foi aliquotada (20 ml/frasco) e armazenada a -20° C.

3.16. Soluções para Teste de Toxina STI

3.16.1. Solução Azul de Evans 2%

Azul de Evans ..... 2.0 g
Solução salina 0,85% esteril. q.s.p. ... 100 ml

O corante azul de Evans ("Evans blue", Sigma) foi dissolvido em salina 0,85% esterilizada sob agitação suave. A solução foi filtrada em filtro Whatman nº 3 e armazenada em frasco escuro à temperatura ambiente.

3.17. Soluções para Teste de Toxina LT

3.17.1. Tampão Salina-Veronal pH 7,4

NaCl ..... 17 g
Barbital de sódio ..... 0,75 g
Barbital ..... 1,15 g
$CaCl_2$ ..... 0,0167 g
$MgCl_2$ ..... .0,0476 g
Gelatina ..... 1 g
Mertiolate ..... 0,02 g
H_2O destilada q.s.p. ..... 1000 ml
pH 7,4

NaCl (ECIBRA), barbital (Sigma), barbital de sódio (Sigma), $CaCl_2$ (Reagen), $MgCl_2$ (REAGEN), mertiolate (Sigma) e gelatina (REAGEN) foram dissolvidos em 600 ml de H_2O aquecida sob agitação constante. O pH foi ajustado com HCl 1 N ou NaOH 5 N para 7,4. O volume foi completado em balão volumétrico e a solução foi armazenada a 4º C.

3.18. Soluções para Teste de Adesão a Células Hela

3.18.1. Tampão de Sorensen pH 7,3

a) Solução A (KH_2PO_4 M/15)

KH_2PO_4 ..... 9,0727 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p. ..... 1000 ml

O sal (REAGEN) foi dissolvido em 900 ml de H_2O Mili-Q esterilizada e o volume da solução foi completado em balão volumétrico.

b) Solução B (Na_2HPO_4 M/15)

Na_2HPO_4 . 7 H_2O..... 17,8713 g
H_2O Mili-Q esteril. q.s.p. ..... 1000 ml

O sal (REAGEN) foi dissolvido em 900 ml de H_2O Mili-Q esterilizada e o volume da solução foi completado em balão volumétrico.

c) Tampão de Sorensen pH 7,3

Solução A ..... aprox. 232 ml
Solução B .....aprox. 768 ml
pH 7,3

As soluções foram misturadas gradualmente sob agitação constante até pH 7,3. A solução foi autoclavada a 121° C por 20 min. e armazenada a 4° C.

3.18.2. Solução Estoque May-Grünwald 2%

May-Grunwald ..... 2 g
Metanol ..... 100 ml

O corante May-Grünwald (MERCK) foi dissolvido em metanol (MERCK) e deixado em banho-maria a 60° C por 30 min., com agitação ocasional. A solução foi filtrada em papel de filtro Whatman n° 3 e armazenada em frasco escuro à temperatura ambiente.

3.18.3. Corante May-Grünwald (1:2)

Solução estoque May-Grünwald 2% ..... 10 ml
Tampão de Sorensen pH 7,3 ..... 10 ml

A solução estoque de May-Grünwald a 2% foi diluída no tampão de Sorensen pH 7,3 sob agitação suave. A solução corante foi utilizada em seguida.

3.18.4. Solução Estoque Giemsa

Giemsa ..... 1 g
Glicerina ..... 54 ml
Metanol ..... 84 ml

O Giemsa (MERCK) foi dissolvido na glicerina (REAGEN) e aquecido em banho-maria a 60° C por 1,5 hs. Depois de frio adicionou-se o metanol (MERCK). A solução foi homogeneizada e filtrada em papel de filtro Whatman nº 3, sendo armazenada em frasco escuro à temperatura ambiente.

3.18.5. Corante de Giemsa (1:3)

Solução estoque Giemsa ..... 5 ml
Tampão de Sorensen pH 7,3 ..... 10 ml

A solução estoque de Giemsa foi diluída no tampão de Sorensen pH 7,3 sob agitação suave. A solução corante foi utilizada em seguida.

3.19. Soluções para Preparação de Telas de Microscopia Eletrônica e Coloração Negativa

3.19.1. Solução de Parlódio 0,5%

Parlódio ..... 0,25 g

Acetato de amila ..... 50 ml

O parlódio (Sigma) foi dissolvido no acetato de amila em um frasco hermeticamente fechado. A solução foi armazenada a 4° C no escuro por vários meses.

3.19.2. Solução de Citocromo-c

Citocromo-c ..... 10 mg

H_2O Mili-Q esteril. ..... 50 ml

O citocromo-c (Sigma) foi dissolvido na H_2O gelada sob agitação constante. A solução foi aliquotada em frascos escuros (1 ml/frasco) e armazenada a -20° C.

3.19.3. Solução de PTA 1% (Acido fosfotúngstico 1%)

Acido fosfotúngstico ..... 0.5 g

H_2O Mili-Q esteril. q.s.p. ..... 50 ml

pH 7,2

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Acido fosfotúgstico (Sigma) foi dissolvido em 40 ml de H_2O sob agitação em um béquer limpo. O pH da solução foi ajustado para pH 7,2 com KOH 10 N e o volume completado. A solução foi filtrada em membrana Millipore 0,22 *um* (Swinex, 13 mm) diretamente em frascos (25 ml) limpos e armazenada a 4° C.

4. Métodos

4.1. Teste de Pureza, Preservação e Manutenção dos Estoques das Amostras Bacterianas

As amostras bacterianas utilizadas (Tabela 3.1) foram testadas quanto à pureza dos estoques originais através da análise das características bioquímicas, da morfologia das colônias crescidas em meio sólido e por visualização de lâminas coradas com coloração de Gram ao microscópio de luz.

Um inóculo de cada amostra foi repicado em 3,0 ml de meio NB em tubo (15 x 120 mm), incubado por 12-18 horas a 37° C e semeado por esgotamento em placas com ágar MacConkey. As placas foram invertidas e incubadas por 12-18 horas a 37° C.

Uma colônia característica foi novamente repicada para meio NB em tubo, incubada e plaqueada em ágar MacConkey. Após a incubação as placas foram analisadas quanto à uniformidade da morfologia, diâmetro e capacidade de degradação da lactose das colônias e das células bacterianas na coloração de Gram.

Após este reisolamento foi efetuada a caracterização bioquímica das amostras de *Escherichia coli*, segundo Edwards & Ewing (1972).

Após a confirmação das características bioquímicas, foi preparado um estoque inicial de manutenção em meio de Manutenção.

Os estoques para preservação e utilização de rotina foram preparados somente após a confirmação das características biológicas das amostras bacterianas pela determinação do perfil de resistência a drogas e hemaglutinação.

Durante o período de desenvolvimento dos ensaios de laboratório, as amostras bacterianas utilizadas foram estocadas através de crio-preservação em glicerol e em tubos com meio de manutenção.

Para os estoques de crio-preservação a cultura bacteriana foi incubada por 12 hs. a 37° C, em 3,0 ml de meio LB com antibióticos. Adicionou-se ao tubo da cultura (12 x 150 mm) glicerol P.A. (Merck) esterilizado por autoclavagem, na concentração final de 25% (v/v). O tubo foi selado com rolha de borracha e homogeneizado em "vortex". As amostras preparadas foram estocadas em freezer a -20° C.

Os tubos de estoque com 5,0 ml meio de manutenção, acrescidos de antibióticos, foram inoculados a partir de um pré-inóculo da cultura bacteriana incubado por 12 hs. a 37° C, em 3,0 ml de meio LB com antibióticos. Os tubos foram incubados por 12-18 hs. a 37° C, selados com rolha de borracha e guardados à temperatura ambiente no escuro.

4.2. Determinação do Nível de Resistência a Antimicrobianos

As amostras bacterianas foram ensaiadas quanto ao perfil de resistência aos antibióticos ampicilina (Ap), cloranfenicol (Cm), canamicina (Km), estreptomicina (Sm), tetraciclina (Tc) e ao ácido nalidíxico (Nal).

Os ensaios de resistência foram realizados em placas de Petri com 20,0 ml de meio NA. O meio foi preparado, distribuído em frascos de diluição (20 ml/frasco) e autoclavado a 121° C por 15 min. O meio foi resfriado a 60° C para a adição das drogas.

Os antimicrobianos foram adicionados ao meio com micropipeta. O meio foi homogeneizado e vertido na placa em seguida. As concentrações de antimicrobianos ensaiadas foram: 0; 5; 10; 20; 50; 100; 250; 500; 750 e 1000 *ug*/ml.

As amostras bacterianas a serem testadas foram crescidas inicialmente em tubos com 3,0 ml de NB (6 x 60 mm) por 18 a 20 horas a 37° C. Aproximadamente 10 *ul* das suspensão bacteriana foram inoculados por método de multialça nas placas com NA + antimicrobiano nas concentrações descritas acima. As placas foram invertidas e incubadas por 18 a 20 horas a 37° C. O nível de resistência de cada amostra foi determinado pela maior concentração da droga em que a amostra apresentou crescimento.

4.3. Determinação do Padrão de Hemaglutinação com Diferentes Eritrócitos

As amostras bacterianas foram caracterizadas quanto à capacidade de aglutinação de eritrócitos humanos, de carneiro, cavalo, galinha, cobaia e boi. As reações de hemaglutinação foram realizadas em lâmina e tituladas em placas de 96 orifícios com fundo em "U". Foi avaliada a capacidade de hemaglutinação das amostras crescidas em diferentes meios de cultura e incubadas a 16° C e a 37° C.

4.3.1. Crescimento das Amostras Bacterianas

As amostras bacterianas foram inoculadas em 3,0 ml de Meio LB (13 x 120 mm) e incubadas por 72 horas a 16° C ou por 12-18 hs. a 37° C. As culturas foram semeadas por esgotamento com alça de platina em placas de Petri com diferentes meio de cultura (CFA, AG, MINCA e MM) para expressão de fímbrias. As placas foram invertidas e incubadas por 72 horas a 16° C ou por 12-18 hs. a 37° C.

4.3.2. Preparo dos Eritrócitos

Os sangues de boi, cavalo e carneiro foram coletados sob condições assépticas e imediatamente homogeneizados em solução de Alsevier (1v/1v). As soluções de eritrócitos foram distribuídas em tubos esterilizados

(10 ml/tubo) e armazenadas a 4° C por 1 semana antes de sua utilização.

Os sangues de cobaia, galinha e humano (tipo A^+) foram coletados, imediatamente homogeneizados em solução de Alsevier (1v/1v) e preparados para utilizações nos ensaios de hemaglutinação.

Nos tubos estocados a 4° C, o sobrenadante foi removido por aspiração antes do procedimento de lavagem. Adicionou-se solução salina 0,85% esterilizada (1v/1v), gelada, à suspensão de eritrócitos em tubo de centrífuga. A a solução foi homogeneizada suavemente, centrifugada a 2.000 g por 10 min., resuspendida em 10 ml de PBS pH 7,2 e novamente centrifugada.

Para os testes de hemaglutinação em placas de 96 orifícios foi preparada uma suspensão a 1% da "papa" de eritrócitos em aproximadamente 20 ml tampão PBS pH 7,2 + D-manose 1%. Este volume foi suficiente para 2 placas de 96 orifícios.

Para os testes de hemaglutinação em lâmina foi preparada uma suspensão a 5% da "papa" de eritrócitos em aproximadamente 20 ml tampão PBS pH 7,2 + D-manose 1%.

4.3.3. Testes de Hemaglutinação em Lâmina

Um raspado do crescimento bacteriano da superfície das placas incubadas a 16° C ou 37° C, conforme descrito anteriormente, foi homogeneizado delicadamente em 20 μl de

tampão PBS pH 7,4 com D-manose a 1% gelado, em uma lâmina de microscopia sobre uma placa de gelo. As preparações para reação com eritrócitos de cobaia na ausência de D-manose foram homogenizadas em 20 *u*l de tampão PBS pH 7,4 gelado sem D-manose.

Foram adicionados às suspensões de bactérias nas lâminas 20 *u*l de uma suspensão de eritrócitos a 10% em tampão PBS/D-manose pH 7,4, gelada, ou em tampão PBS sem D-manose (eritrócitos de cobaia). Foram utilizadas supensões de eritrócitos preparadas conforme descrito no item 4.3.2.

A suspensão de bactérias e eritrócitos foi homogeneizada por revolução da lâmina e mantida sobre a placa de gelo por 2-5 minutos, quando fez-se a leitura dos resultado.

4.3.4. Testes de Micro-Hemaglutinação em Placa

Os teste de micro-hemaglutinação foram realizados em placas com 96 orifícios (8 x 12) com fundo em "U". As placas foram lavadas, enxaguadas em água destilada, secas e os orifícios limpos com algodão embebido em álcool.

Foram adicionados 100 *u*l de tampão PBS pH 7,2 com D-manose 1%, gelado, nos orifícios da placa e 200 *u*l de tampão apenas nos orifícios da coluna 1. A placa foi mantida sobre gelo durante o processo de manipulação.

Um raspado do crescimento bacteriano da superfície do meio das placas incubadas a 16° C ou 37° C, conforme

descrito anteriormente, foi resuspendido delicadamente contra a parede dos orifícios da coluna 1 da placa, a fim de que todos os poços apresentassem uma concentração uniforme de bactérias. Uma diluição seriada das suspensões bacterianas foi realizada com o auxílio de uma micropipeta de 100 *u*l de 8 canais (Titer-Tek). Adicionaram-se, à cada orifício da placa, 100 *u*l da suspensão de eritrócitos a 1% em tampão PBS pH 7.4 com D-manose 1%, preparada conforme descrito no item 4.3.2. A suspensão de bactérias e eritrócitos foi homogeneizada delicadamente por revolução e incubada em geladeira (4° C) por 2 horas.

A leitura dos resultados foi realizada após o período de incubação. Os poços que apresentaram hemólise das hemácias foram descartados e as amostras repetidas posteriormente.

A última diluição onde ocorreu reação positiva com a presença de halo de hemaglutinação, foi considerada o título da micro-hemaglutinação. Foram empregadas amostras padrão para os controles positivo e negativo de hemaglutinação para cada sangue testado.

4.3.5. Classificação dos Padrões de Hemaglutinação das Amostras Bacterianas

Os resultados de hemaglutinação em lâmina e micro-hemaglutinação em placa foram classificados de acordo com os padrões de hemaglutinação de Evans *et alii* (1980) (Quadro

2). Não foram utilizados para esta classificação eritrócitos de macaco verde africano e de carneiro.

As fímbrias presentes nas amostras bacterianas foram classificadas através da descrição dos padrões de hemaglutinação descritos na literatura para amostras de *E. coli* de origem bovina: K99, F41, FY e 31A (Quadro 3).

4.4. Visualização de Fímbrias Através de Microscopia Eletrônica de Transmissão

4.4.1. Preparo das Telas de Microscopia Eletrônica

Nas preparações de microscopia eletrônica foram utilizadas telas de cobre com diâmetro de malha de 400 "Mesh. As telas sofreram deposição de uma película de parlódio, metalização com carbono e impregnação com citocromo-c antes da preparação das amostras bacterianas, conforme descrito a seguir.

Em uma cuba de vidro contendo água destilada foi adicionada uma gota da solução de parlódio com pipeta Pasteur. A película formada foi removida com auxílio de papel de filtro. Uma outra gota da solução de parlódio foi depositada sobre a superfície da água imediatamente após a remoção do primeiro filme.

As telas de microscopia eletrônica foram depositadas sobre as porções mais finas e uniformes do filme, tomando-se o cuidado de não se depositar telas numa

área do filme superior a 5 cm de diâmetro. Com o auxílio de uma pinça, as telas foram levemente pressionadas contra o filme de parlódio para aumentar a adesão.

A retirada das telas foi realizada com auxílio de um pedaço de papel de filtro (aprox. 8 x 8 cm de diâmetro), que foi foi aplicado por cima das telas. O papel de filtro com as telas aderidas foi retirado e invertido, de modo que as telas ficassem na porção superior do papel. O filtro foi protegido contra a deposição de poeira e deixado secar à temperatura ambiente durante uma noite.

As telas secas foram metalizadas com uma película fina de carbono em metalizador Hitachi (HUS-4GB).

Na preparação das telas, utilizou-se uma solução de citocromo-c para permitir uma melhor adesão bacteriana e espalhamento, minimizando o caráter hidrofóbico conferido pelas fímbrias. Para cada tela a ser sensibilizada foi depositada uma gota (aprox. 20 *u*l) da solução de citocromo-c sobre uma superfície de Parafilm e deixadas em repouso, cobertas, por 1 hora. Após este período as faces metalizadas das telas foram depositadas sobre a gota e imediatamente removidas, deixando secar à temperatura ambiente por alguns minutos.

4.4.2. Preparo das Amostras Bacterianas, Coloração Negativa com PTA e Visualização

As amostras bacterianas foram plaqueadas por esgotamento com alça de platina em toda a superfície de placas com meio CFA, a partir de um inóculo em 3,0 ml de meio LB incubado a 37° C por 12-18 horas. As placas de CFA foram invertidas e incubadas a 37° C por 12 horas.

Um raspado da superfície do meio foi delicadamente ressuspendido em 200 *u*l de água bidestilada sobre uma superfície de Parafilm com auxílio de um palito esterilizado. Aplicou-se uma gota de 50 *u*l do material ressuspendido sobre uma tira de Parafilm. Sobre esta gota foi depositada a tela de microscopia eletrônica com a película sensibilizada com citocromo-c voltada para a gota. A tela foi deixada em contato com a suspensão bacteriana por 2 minutos e a seguir o excesso de material foi retirado encostando-se a borda da tela em um pedaço de papel absorvente. A tela foi então depositada sobre uma gota de 50 *u*l da solução de PTA 1% e deixada em repouso por 2 minutos. O excesso foi retirado com papel absorvente. A tela foi acondicionada em um porta-telas para secagem.

As telas secas foram visualizadas em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss modelo EM-9, sob aumentos de 9.780 e 28.048 X. As fotomicrografias eletrônicas foram feitas em filme Kodalite (Kodak) e

ampliadas em papel fotográfico Kodak F-3, segundo instruções de processamento do fabricante.

4.5. Testes da Produção de Toxinas STI, LT, VT e Hemolisina

4.5.1. Teste da Produção de STI

A avaliação da produção da toxina STI foi realizada através do teste do camundongo recém-nascido (Dean *et alii*, 1973), com algumas modificações.

As amostras baacterianas foram inoculadas em 10 ml de meio CAYE, em erlenmeyers (125 ml), a partir de um pré-inóculo em 3,0 ml de meio LB incubado a 37° C por 12-18 hs.

As culturas foram incubadas sob agitação (140 rpm) a 37° C por 14 hs. Uma alíquota de 1,4 ml da suspensão bacteriana foi transferida para tubo Eppendorf esterilizado e centrifugada a 15.000 g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo (esterilizado) e novamente centrifugado.

Em um Eppendorf esterilizado adicionou-se 5 *u*l da solução estoque de gentamicina (8 mg/ml) ao sobrenadante transferido da última centrifugação. O material foi armazenado a -20° C.

Ao sobrenadante da cultura bacteriana (1,0 ml), foram adicionados 100 *u*l da solução de Azul de Evans (1%). A solução foi homogeneizada e inoculou-se 0,1 ml a 3

camundongos de 3 dias de idade, via intragástrica. Os animais foram mantidos à temperatura ambiente e sacrificados com éter 4 horas após a inoculação. Verificou-se a ocorrência de diarréia e acúmulo de líquido no interior dos intestinos, como indicativos da atividade de STI. Os intestinos e as carcaças de cada animal foram pesados separadamente e uma relação peso dos intestinos/peso das carcaças superior a 0,085 foi considerada positiva.

Foram utilizadas amostras STI^+ e STI^- como controles em cada realização do teste (Tabela 3.2).

4.5.2. Teste da Produção de LT

A produção de LT foi avaliada através do teste de imuno-hemólise radial (RIH), descrita por Yano *et alii* (1982) e Serafim *et alii* (1981).

As amostras bacterianas foram incubadas e preparadas como descrito anteriormente para o teste de STI.

Os eritrócitos de cobaia foram lavados em tampão salina-veronal pH 7,4 + Ca^{++} e Mg^{++} e padronizados para uma suspensão a 5%. O gel de imunodifusão foi preparado a partir da homogeneização de 10 ml da suspensão de eritrócitos com 90 ml de uma solução derretida de agarose (Sigma) 1% em tampão salina-veronal com Ca^{++} e Mg^{++}, acrescida de mertiolate (Sigma) 1:5.000. O gel foi vertido em uma placa suporte e resfriado. Orifícios de 4 mm de diâmetro foram

feitos no gel e 20 ul dos sobrenadantes das culturas bacterianas foram aplicados nos orifícios.

O gel foi incubado à temperatura ambiente por 4 hs em câmara úmida e 20 ul de uma solução padronizada de anti-toxina colérica diluída 1:30 foram adicionados aos orifícios. O gel foi incubado por mais 4 hs em câmara úmida à temperatura ambiente e uma solução de complemento de cobaia (1:10) foi gotejada sobre toda a superfície.

Após 4 horas de incubação em câmara úmida à temperatura ambiente o excesso de complemento foi lavado com tampão salina veronal e o diâmetro de hemólise foi avaliado. Diâmetros iguais ou maiores que 5 mm (incluindo o diâmetro do orifício) foram considerados resultados positivos.

Foram utilizadas amostras LT^+ e LT^- como controles positivo e negativo (Tabela 3.2).

4.5.3. Teste da Produção de VT

A verificação da produção de Verocitotoxina (VT) foi realizada em culturas de células Vero, segundo a metodologia de Yano *et alii* (1986).

As amostras bacterianas foram incubadas e preparadas como descrito anteriormente para o teste de STI.

As culturas de células Vero foram feitas em placas de cultura de tecido de 96 orifícios (fundo chato), incubadas a 37° C em atmosfera de CO_2 por 24 hs. Foram

utilizadas placas com tapete não-confluente para a realização dos testes.

O meio de cultura das placas foi removido e adicionaram-se 100 *ul* de meio de Eagle e 20 *ul* dos sobrenadantes das culturas bacterianas, com 3 repetições para cada amostra. Foram utilizados sobrenadantes de amostras SLT^+, SLT^- e meio de cultura como controles positivo e negativos.

As placas foram incubadas a 37° C em atmosfera de CO_2. A cada 24 hs. após a inoculação foi feita uma leitura. Os resultados negativos foram acompanhados até 72 hs. após a inoculação.

4.5.4. Teste da Produção de Hemolisina

As amostras bacterianas foram inoculadas em placas de ágar Sangue, a partir de um pré-inóculo em 3,0 ml de meio LB incubado a 37° C por 12-18 hs. As placas foram invertidas e incubadas a 37° C por 18 horas.

A presença de halo de hemólise foi indicativa da produção de hemolisina pelas amostras bacterianas. Os resultados negativos foram incubados por mais 12 horas, quando foram lidos.

Foram utilizadas uma amostra de *Aeromonas hydrophilla* e *E. coli* MS101 como controles positivo e negativo.

4.6. Testes de Aglutinação com Antissoros

4.6.1. Produção e Preparo dos Antissoros

Para a produção dos antissoros anti-31A e anti-FY foram utilizadas as amostra de *Escherichia coli* BZ43 e Att25 (Tabela 3.1). A produção de antissoros específicos seguiu a metodologia de Edwards & Ewing (1972) e Conterpois *et alii* (1985).

Uma suspensão formalizada das amostras bacterianas crescidas a 37° C em meio CFA foi injetada via intravenosa em coelhos adultos. Doses de reforço foram aplicadas periodicamente até que o título de antissoro no sangue atingisse níveis adequados. O soro dos animais foi colhido através de punção cardíaca e separado dos eritrócitos.

A titulação dos antissoros brutos (não-absorvidos e não diluídos) foi realizada através de reações de aglutinação com diluições seriadas dos antissoros à temperatura ambiente. A maior diluição que apresentou aglutinação positiva foi considerada o título do antissoro.

Para a absorção dos antissoros foram utilizadas as amostras BZ43 (31A$^+$) e Att25 (FY$^+$) incubadas a 16° C e a amostra BZ43xp4 incubada a 37°. As amostras foram plaqueadas em meio LB com alça de Drigalsky, a partir de um pré-inóculo em 3,0 ml de LB incubado a 16° C por 48 hs. As placas foram invertidas e incubadas a 16° C por 48 horas. O mesmo

procedimento foi seguido para a amostra BZ43xp4, porém as incubações foram a 37° C por 12-18 hs.

As bactérias crescidas em cada placa foram resuspendidas em 5 ml de tampão PBS pH 7,4 esterilizado gelado e centrifugadas a 10.000 g (SS-34, 4° C) por 10 min. O sedimento foi lavado por resuspensão em PBS pH 7,4 e centrifugado.

O precipitado foi formalizado por resuspensão em 5 ml de tampão PBS pH 7,4 acrescido de 0,5% de formaldeído (37%). A suspensão foi mantida a 4° C por 18 hs e testada para esterilidade através de plaqueamento em meio LB.

A suspensão foi centrifugada, lavada com 5,0 ml de PBS pH 7,4 esterilizado gelado e novamente centrifugada. Uma alíquota de 10 *ul* da "papa" bacteriana lavada foi reservada e diluída 1:100 em solução salina esterilizada para a realização dos testes de aglutinação para controle da absorção.

A "papa" de bactérias lavada foi resuspendida v:v com antissoro diluído 1:5, em solução salina esterilizada. A solução foi incubada a 37° C por 1 h. sob agitação e a 4° C por 18 hs. O antissoro foi centrifugado e o procedimento de absorção (incubação com amostra bacteriana formalizada crescida a 16° C) foi repetido até que o antissoro absorvido não mais apresentasse reação de aglutinação com a suspensão de bactérias. Geralmente foram necessárias 3 a 4 absorções para eliminar esta reação. Após a absorção completa do

antissoro, este foi distribuído em alíquotas (1 ml) e armazenado a -20° C.

4.6.2. Reações de Aglutinação

As amostras bacterianas foram plaqueadas com alça de platina em meio CFA, a partir de pré-inóculos em 3,0 ml de LB, incubados a 37° C por 12-18 hs ou a 16° C por 48 hs. As placas foram invertidas e incubadas a 37° C por 12-18 hs ou a 16° C por 48 hs.

Um raspado do crescimento bacteriano foi homogeneizado em 20 *u*l de solução salina 0,85%, esterilizada, em uma placa de vidro. Adicionou-se à suspensão bacteriana 10 *u*l do antissoros e homogeneizou-se a mistura por rotação da placa por 1 min. As reações de aglutinação negativas foram confirmadas ao microscópio de luz sob aumento de 400 X.

Foram testados os antissoros anti-31A e anti-FY não-absorvidos nas diluições 1:3 (considerada sem diluição) e 1:1000, e os mesmos antissoros absorvidos na diluição 1:100.

4.7. Extração e Eletroforese de DNA Plasmidial

4.7.1. Crescimento das Amostras Bacterianas e Extração de DNA Plasmidial

As amostras bacterianas foram inoculadas em 5 ml de meio LB ou BHI em tubo (15 x 120 mm) com antibióticos. Os tubos foram incubados por 18-20 horas a 37° C.

A metodologia de extração de DNA plasmidial utilizada foi uma modificação do procedimento de lise alcalina de Birnboin & Doli (1979).

Uma alíquota de 1,0 ml do crescimento bacteriano em suspensão foi transferida para tubo Eppendorf (1,5 ml) esterilizado e centrifugada em microcentrífuga (15.000 g) por 2 min. O sobrenadante foi descartado e o excesso de meio foi drenado em papel absorvente.

O sedimento foi resuspendido em 100 *u*l da Solução I a 4° C com micropipeta e o tubo foi mantido em gelo por 15 min.

Adicionaram-se 200 *u*l da solução II e os tubos foram fechados homogeneizados por inversão suave (10 inversões). Os tubo foram rapidamente retornados ao gelo e mantidos abertos por 5 min.

Adicionaram-se 150 *u*l da Solução III ao conteúdo dos tubos, que foram fechados e invertidos suavemente por 10 vezes, para que a solução lavasse toda a superfície interna do tubo. Observou-se neste passo a formação de um precipitado claro.

Os tubos foram mantidos em gelo por 30 min. e a seguir centrifugados em microcentrífuga por 6 min. Uma alíquota de 400 *u*l do sobrenadante foi cuidadosamente transferida para um Eppendorf esterilizado, evitando-se a resuspensão ou transferência do sedimento. Esta operação foi efetuada rapidamente para evitar a resuspensão do DNA cromossômico precipitado.

Adicionou-se 1 ml de etanol 100% (MERCK) a -20° C aos tubos e a solução foi homogeneizada por inversão. Os tubos foram mantidos em freezer a -20° C por 1 hora ou por 12-18 horas.

O DNA plasmidial foi precipitado por centrifugação em microcentrífuga por 6 min. O sobrenadante dos tubos foi rapidamente descartado e o excesso de líquido foi drenado em papel absorvente. Os tubos foram deixados abertos por aproximadamente 10 min. à temperatura ambiente para total evaporação dos resíduos de etanol.

O sedimento de DNA plasmidial foi resuspendido suavemente em 50 *u*l da solução I gelada e mantido em gelo. Uma alíquota de 20 *u*l da suspensão de DNA foi transferida para um tubo Eppendorf esterilizado ao qual foi adicionado 5 *u*l da solução de Ressuspensão 6X e homogeneizada.

O DNA plasmidial em solução de Ressuspensão foi aplicado em gel de agarose e procedeu-se à corrida eletroforética em sistema de gel horizontal submerso (Sambrook *et alii*, 1989).

4.7.2. Eletroforese de DNA Plasmidial

A agarose utilizada na confecção dos géis foi de baixa eletroendosmose (Sigma, low E.E.O), sendo empregada nas concentrações de 0,5% a 0,7% em géis de 3 mm de espessura. A agarose foi dissolvida em tampão TEB 1X e derretida em forno de microondas. A solução foi resfriada a 60° C e vertida diretamente na placa de vidro suporte com o pente de acrílico já posicionado. O gel foi deixado em repouso até a completa solidificação da matriz de agarose.

O gel foi submerso no tampão de Corrida (TEB 1X) na cuba e as amostras de DNA plasmidial aplicadas nas canaletas. Aplicou-se 2,5 V/cm até a entrada das amostras na matriz do gel e 5 V/cm até o marcador de azul de bromofenol atingir a extremidade final.

O gel foi então retirado da cuba e transferido para uma cuba de coloração com solução corante de brometo de etídio. O tempo de coloração mínimo foi de 20 min. à temperatura ambiente, ou então por 12-18 horas a 4° C.

A visualização das bandas foi realizada em um transiluminador de luz ultravioleta no escuro. As fotografias foram feitas com filme preto e branco Panatomic-X (32 ASA) ou Fuji (100 ASA), empregando-se uma lente macro e filtro vermelho (Kodak), com tempos de exposição de 15 seg. (filme 32 ASA) ou 7 seg. (filme 100 ASA). A revelação dos filmes e fotografias em papel F-3 (Kodak) seguiram as especificações do fabricante.

A determinação dos pesos moleculares dos plasmídios foi efetuada através de medições nas fotografias ampliadas.

4.8. Extração e Eletroforese de Proteínas

4.8.1. Proteínas Totais

A preparação de proteínas totais das amostras seguiu a metodologia descrita por Jackman e Whiley (1990).

As amostras bacterianas foram semeadas em placas de Petri com meio CFA com alça de Digralky, a partir de um inóculo em meio LB em tubo (15 x 120 mm), crescido por 12-18 hs. a 37° C. As placas foram invertidas e incubadas por 12 horas a 37° C.

Através de um raspado do crescimento bacteriano na superfície do meio foram colhidas 0,2 g de peso fresco de células em um tubo Eppendorf com rosca (1,8 ml).

Adicionou-se 500 *ul* do Tampão de Tratamento 2X e a suspensão de células foi homogeneizada em "vortex" por alguns segundos. Os tubos foram fervidos em banho-maria a 100° C por 5 minutos, resfriados e centrifugados em microcentrífuga (aprox. 15.000 g) por 5 minutos.

A porção líquida do sobrenadante foi transferida para um tubo Eppendorf esterilizado com auxílio de micropipeta, sendo imediatamente armazenada a -20° C. Evitou-se coletar a fração gelatinosa formada pelo DNA denaturado e restos de parede, uma vez que ácidos nucléicos podem interferir na coloração de prata.

4.8.2. Proteínas de Superfície

A preparação de proteínas de superfície das amostras seguiu a metodologia de "shearing" (W. D. Silveira, comunicação pessoal, 1990) e de aquecimento a 60° C (Shimizu *et alii*, 1987).

As amostras bacterianas foram semeadas em garrafas de Roux com meio CFA (100 ml) com bastão de vidro a partir de um inóculo de 1,0 ml em meio LB em tubo (15x120 mm) crescido por 12-18 horas a 37° C. As garrafas de Roux foram invertidas e incubadas por 12 horas a 37° C. As culturas bacterianas foram então utilizadas para a preparação de proteínas de superfície.

4.8.2.1. Extração de Proteínas de Superfície por "Shearing"

O crescimento bacteriano de uma garrafa de Roux foi resuspendido em 10 ml de solução salina esterilizada,

gelada, com auxílio de bastão de vidro e transferido para um béquer (50 ml).

A suspensão bacteriana foi aspirada com uma seringa descartável de 20 ml e impelida através de uma agulha com diâmetro aproximado de 1 mm. O "shearing" foi repetido 10 vezes.

A suspensão bacteriana foi centrifugada a 15.000 g (SS-34, 4° C) por 15 min. O sobrenadante foi transferido para outro e adicionou-se TCA 40% para uma concentração final de 10% de TCA.

O material foi mantido em gelo por 20 min. e novamente centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o excesso de líquido foi removido com papel absorvente. Adicionou-se aos tubos 10 ml da solução de etanol-éter etílico (v/v) a -20° C e o sedimento foi lavado por agitação vigorosa em "vortex" por alguns segundos.

Os tubos foram mantidos em gelo por 20 min., centrifugados e o sedimento foi novamente lavado com etanol-éter.

Este material foi centrifugado, e o sobrenadante descartado. O excesso de líquido foi removido com papel absorvente e os tubos foram deixados em repouso à temperatura ambiente para evaporação completa do etanol-éter etílico.

O preparo das proteínas para eletroforese seguiu a metodologia descrita no item 4.8.2.3.

4.8.2.2. Extração de Proteínas de Superfície por Aquecimento a 60° C

O crescimento bacteriano de uma garrafa foi resuspendido em 10 ml de solução salina esterilizada, gelada, com auxílio de bastão de vidro e transferido para um tubo de centrífuga. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 60° C por 30 min., com agitação suave ocasional. O material foi centrifugado e precipitado com TCA conforme o protocolo de preparação de proteínas de superfície por "shearing" anteriormente descrito.

4.8.2.3. Preparação de Proteínas de Superfície para SDS-PAGE

O sedimento seco dos tubos de centrífuga foi resuspendido em 500 *ul* da solução de resuspensão 2X com micropipeta e repassado para tubos Eppendorf com rosca (1,8 ml). Os tubos foram submetidos a fervura em banho-maria a 100° C por 5 minutos, resfriados e centrifugadas em microcentrífuga (aprox. 15.000 g) por 5 minutos.

O sobrenadante foi transferido para um tubo Eppendorf esterilizado e armazenado a -20° C.

4.8.3. Proteínas de Membrana

A preparação de proteínas de membrana das amostras seguiu a metodologia descrita por Benedetti (1990), com algumas modificações.

As amostras bacterianas foram crescidas conforme o protocolo de proteínas totais. As bactérias de uma placa foram resuspendidas em 10 ml de Tris-Cl 3,3 mM pH 7,4, gelado, e o volume foi completado para aproximadamente 80 ml, utilizando-se o mesmo tampão.

A suspensão bacteriana foi homogeneizada em Omni-Mixer (Sorvall) por 1 min. na velocidade 4, em banho de gelo. O material foi centrifugado a 7.500 rpm (SS-34, 4° C) por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi resuspendido em 10 ml de tampão Tris-Cl 0,1 M - EDTA 10 mM pH 7,2, centrifugado e resuspendido em 10 ml de tampão Tris-Cl 0,1 M - $MgCl_2$ 10 mM pH 7,2.

A suspensão foi centrifugada e o sedimento resuspendido em 10 ml de tampão Glicina-Sacarose pH 9,2. O material foi lisado em ultrasonicador (20 Hz, 70-90 W), em banho de gelo, em 4 ciclos de 30 s, seguidos de 1 min. de repouso.

O material foi centrifugado a 7.500 rpm (SS-34, 4° C) por 10 min. e o sobrenadante foi transferido para um tubo limpo. A suspensão foi centrifugada a 16.500 rpm (SS-34, 4° C) por 20 min. e o sedimento foi resuspendido em 10 ml de tampão Tris-CL 3,3 mM pH 7,4.

O material foi novamente centrifugado a 16.500 rpm. O precipitado foi resuspendido em 400 *ul* de tampão Tris-Cl 85 mM pH 6,8 e 100 *ul* de Triton X-100 10%. A suspensão foi transferida para tubo Eppendorf esterilizado e agitada (Shaker - 140 rpm) por 20 min. à temperatura ambiente. A solução foi centrifugada em microcentrífuga (15.000 g) por 3 min. e 500 *ul* do sobrenadante foram transferidos para um tubo Eppendorf com rosca esterilizado.

Adicionaram-se aos tubos 500 *ul* do tampão de Tratamento 2X. As amostras foram fervidas em banho-maria a 100° C por 5 minutos e armazenadas a -20° C.

4.8.4. Eletroforese de Proteínas em SDS-PAGE

As eletroforese de proteínas totais, de superfície e de membrana foram realizadas no sistema descontínuo dissociante de Laemli (SDS-PAGE), em equipamento Pharmacia Sistema 2001. A montagem dos géis e condições de corrida seguiram a metodologia descrita no "Hoefer Electrophoresis Catalog and Exercises (1990-1991)".

A montagem dos géis de separação (12,5%) e de empacotamento (4%) seguiu a tabela abaixo.

Soluções	Gel de Separação	Gel de Empacotamento
	12,5%T 2,7%C_{bis}	4%T 2,7%C_{bis}
Monômero 30%T 2,7%C_{bis}	25 ml	2,66 ml
Tampão Gel Separação 4X	15 ml	--
Tampão Gel Empacot. 4X	--	5,0 ml
SDS 10%	0,6 ml	0,2 ml
H_2O Mili-Q	19,1 ml	12,2 ml
Catalisador	300 *ul*	100 *ul*
TEMED	20 *ul*	10 *ul*
Volume final aproximado	60 ml	20 ml

As soluções dos géis de separação foram homogeneizadas em H_2O, conforme a sequência da tabela, e aplicadas nas formas dos géis (receita para 2 géis). Inseriu-se um pente em branco para a formação do espaço do gel de empacotamento. Os géis foram polimerizados a 37° C por 30 min.

A mistura do gel de empacotamento seguiu a mesma sequência do gel de separação. O pente em branco foi retirado das formas de gel e o espaço remanescente foi lavado com H_2O destilada. O excesso de água foi removido com papel absorvente e a interface foi lavada com aproximadamente 4 ml da solução do gel de empacotamento. O excesso foi removido com papel absorvente e o restante da solução foi aplicado. Os pentes (10 canaletas) foram inseridos nos conjuntos e os géis de empacotamento foram

polimerizados a 37° C por 1 hora. O pente foi removido e as canaletas lavadas com H_2O destilada.

Caso os géis fossem armazenados, o gel de empacotamento não era montado e a interface do gel de separação era coberta com 5 ml da solução de "overlay" do gel de separação. A montagem posterior do gel de empacotamento seguiu o mesmo protocolo acima.

As canaletas dos géis polimerizados foram completadas com tampão de corrida Tris-Glicina-SDS e as amostras de proteína aplicadas com seringas Hamilton. O conjunto foi montado na cuba superior e o volume da cuba completado com tampão de corrida. Os géis foram montados na cuba inferior, totalmente submersos em tampão de corrida Tris-Glicina-SDS.

A corrida eletroforética consistia de uma pré-corrida de 15 ma/gel e de uma corrida de 30 ma/gel, por aproximadamente 5 horas, até que o azul de bromofenol atingisse o final do gel de separação. Nas corridas por 12-18 hs. foram empregados 4 a 5 ma/gel.

4.8.5. Coloração de Coomassie Blue para Proteínas em Gel de SDS-PAGE

A metodologia de coloração de Coomassie Blue proteínas em gel de SDS-poliacrilamida seguiu a metodologia descrita no "Hoefer Electrophoresis Catalog and Exercises (1990-1991)", com modificações.

Após a corrida eletroforética o gel foi transferido para uma cuba de acrílico (20 x 15 cm) com 150 ml da solução Corante de Coomassie Blue, sob agitação suave por alguns segundos. O gel permaneceu nesta solução à temperatura ambiente por 12-18 horas.

A solução de coloração foi removida e o gel foi submerso na solução de descoloração I, sob agitação constante, por 1 hora. A solução foi trocada para a solução de descoloração II e o gel foi mantido nesta solução, com trocas ocasionais e sob agitação, até a remoção da coloração de fundo.

4.8.6. Coloração de Prata Para Proteínas em Gel de SDS-PAGE

A metodologia de coloração de proteínas em gel de SDS-poliacrilamida seguiu a técnica originalmente descrita por Blum *et alii* (1987), com modificações.

Após a corrida eletroforética o gel foi transferido para uma cuba de acrílico (20 x 15 cm) com 150 ml da solução de Fixador, sob agitação suave por alguns segundos. O gel foi mantido no fixador a 4º C por 12-18 horas para permitir a fixação de proteínas de baixo peso molecular.

A manipulação dos géis foi realizada utilizando-se luvas de borracha lavadas e enxaguadas em água destilada

para a remoção de gordura e talco, os quais interferem na coloração e podem causar marcas no gel.

A sequência da técnica de coloração de prata seguiu a tabela abaixo. Os tempos em cada solução foram seguidos estritamente e a coloração foi interrompida quando a intensidade de revelação das bandas atingiu um ponto de saturação.

Durante o tempo de permanência nas soluções a cuba com o gel foi mantido sob agitação suave constante.

A revelação do gel e bloqueio foram realizadas empregando as soluções Reveladora e de Bloqueio a 20° C.

Passos	Soluções	Tempo de Tratamento
1. Fixação	Fixador	$\geq$ 1 h
2. Lavagem Alcoólica	Etanol 50%	3 X 20 min.
3. Pré-tratamento	Solução de Pré-tratamento	1 min.
4. Lavagem	Agua destilada	3 X 20 seg.
5. Impregnação	Solução de Impregnação	20 min.
6. Lavagem	Agua destilada	2 X 20 seg.
7. Revelação	Solução Reveladora	10 min.
8. Lavagem	Agua destilada	2 X 2 min.
9. Bloqueio	Solução de Bloqueio	10 min.
10. Lavagem	Metanol 50%	$\geq$ 20 min.

Após o passo n° 10 o gel foi mantido na solução de Metanol 50% a 4° C no escuro até o momento da secagem.

4.8.7. Preservação e Secagem dos Géis de SDS-PAGE

Os géis corados foram transferidos da solução de metanol 50% para a solução de Preservação I (metanol 30%) a 4° C, sob agitação constante, por 30 min. e para a solução de Preservação II (glicerol 3%) a 4° C por mais 30 min., sob agitação.

Após a passagem pelas duas soluções de preservação os géis foram envelopados em papel celofane poroso, previamente embebido em água destilada, apoiados sobre uma placa de vidro (30 x 30 cm) e deixados secar por 4-5 dias à temperatura ambiente.

4.9. "Western Blotting"

A transferência de proteínas dos géis de poliacrilamida-SDS para suportes de nitrocelulose seguiu a metodologia descrita por Sambrook *et alii* (1989), com o emprego de soro fetal inativado de bovino como agente de bloqueio.

A separação de proteínas totais das amostras $31A^+$, incluindo a amostra 11a, foi realizada através de SDS-PAGE em gel 12,5%. O gel foi lavado em H_2O destilada e montado para transferência.

O papel de nitrocelulose, cortado no mesmo tamanho do gel, foi embebido em H_2O Mili-Q esterilizada e montado no suporte da cuba de transferência. O gel de poliacrilamida

foi alinhado sobre o papel de nitrocelulose e o conjunto foi imobilizado e montado na cuba, contendo tampão de Transferência.

A transferência das proteínas do gel para o papel de nitrocelulose foi realizada por 12-18 horas a 4° C. O papel de nitrocelulose foi acondicionado em um saco plástico selável (Zipp), adicionando-se 20 ml da solução de Bloqueio PBS-SFBI pH 7,4. (0,1 ml de solução/cm^2 de papel de nitrocelulose). O material foi mantido sob agitação suave por 1,5 hs à temperatura ambiente.

Removeu-se a solução de bloqueio e adicionaram-se 20 ml de solução de bloqueio PBS-SFBI pH 7,4 com 20 *ul* do anticorpo anti-31A absorvido com a amostra BZ43xp4 a 37° C. A concentração final do antissoro na solução foi 1:1000. O material foi incubado por 2 hs. à temperatura ambiente sob agitação suave.

O papel de nitrocelulose foi lavado com 700 ml de tampão PBS-Tween pH 7,4, utilizando-se uma piceta, transferido para uma cuba com 200 ml de solução de lavagem Tris-NaCl pH 7,5 e incubado sob agitação suave por 10 minutos à temperatura ambiente.

Selou-se o papel em um saco plástico, adicionando-se 20 ml da solução de bloqueio Tris-NaCl-SFBI pH 7,5 contendo anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma). A concentração final do conjugado na solução foi de 1:2000. O material foi incubado por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação suave.

A seguir o papel foi lavado com 800 ml da solução de lavagem Tris-NaCl pH 7,5 empregando-se uma piceta. Em uma cuba rasa realizou-se a incubação com 10 ml do substrato cromogênico para fosfatase alcalina, por aproximadamente 20 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação constante. A reação foi bloqueada transferindo-se o gel para uma cuba com 50 ml de PBS pH 7,4 + 200 *ul* da solução de EDTA 0,5 M pH 8,0.

O papel de nitrocelulose revelado ("Western blott") para fosfatase alcalina (bandas azuis) foi fotografado empregando-se transiluminação e lente macro com filtro vermelho, em filme Kodak (100 ASA).

4.10. Análises de Conjugação

As conjugações das amostras bacterianas BZ2468, Att25 e 31A com a amostra receptora MS101 e da amostra SM10 (pRT733::TnphoA) com a amostra BZ43 foram realizadas através da metodologia de conjugação em papel de filtro.

As amostras bacterianas doadoras e a receptora foram crescidas em 3,0 ml de BHI, com antibióticos, a 37° C por 12-18 hs. Uma alíquota de 1,0 ml foi transferida para um tubo Eppendorf esterilizado e centrifugada em microcentrífuga (15.000 *g*) por 1 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado por homogeneização suave em 1,0 ml de BHI sem antibióticos. A suspensão foi novamente centrifugada e resuspendida em 100 *ul* de BHI.

Uma alíquota de 90 *ul* da amostra doadora e 30 *ul* da amostra receptora (4:1) foram transferidos para um tubo contendo 880 *ul* de BHI. A mistura foi homogeneizada, incubada a 37° C por 2 horas e centrifugada. O sedimento foi resuspendido em aproximadamente 75 *ul* de BHI. Toda a suspensão bacteriana foi distribuída na superfície de um papel de filtro Millipore (0,22 *um*) esterilizado, previamente colocado sobre a superfície de uma placa com meio NA. Após a absorção do líquido sobre o papel de filtro, a placa foi invertida e incubada a 37° C por 18-20 hs.

O papel de filtro foi removido com auxílio de uma pinça e transferido para um tubo com 1,0 ml de meio BHI. O meio foi homogeneizado vigorosamente em "vortex". A suspensão bacteriana foi diluída em solução salina 0,85% esterilizada, até 10^{-2}. As diluições 10^{0}, 10^{-1} e 10^{-2} foram plaqueadas em LA com os antibióticos de seleção.

Paralelamente aos transconjugantes, as amostras parentais e receptora foram plaqueadas em meio LA com antibióticos a fim de monitorar a ocorrência de mutantes resistentes aos antibióticos de seleção dos parentais.

4.11. Mutação com Transposon TnphoA

As amostras bacterianas BZ43 e SM10 (pRT733:TnphoA) foram crescidas e conjugadas conforme descrito no protocolo de conjugação.

A suspensão bacteriana foi diluída em salina até 10^{-6}. Alíquotas de 100 *ul* destas diluições foram plaqueadas em meio LAXP com Sm e Km. As placas foram incubadas a 37° C por 18 hs e, após este período, transferidas para 4° C por 24 horas.

As colônias transconjugantes que apresentaram fenótipo azul no meio de cultura foram transferidas para tubos com 3,0 ml de BHI contendo Sm e Km e incubadas a 37° C por 12 hs. Os transconjugantes foram estriados em placas com LAXP com Sm e Km para obtenção de colônias isoladas. As placas foram incubadas e transferidas para 4° C e as colônias azuis isoladas foram transferidas para tubos de estoque em meio LA com Sm e Km.

4.12. Teste de Adesão a Células HeLa

O teste de adesão a células HeLa foi realizado segundo a metodologia descrita por Scaletsky *et alii* (1984).

4.12.1. Cultivo e Preparo das Células HeLa

As células HeLa (Instituto Adolfo Lutz, SP) foram incubadas em garrafas com meio Eagle suplementado com 10% SBFI, a 37° C por 48 hs. A seguir foram tripsinizadas e diluídas para aproximadamente 1,2 x 10^5 células/ml com meio de Eagle suplementado com 10% SFBI.

Uma alíquota de 1,0 ml da suspensão de células foi transferida para tubos de Leighton contendo uma lamínula (11 x 24 mm), que foram incubados a 37° C por 48 hs.

Imediatamente antes da realização do teste de adesão o meio de cultura das células foi descartado, as células foram lavadas com tampão PBS pH 7,4 e meio trocado para 1,0 ml de meio de Eagle suplementado com 2% SFBI e D-manose 1%.

4.12.2. Crescimento das Amostras Bacterianas e Teste de Adesão

As amostras bacterianas foram inoculadas em 3,0 ml de TSB e incubadas a 37° C por 16-18 hs. Foram utilizadas neste teste as amostras BZ43, BZ43xp4 e BZ43xp6, além dos padrões de adesão negativa, localizada e difusa (Tabela 3.2a).

Adicionaram-se 40 *u*l das culturas bacterianas aos tubos de Leighton, que foram incubados por 30 min. a 37° C (período de adesão). O meio de cultura foi removido e as células lavadas 6 vezes com 1,0 ml de tampão PBS pH 7,4 com D-manose 1%. Adicionou-se 1,0 ml do meio de Eagle suplementado com 2% SFBI e D-manose 1%. Os tubos foram incubados a 37° C por 3 hs (perído de multiplicação).

O meio de cultura foi descartado e as células lavadas 3 vezes com 1,0 ml de tampão PBS pH 7,4. As

lamínulas foram fixadas por 20 min. adicionando-se 1,0 ml de metanol.

As lamínulas foram removidas dos tubos e as células coradas com o corante de May-Grünwald por 5 min. O corante foi removido e adicionou-se o corante de Giemsa por mais 10 min. As lamínulas foram lavadas várias vezes com tampão PBS pH 7,4, diafanizadas em xilol e montadas em bálsamo do Canadá.

A adesão bacteriana foi visualizada em microscópio de luz, sob aumentos de 400 e 1.000 X, e fotografada em filme Kodak Panatomic-X (32 ASA) em fotomicroscópio com filtro azul. O filme e as fotografias em papel F3 (Kodak) foram processados segundo as instruções do fabricante.

4.13. Teste de Patogenicidade em Camundongos

O teste de patogenicidade das amostras bacterianas em camundongo seguiu a metodologia descrita por Taylor *et alii* (1987), sendo utilizado para a determinação da capacidade de adesão das amostras BZ43 e BZ43xp6 em teste de competição.

As amostras bacterianas foram crescidas em tubos contendo 3,0 ml de meio LB com Km e Sm por 12-18 horas a 37° C. Um inóculo de 100 *ul* foi semeado com alça de Drigalsky em meio CFA e incubado por 18-20 hs a 37° C.

Após o período de incubação, as amostras foram resuspendidas em 2,0 ml de solução salina esterilizada e

diluídas serialmente até 10^{-9} em solução salina esterilizada. As diluições de 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9} e 10^{-10} foram plaqueadas em meio LAXP com Sm (500 *ug*/ml) para determinar o número de U.F.C./ml nos inóculos aplicados nos camundongos. As placas foram incubadas por 18-20 hs a 37° C.

Cinco camundongos da linhagem Swiss com três dias de idade, pertencentes a uma mesma ninhada, foram utilizados no teste de competição. Dois deles, selecionados ao acaso, foram utilizados como controle. Um teste piloto foi realizado para avaliação dos microrganismos da flora intestinal destes camundongos. Os intestinos de dois animais foram macerados em salina esterilizada e a suspensão foi plaqueada em meio LA e LAXP com Sm (500 *ug*/ml).

Alíquotas de 0,5 ml da diluição 10^{-2} das amostras BZ43 e BZ43xp6 foram homogeneizadas e 200 *u*l foram inculados nos camundongos, via intragástrica. Os animais inoculados foram marcados e devolvidos à ninhada teste. Os controle foram mantidos em uma ninhada separada.

Os camundongos inoculados foram acompanhados por 72 horas para verificar a ocorrência de diarréia ou a morte. Após este período os animais foram sacrificados, os intestinos foram retirados em condições assépticas e macerados em 1,0 ml de solução salina esterilizada. A suspensão foi homogeneizada vigorosamente em "vortex" e diluída até 10^{-6} em solução salina esterilizada. Alíquotas de 100 *u*l das diluições de 10^{0} a 10^{-7} foram plaqueadas em meio LAXP com Sm (500 *ug*/ml). As placas foram invertidas,

incubadas por 18-20 hs a 37° C e transferidas para 4° C por 24 horas.

A contagem da frequência das colônias azuis e brancas nas placas foi corrigida em relação ao número de U.F.C. inoculadas e utilizada para expressar a competição entre a linhagem BZ43 selvagem (colônias brancas) e a linhagem BZ43xp6 (colônias azuis).

5. Resultados

5.1. Caracterização Biológica das Amostras Bacterianas

5.1.1. Resistência a Drogas

Os resultados obtidos através dos testes de resistência a drogas, segundo metodologia descrita no item 4.2, encontram-se na Tabela 5.1.

Dentre as 7 amostras bacterianas estudadas 3 apresentaram resistência a no mínimo 3 antibióticos (Km, Sm e Tc) das 6 drogas empregadas na caracterização (Ap, Tc, Cm, Km, Sm, Nal).

A amostra Att25 (FY^+) apresentou resistência aos antibióticos Ap, Km, Sm e Tc até a concentração de 250 *ug*/ml.

A amostra 31A ($31A^+$) foi resistente a Cm e Km até a concentração de 250 *ug*/ml, a Sm até 50 *ug*/ml e a Tc até 100 *ug*/ml.

A amostra BZ2468 foi resistente a Ap até a concentração de 1000 *ug*/ml, a Cm até 250 *ug*/ml e a Km, Sm e Tc até 100 *ug*/ml.

Todas as amostras foram sensíveis ao ácido nalidíxico (Nal).

Tabela 5.1. Padrão de resistência das amostras bacterianas a agentes antimicrobianos.

Amostras bacterianas	Nível de resistência (*ug*/ml)					
	Ap	Cm	Km	Nal	Sm	Tc
Att25	250	s	250	s	250	250
54-5	s	s	s	s	s	5
2147-4	s	s	s	s	s	5
11a	s	s	s	s	s	5
11a-Sm	s	s	s	s	>500	5
31A	s	250	250	s	50	100
BZ43	s	s	s	s	s	5
BZ43-Sm	s	s	s	s	>500	5
BZ2468	1000	250	100	s	100	100

s = sensível a concentrações < 5 *ug*/ ml

5.1.2. Produção de Toxinas ST, LT, VT e Hemolisina

Os resultados obtidos através dos testes de produção das toxinas STI, LT, VT e hemolisina, segundo metodologias descritas no itens 4.5, encontram-se na Tabela 5.2.

Apenas a amostra 11a apresentou produção da toxina termoestável STI, avaliada pelo teste do camundongo recém-nascido.

Nenhuma das amostras bacterianas estudadas apresentou produção da toxina termolábil LT, avaliada pelo teste de imunohemólise radial.

As amostras 54-5 e 31A apresentaram produção de VT ("Shiga-like toxin" ou Verotoxina) no teste em cultura de células Vero. A amostra BZ2468 apresentou um resultado inconclusivo neste teste, mesmo após 3 repetições.

Nenhuma das amostras bacterianas estudadas apresentou produção de hemolisina no teste de hemólise de hemácias de carneiro em ágar Sangue.

Tabela 5.2. Padrão de produção de toxinas STI, LT, VT e hemolisina (HL).

Amostras bacterianas	Produção de toxinas			
	STI	LT	VT	HL
Att25	-	-	-	-
54-5	-	-	+	-
2147-4	-	-	-	-
11a	+	-	-	-
31A	-	-	+	-
BZ43	-	-	-	-
BZ2488	-	-	?	-

? = resultado atípico, não conclusivo.

5.1.3. Hemaglutinação com Diferentes Eritrócitos

5.1.3.1. Hemaglutinação em Lâmina

Os resultados dos testes de hemaglutinação das amostras bacterianas cultivadas em diferentes meios de cultura a 37° C e ensaiadas com eritrócitos de boi, cavalo, carneiro, cobaia, galinha e humanos, segundo metodologia descrita no item 4.3.3, encontram-se nas Tabelas 5.3 (CFA), 5.4 (AG), 5.5 (MINCA) e 5.6 (MM).

Todas as amostras bacterianas estudadas apresentaram em comum hemaglutinação D-manose resistente com eritrócitos de boi quando cultivadas em meio CFA, AG, MINCA e MM.

A classificação das amostras FY⁺: Att25, 54-5 e 2147-4 crescidas em meio CFA a 37° C corresponde ao tipo de hemaglutinação V-B, segundo Evans *et alii* (1980), apresentando hemaglutinação D-manose resistente com eritrócitos de boi. Estas também apresentaram hemaglutinação D-manose resistente com eritrócitos de carneiro (Tabela 5.3).

As amostras 31A⁺: BZ43 e BZ2468, incluindo nesta categoria a amostra 11a, crescidas em meio CFA a 37° C, apresentaram classificação correspondente ao tipo de hemaglutinação VII-D, com reação de hemaglutinação D-manose resistente com eritrócitos de boi e de cobaia. Estas

amostras também apresentaram hemaglutinação D-manose resistente de eritrócitos de carneiro (Tabela 5.3).

A amostra 31A crescida em meio CFA a 37° C apresentou hemaglutinação D-manose resistente com eritrócitos de boi, cavalo, carneiro, cobaia, galinha e humano, sendo enquadrada no grupo de hemaglutinação VII-D. Não foram consideradas para esta classificação a reação D-manose resistente positiva com eritrócitos de cavalo e carneiro (Tabela 5.3).

O cultivo das amostras bacterianas em meio AG, MINCA e MM resultou em padrão de hemaglutinação semelhante ao observado no cultivo em meio CFA, com hemaglutinação D-manose resistente com eritrócitos de boi (Tabelas 5.4, 5.5 e 5.6). O emprego dos meios MM e AG no crescimento das amostras a 37° C não inibiu a expressão da reação de hemaglutinação positiva com eritrócitos de boi (Tabelas 5.4 e 5.6).

Tabela 5.3. Padrão de hemaglutinação em lâmina das amostras bacterianas cultivadas em meio CFA a 37° C.

Amostras bacterianas	Eritrócitos						
	boi	cav	car	cob^{Dm}	cob^{-}	gal	hum
Att25	+	-	+	-	-	-	-
54-5	+	-	+	-	-	-	-
2147-4	+	-	+	-	-	-	-
11a	+	-	+	+	+	-	-
31A	+	+	+	+	+	+	+
BZ43	+	-	+	+	+	-	-
BZ2468	+	-	+	+	+	-	-

Tabela 5.4. Padrão de hemaglutinação em lâmina das amostras bacterianas cultivadas em meio AG a 37° C.

Amostras bacterianas	Eritrócitos		
	boi	cav	car
Att25	+	-	+
54-5	+	-	+
2147-4	+	-	+
11a	+	-	-
31A	+	-	+
BZ43	+	-	+
BZ2468	+	-	-

Tabela 5.5. Padrão de hemaglutinação em lâmina das amostras bacterianas cultivadas em meio MINCA a 37° C.

Amostras Bacterianas	Eritrócitos		
	boi	cav	car
Att25	+	-	+
54-5	+	-	+
2147-4	+	-	+
11a	+	-	+
31A	+	-	+
BZ43	+	-	+
BZ2468	+	-	+

Tabela 5.6. Padrão de hemaglutinação em lâmina das amostras bacterianas cultivadas em meio MM a 37° C.

	Amostras bacterianas						
Eritrócitos	Att25	54-5	2147-4	11a	31A	BZ43	BZ2468
boi	+	+	+	+	+	+	+

5.1.3.2. Micro-hemaglutinação

Os resultados dos testes de micro-hemaglutinação das amostras bacterianas cultivadas em diferentes meios de cultura a 37° C e ensaiadas com eritrócitos de boi, segundo metodologia descrita no item 4.3.4, encontram-se na Tabela 5.7.

As amostras do grupo FY: 54-5 e 2147-4, apresentaram títulos de micro-hemaglutinação de 1:32 quando crescidas em CFA, 1:16 quando crescidas em AG e AG⁻ (ágar glicose base sem glicose) e 1:8 quando crescidas em MINCA. A amostra padrão Att25 apresentou título de 1:2 em CFA, 1:8 em AG, 1:4 em AG⁻ e 1:4 em MINCA.

As amostras do grupo 31A: BZ43, BZ2468 e 31A, incluindo 11a, apresentaram resultados diversos quando crescidas nos diferentes meios de cultura. Quando crescidas em CFA as amostras BZ43 e BZ2468 apresentaram título de micro-hemaglutinação de 1:16 e as amostras 11a e 31A, título de 1:32. Em AG e AG⁻ (ágar glicose base sem glicose) as amostras 11a e BZ43 apresentaram título de 1:16 e 1:16, a amostra 31A de 1:2 e 1:4 e a amostra BZ2468 de 1:4 e 1:2, respectivamente. Em MINCA as amostras 11a e BZ43 apresentaram títulos de 1:8, a amostra 31A de 1:4 e a amostra BZ2468 de 1:2.

Tabela 5.7. Padrão de micro-hemaglutinação D-manose resistente com eritrócitos de boi das amostras bacterianas cultivadas em meio CFA, AG, AG- e MINCA a 37° C.

Amostras bacterianas	Título de Micro-hemaglutinação			
	CFA	AG	AG-	MINCA
Att25	1:2	1:8	1:4	1:4
54-5	1:32	1:16	1:16	1:8
2147-4	1:32	1:16	1:16	1:8
11a	1:32	1:16	1:16	1:8
31A	1:32	1:2	1:4	1:4
BZ43	1:16	1:16	1:16	1:8
BZ2468	1:16	1:4	1:2	1:2

5.2. Caracterização Sorológica

Os resultados da caracterização sorológica das amostras, empregando-se antissoros policlonais absorvidos e não-absorvidos, preparados contra as amostras referência FY (Att25) e 31A (BZ43), de acordo com a metodologia descrita no item 4.6, encontram-se nas Tabela 5.8 e 5.9, para as amostras bacterianas crescidas a 37° C e a 16° C, respectivamente.

As amostras FY$^+$: Att25, 54-5 e 2147-4 crescidas a 37° C em meio CFA apresentaram aglutinação positiva com o antissoro anti-FY$^+$, produzido a partir da amostra Att25, nas reações empregando o antissoro não-diluído, diluído 1:1000 e absorvido com a amostra Att25 crescida a 16° C na diluição 1:100. As mesmas amostras bacterianas não apresentaram aglutinação com o antissoro nas condições acima citadas quando crescidas a 16° C em meio CFA, com exceção da amostra Att25, que apresentou reação positiva com o antissoro não-diluído.

Empregando-se o antissoro anti-31A, produzido a partir da amostra BZ43, as amostras Att25, 54-5 e 2147-4 apresentaram uma reação de aglutinação fraca com o antissoro não-diluído nos testes empregando as amostras crescidas a 37° C em meio CFA. Apenas a amostra 54-5 continuou apresentando uma reação positiva com o antissoro não-diluído quando crescida a 16° C em meio CFA.

A amostra 11a, crescida tanto a 37° C como a 16° C em meio CFA, apresentou reação de aglutinação positiva com o antissoro anti-FY$^+$, produzido a partir da amostra Att25, nas reações empregando o antissoro não-diluído e diluído 1:1000. Contudo, a reação foi negativa quando se empregou o antissoro absorvido com a amostra Att25 crescida a 16° C na diluição 1:100.

Nos testes de aglutinação da amostra 11a, crescida tanto a 37° C como a 16° C em meio CFA, com o antissoro anti-31A, apenas a reação com o antissoro anti-31A absorvido com a amostra BZ43xp4 crescida a 37° C na diluição 1:100 foi negativa.

As amostras 31A$^+$: 31A, BZ43 e BZ2468, crescidas tanto a 37° C como a 16° C, apresentaram reação de aglutinação negativa com o antissoro anti-FY não-diluído, diluído 1:1000 e absorvido com a amostra Att25 crescida a 16° C na diluição 1:100.

Nos testes destas amostras com antissoro anti-31A, produzido com a amostra BZ43, ocorreu aglutinação positiva de 31A, BZ43 e BZ2468, com o emprego do antissoro não-diluído e diluído 1:1000 nos testes com incubação a 37° C. O resultado dos testes com os mesmos antissoros foi positivo para as amostras 31A e BZ43 crescidas a 16° C, porém a amostra BZ2468 apresentou reação fraca com o antissoro não-diluído e negativa com o antissoro diluído 1:1000. O emprego do antissoro anti-31A, absorvido com a amostra BZ43xp4 crescida a 37° C na diluição 1:100, resultou em reação de

aglutinação negativa para as amostras incubadas tanto a 37° C como a 16° C.

A amostra receptora MS101, crescida tanto a 37° C como a 16° C, apresentou reação de aglutinação negativa quando testada com os antissoros anti-31A e anti-FY em todas as condições ensaiadas.

Os resultados de aglutinação das amostras mutantes BZ43xp4 e BZ43xp6 com o antissoro anti-31A encontram-se na Tabela 5.10. As amostras BZ43xp4 e BZ43xp6, mutagenizadas com o transposon TnphoA, que perderam a capacidade de hemaglutinação de eritrócitos bovinos, apresentaram reação de aglutinação positiva com o antissoro anti-31A não-diluído e negativa com o mesmo antissoro diluído 1:1000.

Tabela 5.8. Reação de aglutinação das amostras bacterianas crescidas em meio CFA a 37° C com os antissoros policlonais a-31A⁺ e a-FY⁺ absorvidos e não-absorvidos.

Antissoros	Att25	54-5	2147-4	11a	31A	BZ43	BZ2468	MS101
a-31A⁺ n-abs. s/d	f	f	f	+	+	+	+	-
a-31A⁺ n-abs. 1:1000	-	-	-	+	+	+	+	-
a-31A⁺ abs. BZ43(16°C) 1:100	-	-	-	+	+	+	+	-
a-31A⁺ abs. BZ43xp4(37°C) 1:100	-	-	-	-	-	-	-	-
a-FY⁺ n-abs. s/d	+	+	+	+	-	-	-	-
a-FY⁺ n-abs. 1:1000	+	+	+	+	-	-	-	-
a-FY⁺ abs. Att25(16°C) 1:100	+	+	+	-	-	-	-	-

f = reação fraca
s/d = sem diluição
abs = absorvido
n-abs = não-absorvido

Tabela 5.9. Reação de aglutinação das amostras bacterianas crescidas em meio CFA a 16° C com os antissoros policlonais a-31A⁺ e a-FY⁺ absorvidos e não-absorvidos.

Antissoros	Att25	54-5	2147-4	11a	31A	BZ43	BZ2468	MS101
a-31A⁺ n-abs. s/d	-	-	-	+	+	+	f	-
a-31A⁺ n-abs. 1:1000	-	-	-	+	+	+	-	-
a-31A⁺ abs. BZ43(16°C) 1:100	-	-	-	-	-	-	-	-
a-31A⁺ abs. BZ43xp4(37°C) 1:100	-	-	-	-	-	-	-	-
a-FY⁺ n-abs. s/d	+	-	-	+	-	-	-	-
a-FY⁺ n-abs. 1:1000	-	-	-	+	-	-	-	-
a-FY⁺ abs. Att25(16°C) 1:100	-	-	-	-	-	-	-	-

f = reação fraca
s/d = sem diluição
abs = absorvido
n-abs = não-absorvido

Tabela 5.10. Reação de aglutinação das amostras bacterianas mutantes BZ43xp4 e BZ43xp6 crescidas em meio CFA a 37° C com antissoro policlonais a-31A+, não-absorvidos e absorvidos.

Antissoros	BZ43	BZ43xp4	BZ43xp6
a-31A+ n-abs. s/d	+	+	+
a-31A+ n-abs. 1:1000	+	+	+
a-31A+ abs. BZ43(16°C) 1:100	+	+	+
a-31A+ abs. BZ43xp4(37°) 1:100	-	-	-

s/d = sem diluição
abs = absorvido
n-abs = não-absorvido

5.3. Visualização de Fímbrias Através de Microscopia Eletrônica de Transmissão

As micrografias eletrônicas das amostras bacterianas FY$^+$ e 31A$^+$, preparadas segundo a metodologia descrita no item 4.4, encontram-se nas figuras 5.1 a 5.7.

Verificou-se nas micrografias eletrônicas das amostras Att25, 54-5 e 2147-4 crescidas a 37° C a presença de estruturas semelhantes a fímbrias e flagelos (Figuras 5.1a, 5.2a e 5.3a). Quando crescidas a 18° C, a amostra Att25 apresenta apenas a expressão de estruturas semelhantes a flagelos (figura 5.1b) e as amostras 54-5 e 2147-4 apresentam-se completamente desprovidas de filamentos na superfície bacteriana (figuras 5.2b e 5.3b).

As micrografias eletrônicas das amostras 11a, 31A, BZ2468 e BZ43 crescidas a 37° C apresentaram estruturas semelhantes a fímbrias e flagelos (Figuras 5.4a, 5.5a, 5.6a e 5.7a). As amostras BZ2468 e BZ43 crescidas a 16° C não apresentaram estruturas semelhantes a fímbrias, porém apresentaram a expressão de flagelos, conforme pode ser verificado nas figuras 5.6b a 5.7b. A amostra 31A crescida a 16° C apresentou-se completamente desprovida de filamentos na superfície bacteriana (Figura 5.5b). A amostra 11a apresentou a expressão de flagelos e estruturas semelhantes a fímbrias quando crescida a 16° C (figura 5.4b.)

As amostras mutantes BZ43xp4 e BZ43xp6, que perderam a capacidade de hemaglutinação de eritrócitos de boi, apresentaram diferenças quanto à visualização de fímbrias ao microscópio eletrônico. A amostra BZ43xp4 não apresentou a expressão de fímbrias quando crescida a 37° C em meio CFA (Figura 5.8a). Contudo, a amostra BZ43xp6 apresentou a expressão de fímbrias quando crescida nas mesmas condições (Figura 5.8b).

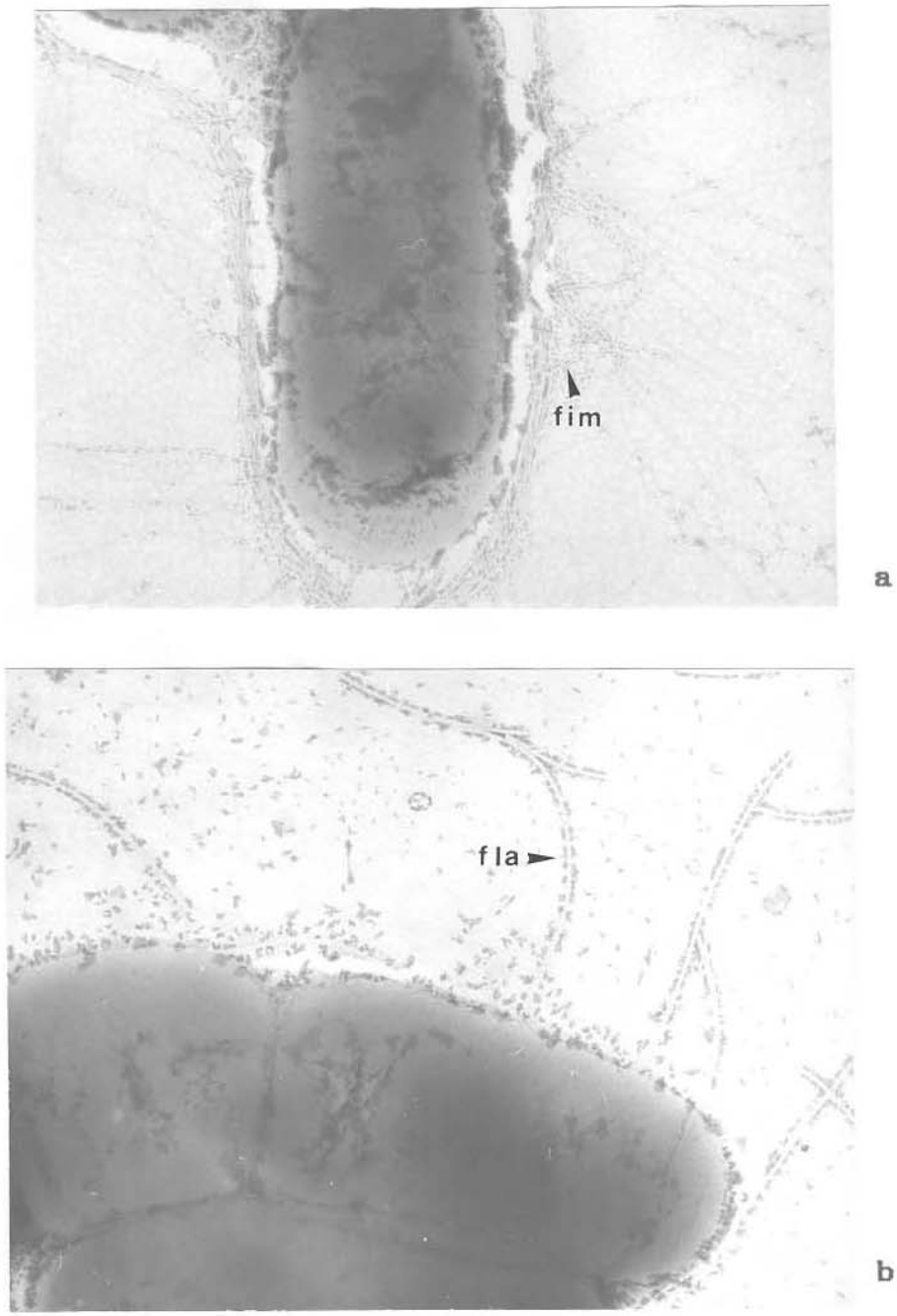


Figura 5.1. Micrografia eletrônica da amostra de *Escherichia coli* Att25 crescida a 37° C (a) e a 16° C (b), em coloração negativa com PTA.
Aumentos = 39.120 X e 44.988 X, respectivamente.

fim = fímbria

fla = flagelo

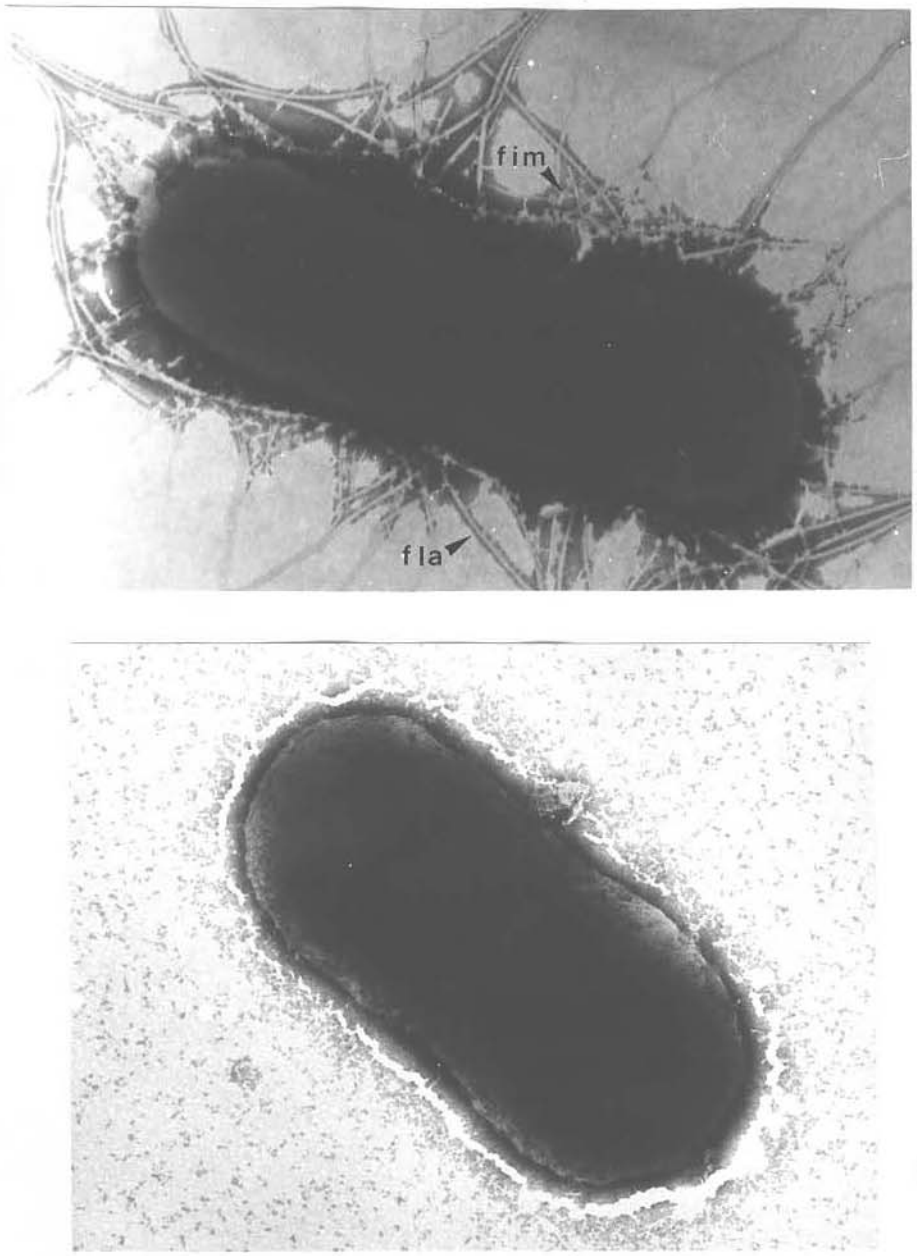


Figura 5.2. Micrografia eletrônica da amostra de *Escherichia coli* 54-5 crescida a 37° C (a) e a 16° C (b), em coloração negativa com PTA.

Aumentos = 37.164 X e 44.010 X, respectivamente.

fim = fímbria

fla = flagelo

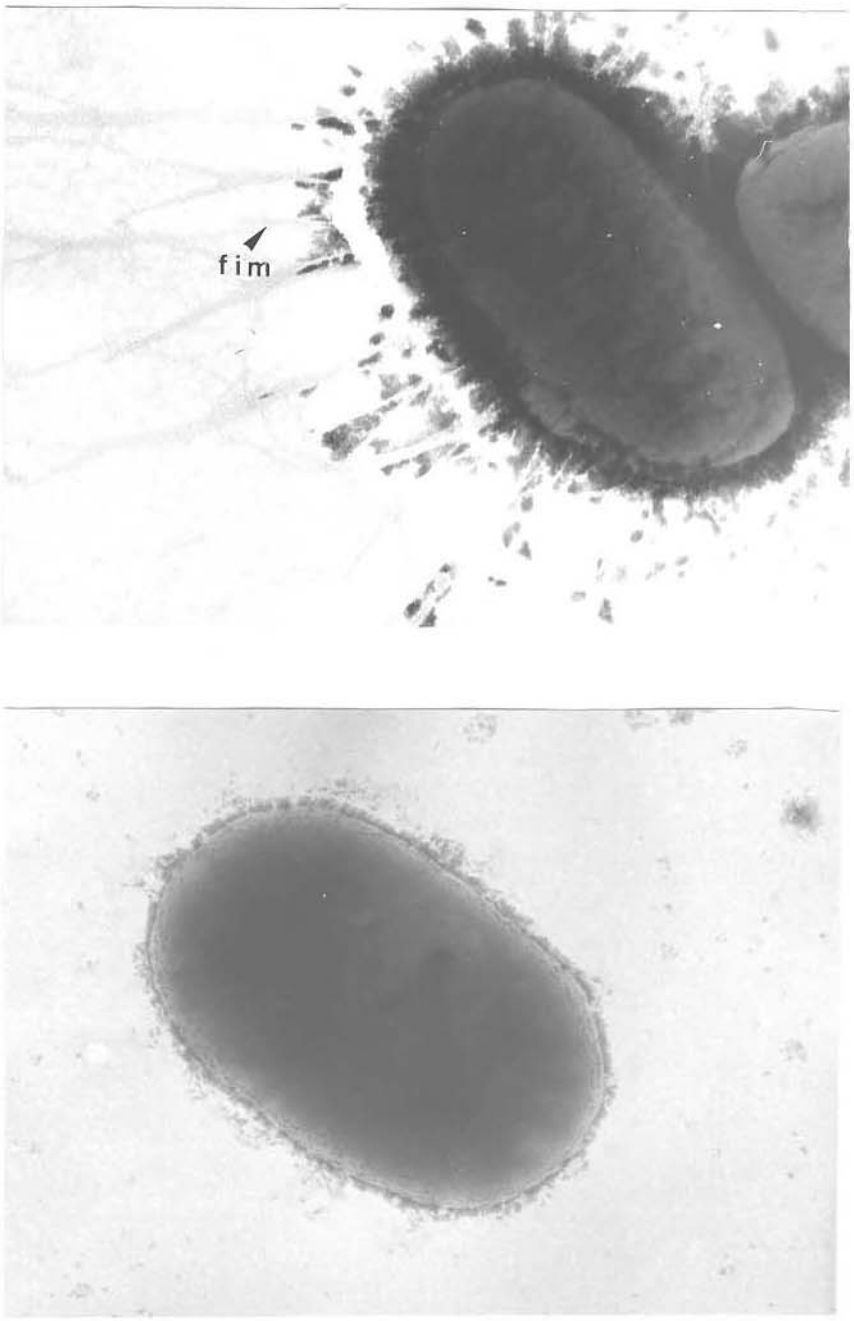


Figura 5.3. Micrografia eletrônica da amostra de *Escherichia coli* 2147-4 crescida a 37° C (a) e a 16° C (b), em coloração negativa com PTA.
Aumentos = 44.010 X e 47.922 X, respectivamente.
fim = fímbria

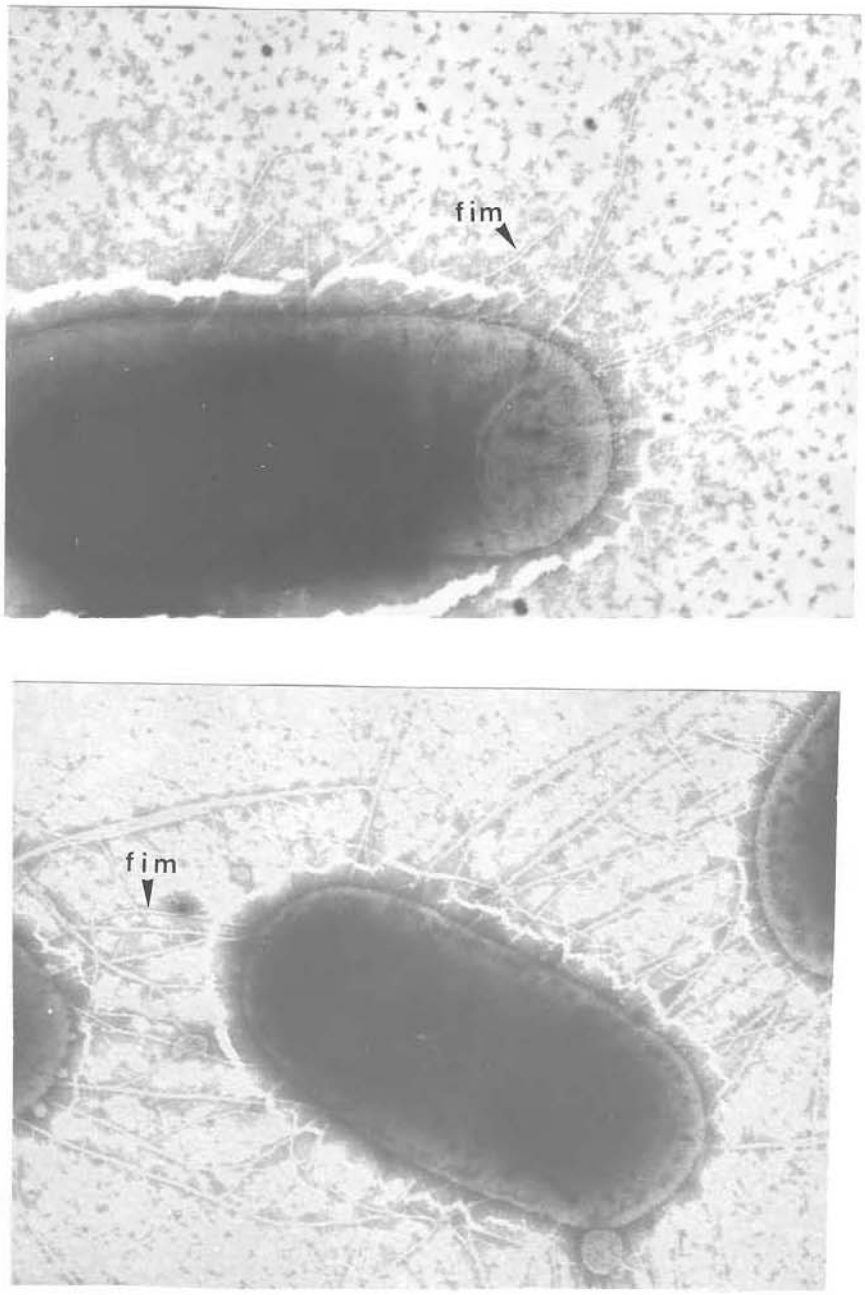
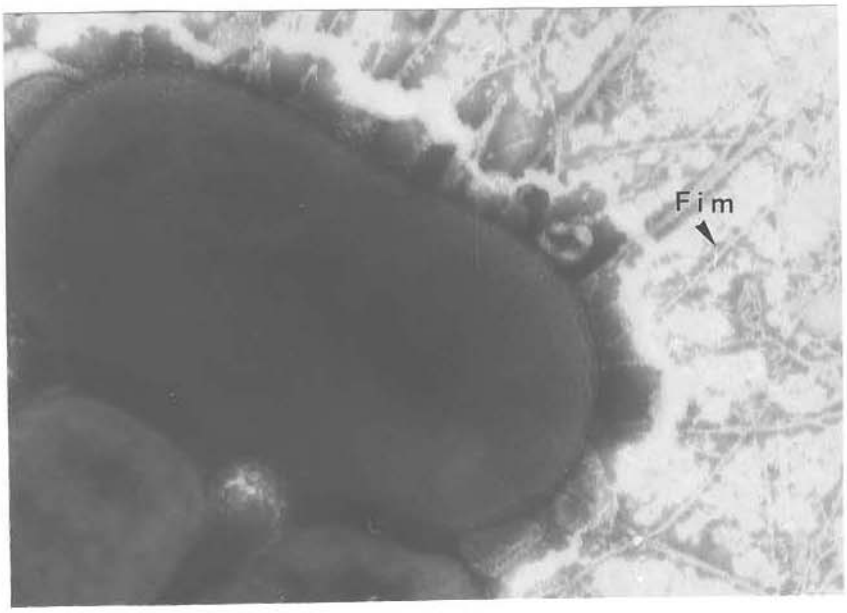
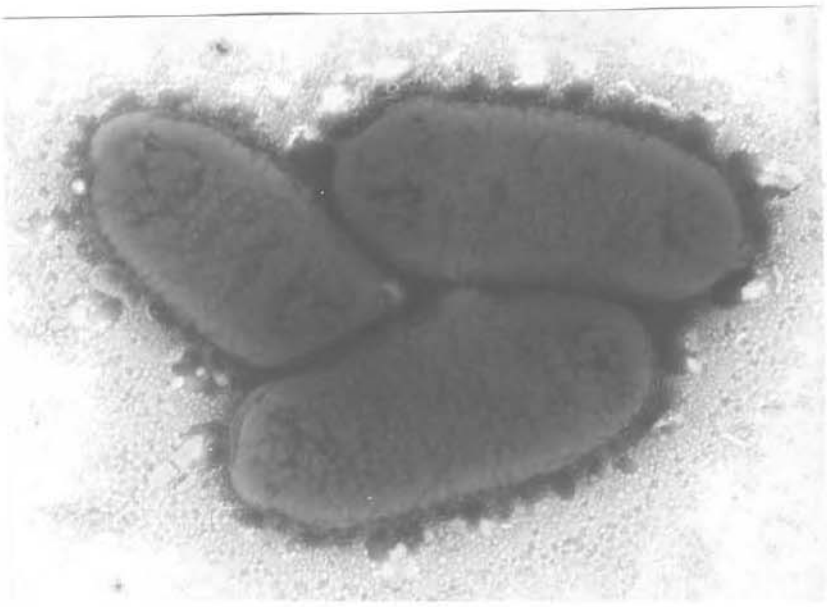


Figura 5.4. Micrografia eletrônica da amostra de *Escherichia coli* 11a crescida a 37° C (a) e a 16° C (b), em coloração negativa com PTA.
Aumentos = 39.120 X e 36.080 X, respectivamente.
fim = fímbria



a



b

Figura 5.5. Micrografia eletrônica da amostra de *Escherichia coli* 31A crescida a 37° C (a) e a 16° C (b), em coloração negativa com PTA.
Aumentos = 58.900 X e 33.252 X, respectivamente.
fim = fímbria

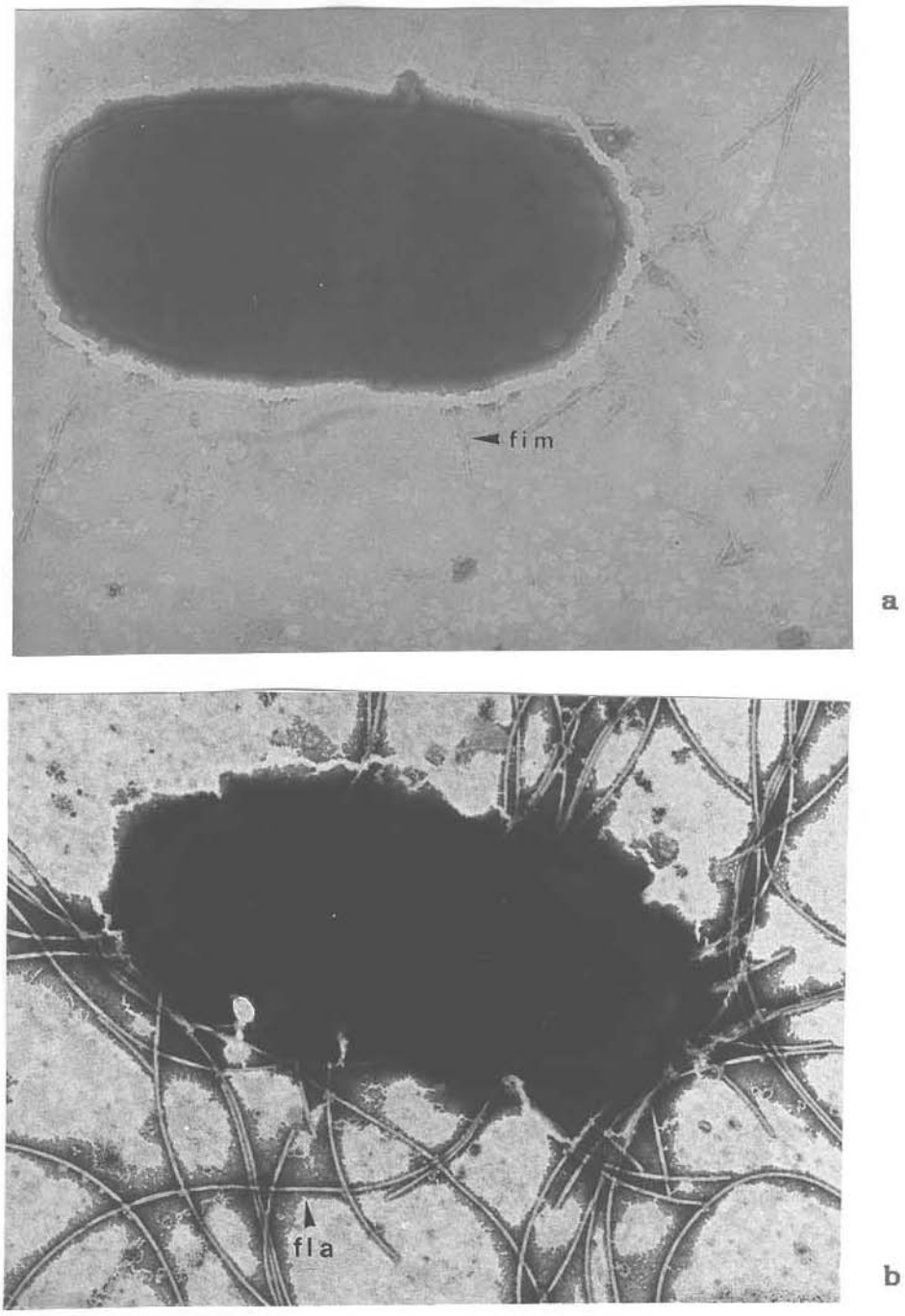


Figura 5.6. Micrografia eletrônica da amostra de *Escherichia coli* BZ2468 crescida a 37° C (a) e a 16° C (b), em coloração negativa com PTA.
Aumentos = 44.010 X e 39.120 X, respectivamente.

fim = fímbria

fla = flagelo

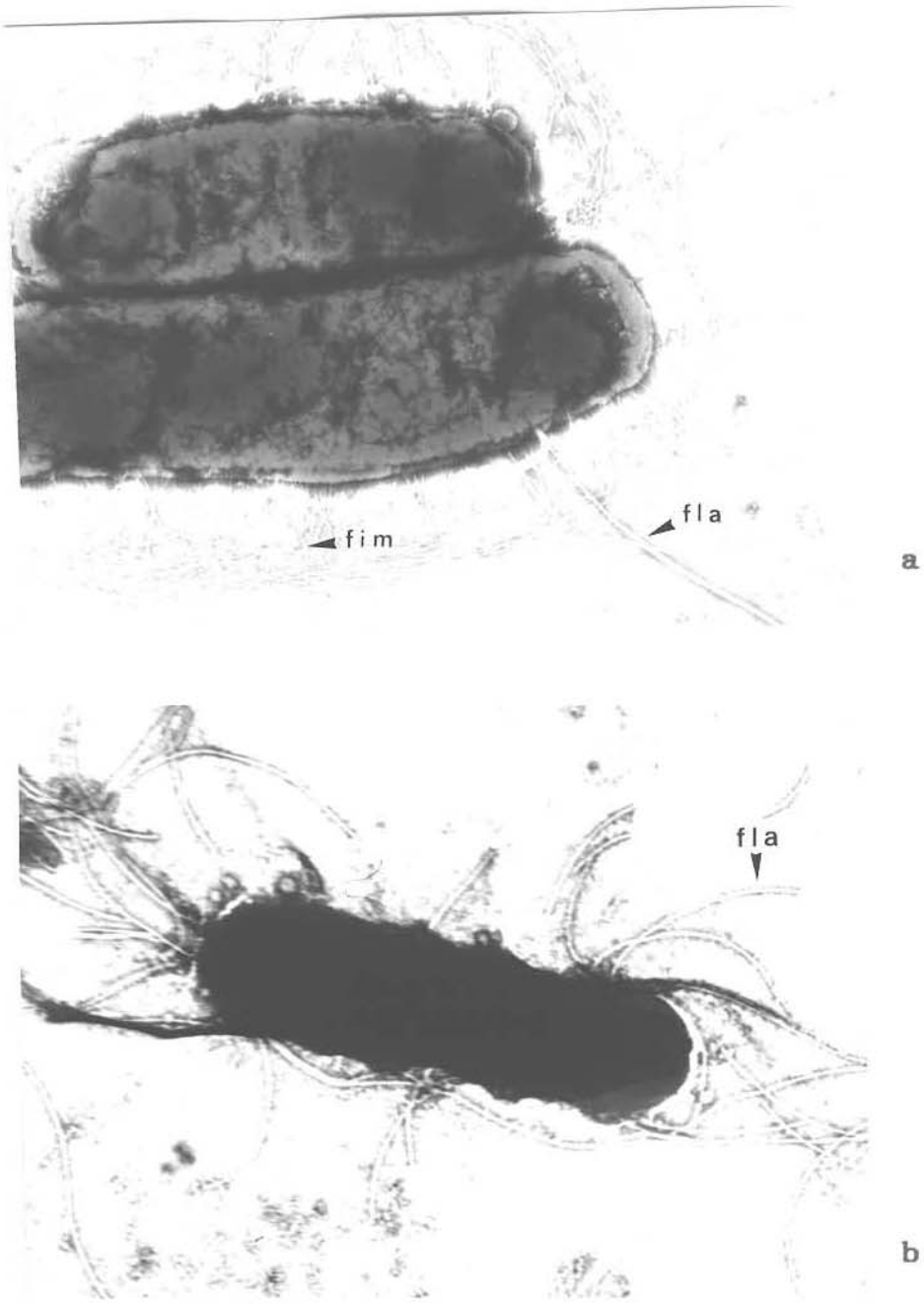
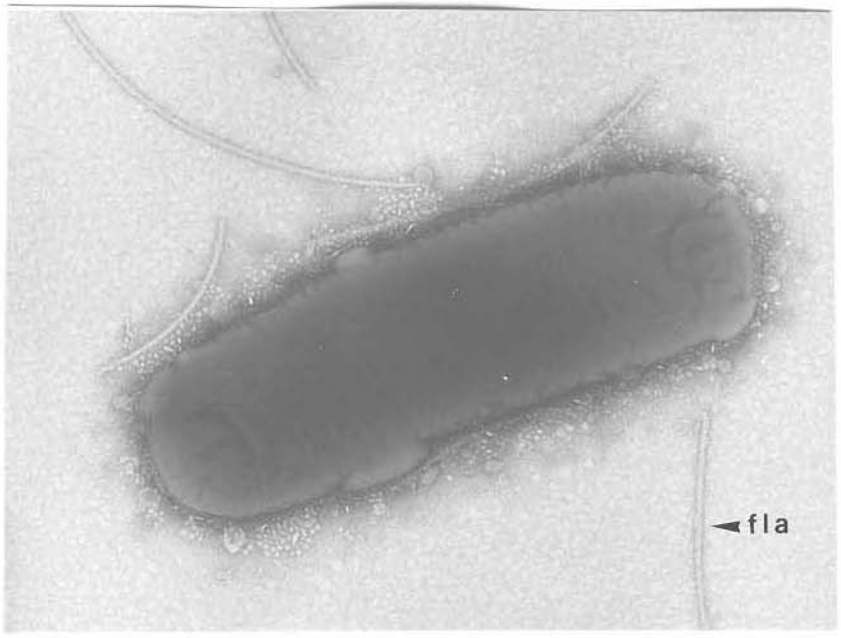


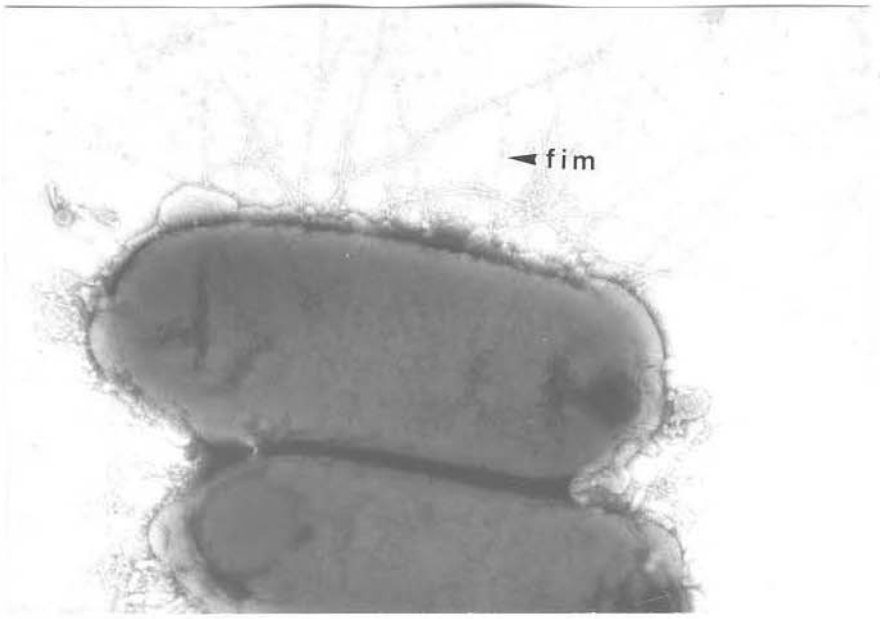
Figura 5.7. Micrografia eletrônica da amostra de *Escherichia coli* BZ43 crescida a 37° C (a) e a 16° C (b), em coloração negativa com PTA.
Aumentos = 28.362 X e 24.450 X, respectivamente.

fim = fímbria

fla = flagelo



a



b

Figura 5.8. Micrografia eletrônica das amostras mutantes de *Escherichia coli* BZ43xp4 (a) e BZ43xp6 (b), mutagenizadas com TnphoA, crescidas a 37° C, em coloração negativa com PTA.
Aumentos = 39.120 X e 40.098 X, respectivamente.

fim = fímbria

fla = flagelo

5.4. Caracterização Eletroforética das Amostras Bacterianas

5.4.1. Padrão Eletroforético de Proteínas de Superfície

Os resultados obtidos através da eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS da extração de proteínas de superfície, segundo metodologia descrita no item 4.8.2, encontram-se nas Figuras 5.9 (amostras FY^+, incluindo 11a), 5.10 (amostras $31A^+$), 5.11 (amostras FY^+) e 5.12 (amostras $31A^+$, incluindo 11a).

As amostras Att25, 54-5 e 2147-4 apresentaram uma banda proteica com peso molecular de aproximadamente 20 kD correspondente à fímbria FY, a qual pode ser visualizada nas extrações de proteína de superfície das amostras crescidas a 37° C, porém não se apresentou nas extrações das amostras crescidas a 16° C (Figuras 5.9 e 5.11), nem na extração de proteína de superfície da amostra 11a crescida a 37° C.

As amostras 31A, BZ43 e BZ2468 apresentaram uma banda proteica com peso molecular de aproximadamente 17 kD, a qual deve corresponder à subunidade da fímbria 31A, e que pode ser visualizada nas extrações de proteína de superfície das amostras crescidas a 37° C, porém não se apresentou nas extrações das amostras crescidas a 16° C (Figuras 5.10 e 5.12).

A amostra 11a apresentou uma banda proteica com peso molecular de aproximadamente 17 kD que pode corresponder à subunidade da fímbria 31A, a qual pode ser visualizada nas extrações de proteína de superfície das amostras crescidas a 37° C, porém não se apresentou nas extrações das amostras crescidas a 16° C (Figuras 5.9 e 5.12). Esta amostra não apresentou uma banda de proteína correspondente à subunidade da fímbria FY, conforme pode ser verificado na extração de proteína da amostra crescida a 37° C (Figura 5.9).

A banda correspondente à subunidade da fímbria K99 foi determinada por comparação do perfil de proteína de superfície da amostra 11a com uma preparação purificada da fímbria K99 (Figura 5.13). A banda correspondente a esta fímbria no gel foi localizada logo acima da posição da banda correspondente à fímbria 31A. Não foi possível a determinação da posição da subunidade da fímbria F41 nesta amostra, uma vez que não se detectou a banda correspondente à subunidade da fímbria na preparação empregada (Figura 5.13).

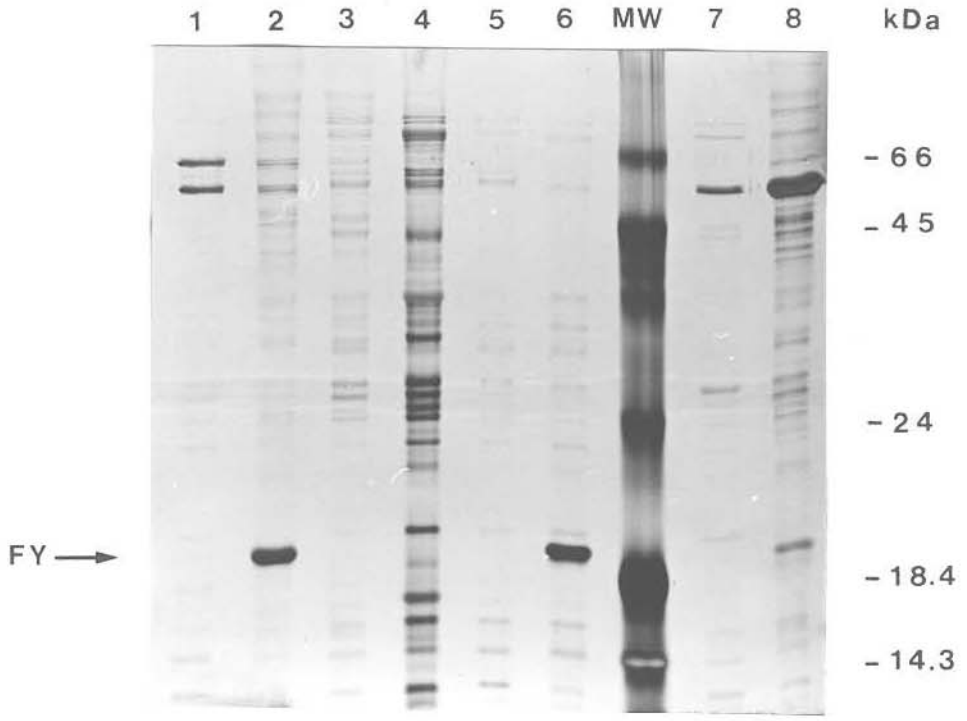


Figura 5.9. Perfil eletroforético de proteínas de superfície das amostras FY+ (incluindo amostra 11a) em PAGE (12,5%), coradas com prata.

1: 2147-4 (16° C - 60S)
2: 2147-4 (37° C - SH)
3: 11a (16° C - 60S)
4: 11a (37° C - 60S)
5: Att25 (16° C - 60S)
6: Att25 (37° C - 60S)
7: 54-5 (16° C - SH)
8: 54-5 (37° C - 60S)
MW = padrão de peso molecular (kDa)

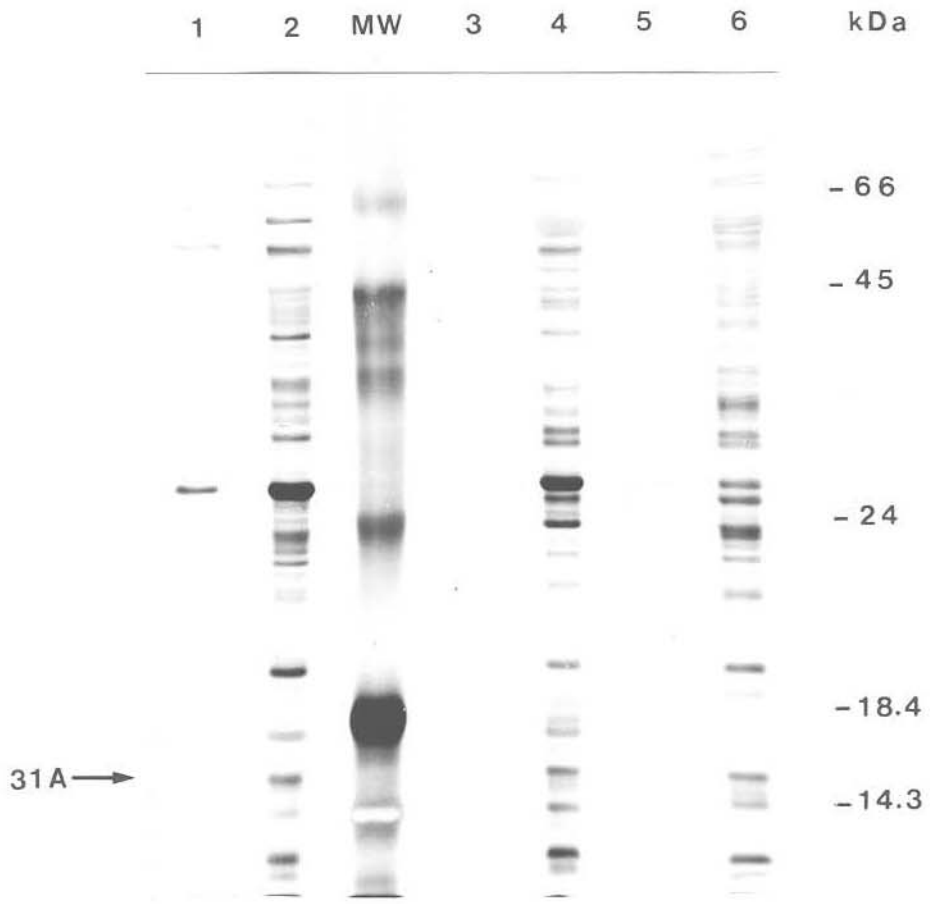


Figura 5.10. Perfil eletroforético de proteínas de superfície das amostras 31A+ em PAGE (12,5%), coradas com prata.

1: BZ2468 (16° C - 60S)
2: BZ2468 (37° C - 60S)
3: BZ43 (16° C - 60S)
4: BZ43 (37° C - 60S)
5: 31A (16° C - 60S)
6: 31A (37° C - 60S)

MW = padrão de peso molecular (kDa)

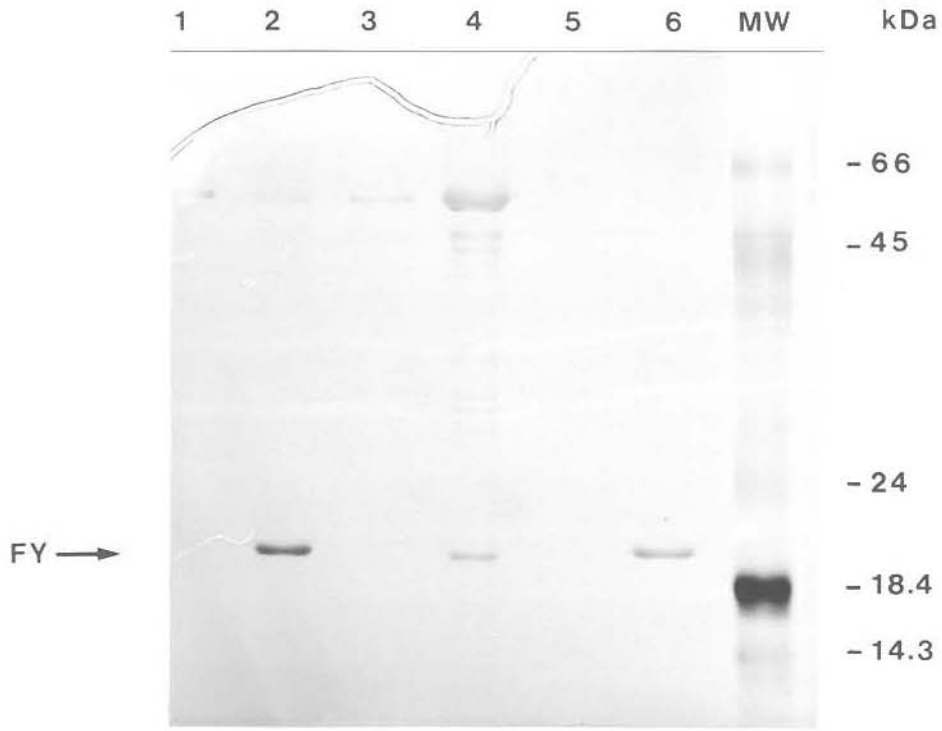


Figura 5.11. Perfil eletroforético de proteínas de superfície das amostras FY+ em PAGE (12,5%), coradas com prata.

1: 2147-4 (16° C - SH)
2: 2147-4 (37° C - 60S)
3: 54-5 (16° C - 60S)
4: 54-5 (37° C - SH)
5: Att25 (16° C - 60S)
6: Att25 (37° C - 60S)
MW = padrão de peso molecular (kDa)

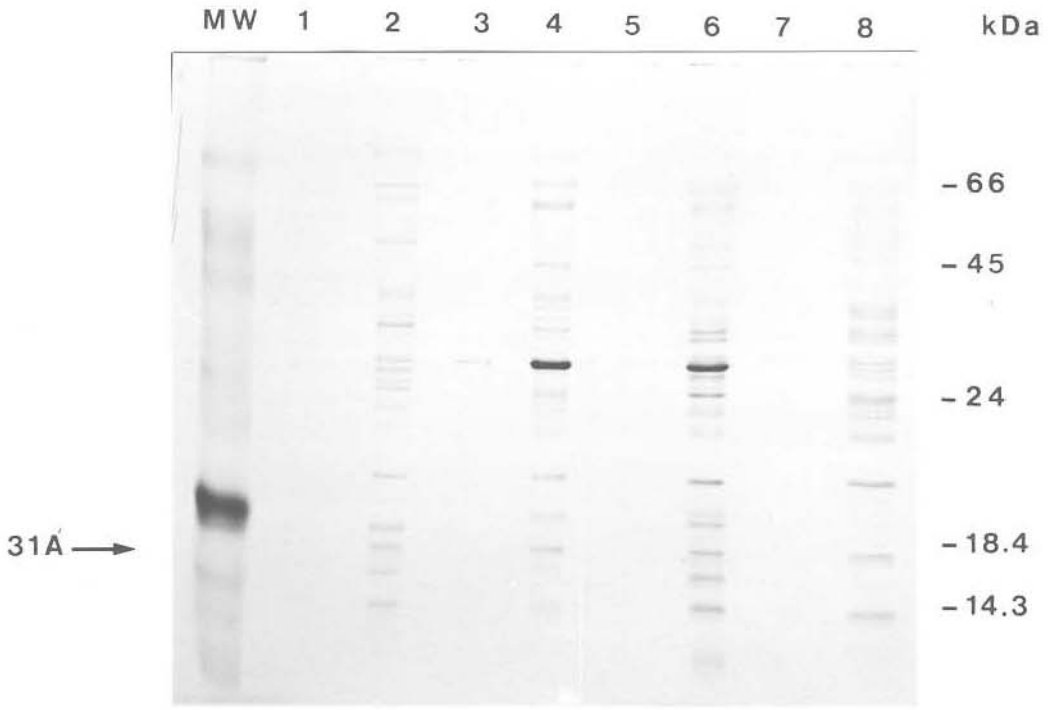


Figura 5.12. Perfil eletroforético de proteínas de superfície das amostras 31A+ (incluindo amostra 11a) em PAGE (12,5%), coradas com prata.

1: 11a (16° C - 60S)
2: 11a (37° C - 60S)
3: BZ2468 (16° C - 60S)
4: BZ2468 (37° C - 60S)
5: BZ43 (16° C - 60S)
6: BZ43 (37° C - 60S)
7: 31A (16° C - 60S)
8: 31A (37° C - 60S)

MW = padrão de peso molecular (kDa)

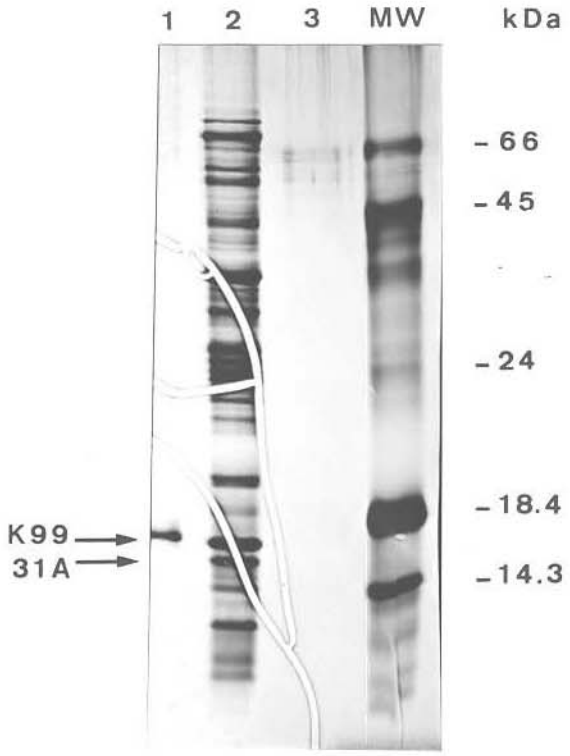


Figura 5.13. Perfil eletroforético de proteínas de superfície da amostras 11a e fímbrias K99 e F41 purificadas, em PAGE (12,5%), coradas com prata.

1: K99

2: 11a (37° C - 60S)

3: F41

MW = padrão de peso molecular (kDa)

As amostras mutantes BZ43xp4 e BZ43xp6 apresentaram um padrão de proteínas de superfície alterado em relação à amostra selvagem BZ43 em gel de eletroforese corado com prata. Estas amostras apresentaram a ausência de uma banda de proteína correspondente à subunidade da fímbria 31A quando incubadas a 37° C. A banda ausente nestas amostras foi nitidamente visualizada nas preparações de proteína de superfície e proteína total da amostra BZ43 (Figura 5.14).

Nas preparações de proteína total das amostras mutantes e da amostra parental BZ43 não pode ser visualizada nenhuma diferença no padrão de bandas das amostras mutantes em relação ao padrão da amostra parental (Figura 5.15).

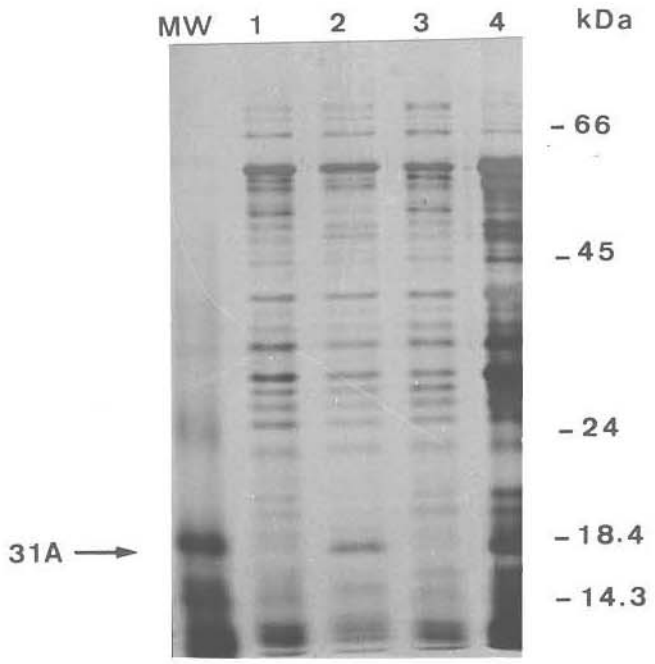


Figura 5.14. Perfil eletroforético de proteínas de superfície das amostras mutantes BZ43xp4 e BZ43xp6 em relação ao perfil da amostra BZ43, em PAGE (12,5%), coradas com prata.

1: BZ43xp4 (37°C - 60S) 3: BZ43xp6 (37°C - 60S)

2: BZ43 (37°C - 60S) 4: BZ43 (37°C - PT)

MW = padrão de peso molecular (kDa)

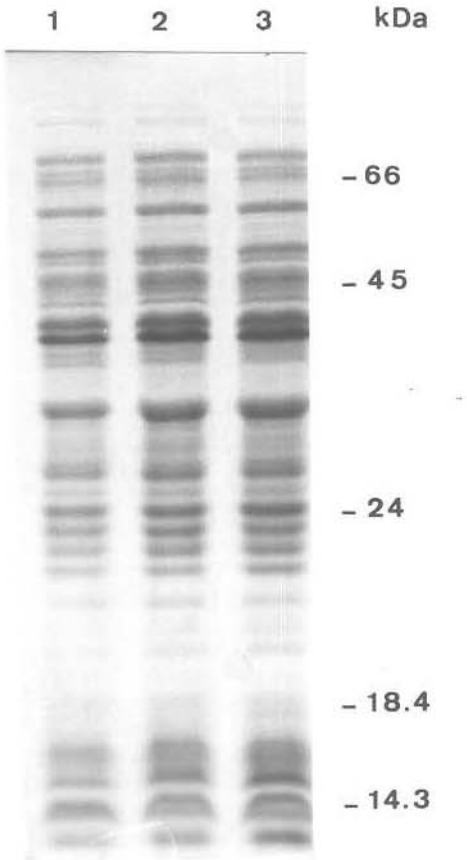


Figura 5.15. Perfil eletroforético de proteínas de totais das amostras mutantes BZ43xp4 e BZ43xp6 em relação ao perfil da amostra BZ43, em PAGE (12,5%), coradas com Coomassie Blue.

1: BZ43xp4 (37°C)

2: BZ43 (37°C)

3: BZ43xp6 (37°C)

5.4.2. Padrão Eletroforético de Proteínas de Membrana

O padrão eletroforético de proteínas de membrana das amostras bacterianas crescidas a 37° C, segundo a metodologia descrita no item 4.8.3, apresenta-se na figura 5.16.

Todas as amostras bacterianas apresentaram um padrão de proteínas de baixo peso molecular (abaixo de 24 kDa) semelhante.

As amostras Att25, 54-5 e 2147-4 (FY^+) (Figura 5.16, canaletas 1, 2 e 3) apresentaram padrão de bandas de proteína diferentes na faixa de peso molecular entre 30 e 40 kDa.

As amostras 31A e BZ2468 ($31A^+$) (Figura 5.16, canaletas 5 e 6) apresentaram um padrão de bandas de proteína semelhante, diferindo do padrão das demais amostras $31A^+$ (11a e BZ43; canaletas 4 e 7) e do padrão das amostras FY^+ (Att25, 54-5 e 2147-4; canaletas 1, 2 e 3).

O padrão de bandas da amostra BZ43 foi semelhante ao padrão apresentado pela amostra Att25 (Figura 5.16, canaletas 7 e 1).

No padrão de bandas da amostra mutante BZ43xp4 (não-hemaglutinante e não-fimbriada) (Figura 5.16, canaleta 8) foi detectada a ausência de uma banda de aproximadamente 35 kDa, a qual pode ser nitidamente visualizada nas amostras BZ43 e BZ43xp6 (canaletas 7 e 9).

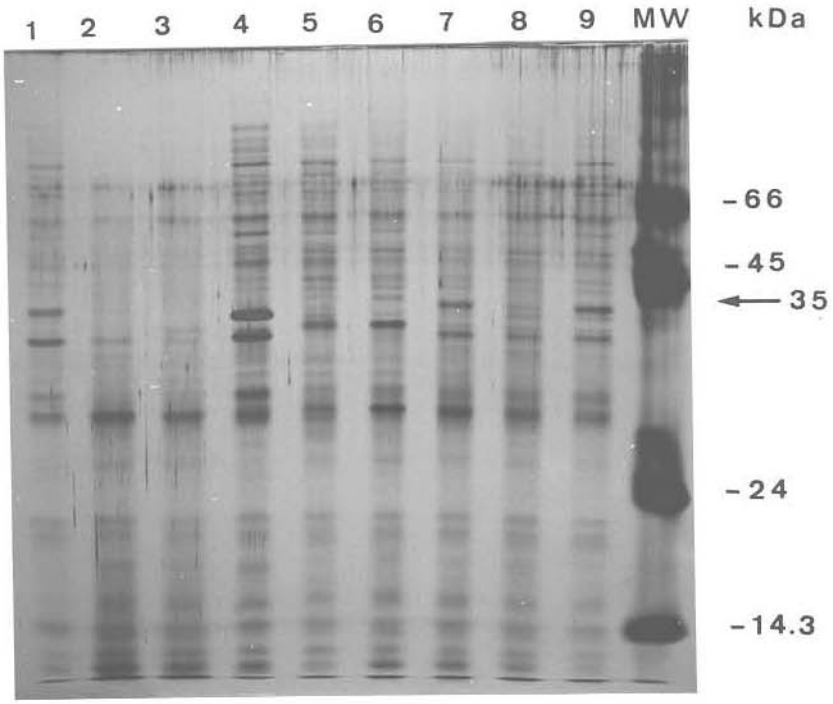


Figura 5.16. Perfil eletroforético de proteínas de membrana das amostras 31A+, FY+ e dos mutantes BZ43xp4 e BZ43xp6, em PAGE (12,5%), coradas com prata.

1: Att25	4: 11a	7: BZ43
2: 54-5	5: 31A	8: BZ43xp4
3: 2147-4	6: BZ2468	9: BZ43xp6

MW = padrão de peso molecular (kDa)

5.4.3. Perfil de DNA Plasmidial

Os resultados obtidos através da eletroforese em gel de agarose da extração de DNA plasmidial das amostras bacterianas, segundo metodologia descrita no item 4.7, encontram-se nas figuras 5.17 (amostras FY^+, incluindo 11a) e 5.18 (amostras $31A^+$).

As amostras 2147-4 (FY^+) e BZ43 ($31A^+$) não apresentaram plasmídios.

A amostra 11a apresentou 2 plasmídios de alto peso molecular, muito próximos, com aproximadamente 54 e 50 MDa. A amostra Att25 apresentou 2 plasmídios de alto peso molecular, com 86 e 54 MDa, e um de baixo peso molecular, com 3,3 MDa. A amostra 54-5 apresentou um plasmídio de alto peso molecular, com aproximadamente 25 MDa, localizado logo acima da banda de DNA cromossômico (Figura 5.17).

A amostra 31A apresentou um plasmídio de alto peso molecular, com 86 MDa, e a amostra BZ2468 apresentou 3 plasmídios de alto peso molecular, com 60, 54 e 35 MDa (Figura 5.18).

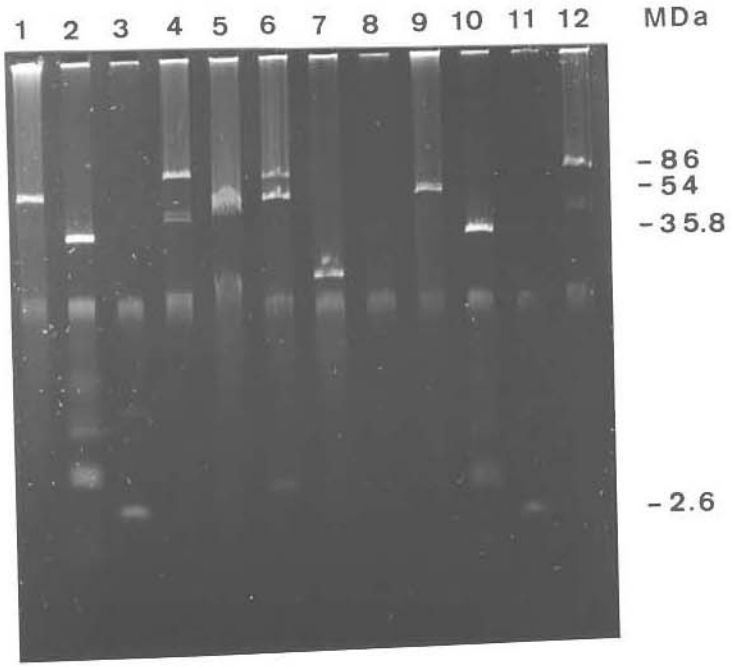


Figura 5.17. Perfil eletroforético de DNA plasmidial das amostras FY+ (incluindo 11a) em gel de agarose (0,6%).

1: p307	5: 11a	9: p307
2: V517	6: Att25	10: V517
3: pBR322	7: 54-5	11: pBR322
4: pRA1	8: 2147-4	12: pRA1

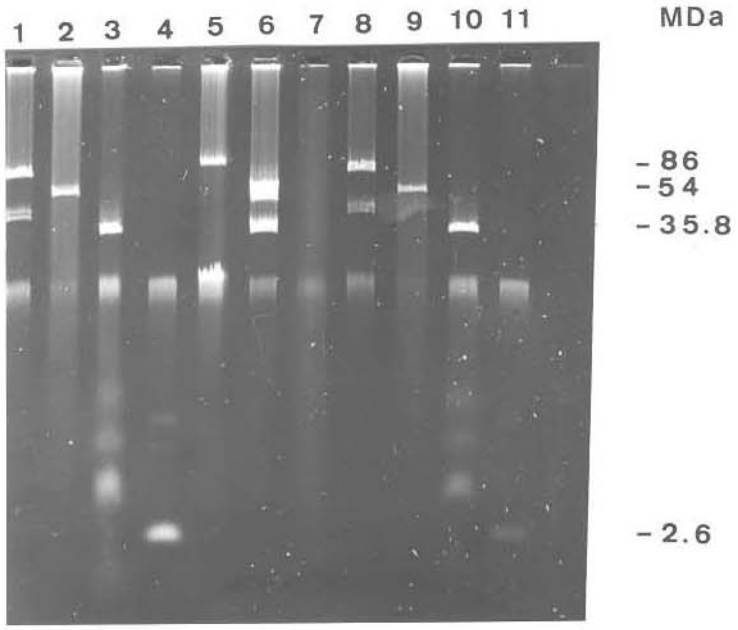


Figura 5.18. Perfil eletroforético de DNA plasmidial das amostras 31A+ em gel de agarose (0,6%).

1: pRA1	5: 31A	8: pRA1
2: p307	6: BZ2468	9: p307
3: V517	7: BZ43	10: V517
4: pPB322		11: pBR322

5.5. Análises Genéticas por Conjugação

5.5.1. Transconjugantes Obtidos com a Amostra MS101

A conjugação das amostras Att25 (FY^+), 31A e BZ2468 ($31A^+$) com a amostra receptora MS101, segundo a metodologia descrita no item 4.10, resultou na obtenção de transconjugantes selecionados para marcadores de resistência a antibióticos das amostras parentais.

A conjugação da amostra Att25 resultou na obtenção de transconjugantes resistentes a Ap (100), Km (100) e Tc (5). Não foram obtidos transconjugantes resistentes a Sm nem ao conjunto dos antibióticos (Ap, Tc, Km e Sm) (Tabela 5.11).

A amostra 31A resultou na obtenção de transconjugantes resistentes a Cm (16). Não foram obtidos transconjugantes resistentes a Tc, Km ou Sm, separadamente, e nem ao conjunto destes antibióticos (Tabela 5.12).

A conjugação da amostra BZ2468 resultou na obtenção de transconjugantes resistentes a Ap (5), Tc (48), Km (5), Sm (5) e Cm (39). Contudo, não foram obtidos transconjugantes resistentes ao conjunto destes antibióticos (Ap, Tc, Km, Cm e Sm) (Tabela 5.13).

Tabela 5.11. Fenótipos dos transconjugantes Att25 x MS101 selecionados em meio LB com antibióticos.

Antibióticos	Transconjugantes isolados
Ap	100
Km	100
Tc	5
Sm	0
Ap Tc Km Sm	0

Tabela 5.12. Fenótipos dos transconjugantes 31A x MS101 selecionados em meio LB com antibióticos.

Antibióticos	Transconjugantes isolados
Cm	16
Tc	0
Km	0
Sm	0
Cm Km Sm Tc	0

Tabela 5.13. Fenótipos dos transconjugantes BZ2468 x MS101 selecionados em meio LB com antibióticos.

Antibióticos	Transconjugantes isolados
Ap	5
Tc	48
Km	5
Cm	39
Sm	5
Ap Tc Km Cm Sm	0

5.5.2. Análise de Hemaglutinação dos Transconjugantes

Todos os transconjugantes obtidos da conjugação das amostras Att25, 31A e BZ2468 com a amostra receptora MS101 apresentaram hemaglutinação negativa quando ensaiados com eritrócitos de boi, segundo a metodologia descrita no item 4.3.3, e aglutinação negativa com antissoro anti-31A ou anti-FY, segundo a metodologia descrita no item 4.6.2.

5.5.3. Análise Plasmidial dos Transconjugantes

Os transconjugantes obtidos da conjugação das amostras 31A e BZ2468 com a amostra receptora MS101, analisados através de eletroforese em gel de agarose segundo o item 4.7, apresentaram um ou mais plasmídios originários da amostra doadora, o que permitiu a localização das marcas de resistência a antibióticos em diferentes plasmídios.

O resultado da análise eletroforética dos transconjugantes 31A x MS101 (resultado não apresentado) mostrou a ocorrência de amostras portadoras do plasmídio de 86 MDa, o qual foi associado à codificação de resistência a cloranfenicol.

A análise eletroforética dos transconjugantes BZ2468 x MS101 (resultado não apresentado) mostrou a ocorrência de amostras portadoras dos plasmídios de 60, 54 e 35 MDa, isoladamente ou em combinações de mais de um plasmídio em uma mesma amostra. Não foi verificada a

ocorrência de nenhuma amostra portadora de todos os plasmídios e resistente a todos os antibióticos da amostra parental. Ao plasmídio de 60 MDa foi associada a codificação de resistência a tetraciclina; ao de 54 MDa a codificação de resistência a cloranfenicol e ao de 35 MDa a codificação de resistência a estreptomicina, ampicilina e canamicina.

5.6. Mutagênese com Transposon TnphoA

Foram obtidas 12 amostras mutantes, com fenótipo de colônia azul em meio LAXP, resultantes da mutagênese da amostra BZ43 com o transposon TnphoA, segundo metodologia descrita no item 4.1.1.

Dentre as amostras mutantes, testadas através de hemaglutinação com eritrócitos de boi, segundo metodologia descrita no item 4.3.3, apenas as amostras BZ43xp4 e BZ43xp6 apresentaram hemaglutinação negativa com estes eritrócitos.

5.7. Testes de Adesão a Células HeLa

Os resultados do teste de adesão das amostras bacterianas BZ43, BZ43xp4 e BZ43xp6 a células HeLa em cultura de tecido, segundo a metodologia descrita no item 4.12, demonstraram que tanto a amostra selvagem BZ43, como as amostras mutantes BZ43xp4 (não-fimbriada) e BZ43xp6 (fimbriada) apresentaram o mesmo tipo de adesão a células HeLa.

A amostra parental BZ43 apresentou adesão do tipo difusa, segundo a classificação de Scaletsky *et alii* (1984) (Figura 5.19).

Os mutantes BZ43xp4 e BZ43xp6 (resultado não apresentado) apresentaram adesão do tipo difusa, igual ao padrão da amostra parental BZ43 (Figura 5.19).

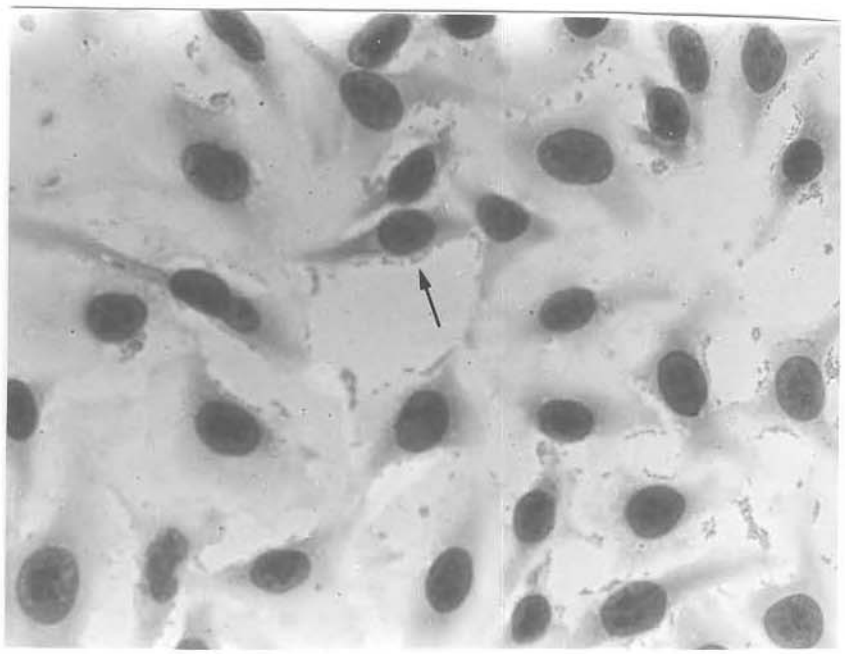


Figura 5.19. Adesão da amostra BZ43 a células HeLa em cultura de tecido.
Coloração de May-Grunwald e Giemsa.
Aumento = 1.200 X.

5.8. Teste de Patogenicidade em Camundongos

Nenhum dos camundongos infectados com as amostras BZ43 e BZ43xp6 apresentou diarréia ou morte.

Os resultados de contagem de colônias azuis (BZ43xp6) e brancas (BZ43) em meio LAXP com Sm (500 *ug*/ml) não foram indicativos, pois em dois dos animais testados o número de colônias nas placas inoculadas foi muito baixo (7-20 U.F.C./ml para BZ43 e colônias brancas e 2,2 a 40 U.F.C./ml para BZ43xp6) e no outro animal foram iguais para as duas amostras bacterianas.

6. Discussão

A presença das fímbrias FY e 31A nas amostras bacterianas, isoladas de fezes diarréicas e septicemia em bovinos, foi associada à hemaglutinação D-manose resistente de eritrócitos de boi, segundo descrito por Shimizu *et alii* (1987) e Girardeau *et alii* (1988) (Tabelas 5.3, 5.4, 5.5 e 5.6).

As amostras 31A apresentaram ainda MRHA com eritrócitos de cobaia, diferenciando-as do padrão de hemaglutinação das amostras FY (Tabela 5.3).

A descrição de uma nova fímbria em uma amostra de *E. coli* de origem bovina (Girardeau *et alii*, 1988) fez necessária uma diferenciação desta da fímbria 31A. Apesar da nomenclatura ser semelhante, as fímbrias 31A e CS31A são antígenos diferentes. A fímbria CS31A, descrita por Girardeau *et alii* (1988) na amostra 31A, é codificada por um plasmídio de 105 MDa, composta por subunidades proteicas de 29 kDa e não apresenta hemaglutinação com os diversos eritrócitos testados, nem capacidade de adesão a vilosidades de enterócitos bovinos. A eliminação do plasmídio de 105 MDa resultou em uma amostra com o mesmo perfil de hemaglutinação e adesão da amostra 31A original.

Concluímos que a fímbria CS31A, descrita e caracterizada por Girardeau *et alii* (1988), e a fímbria 31A, descrita por Shimizu *et alii* (1987), são fímbrias diferentes. A subunidade protéica de 19 kDa apresentada por

Shimizu *et alii* (1987) foi também visualizada nos géis de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) dos extratos a 60° C da amostra 31A original e da amostra 31A curada do plasmídio de 105 MDa no trabalho de Girardeau *et alii* (1988).

No estudo plasmidial da amostra 31A, por nós realizado, não foi verificada a presença do plasmídio de 105 MDa (Figura 5.18) e acreditamos que tenha ocorrido uma perda espontânea deste plasmídio no estoque originalmente recebido. A análise dos padrões de hemaglutinação da amostra 31A sugeriu, ainda, a presença de outros tipos de adesinas (Tabela 5.3) além da fímbria 31A. Esta amostra apresentou ainda uma banda de proteína com aproximadamente 30 kDa, visível nas preparações de proteína de superfície (Figuras 5.10 e 5.12), sugerindo possivelmente ser uma subunidade de fímbria devido à sua intensidade. A presença desta banda também foi detectada nas outras amostras 31A+ (Figuras 5.10 e 5.12), sugerindo a realização de estudos posteriores no sentido de verificar a presença de outras fímbrias nestas amostras, e, possivelmente, da fímbria CS31A.

Um resultado não esperado foi a ausência de hemaglutinação com eritrócitos de cavalo na amostra 11a (Tabela 5.3 e 5.7), portadora das fímbrias K99 e F41. A amostra 11a foi incubada conforme recomendado para a expressão de K99, contudo, não apresentou o fenótipo da fímbria nos testes de hemaglutinação (Tabela 5.7). O mesmo aconteceu para F41. Entretanto, a expressão de K99 foi confirmada através da caracterização eletroforética de

extratos a 60º C da amostra 11a crescida em CFA a 37º C, onde pode ser visualizada uma banda proteica de aproximadamente 18,000 Da correspondente à subunidade da fímbria K99 (Figura 5.13). A diferença entre o peso da subunidade de K99 relatada na literatura (18,500 Da) e o peso estimado no gel pode ser explicado pelas condições da corrida eletroforética empregada neste trabalho. Um outro resultado que sugeriu a presença de K99 nesta amostra bacteriana foi a detecção da produção de STI, característica sempre associada à produção de K99 nas amostras de *E. coli* de origem bovina (Guinée & Jansen, 1979). Estudos posteriores são necessários para elucidar a ausência de hemaglutinação de eritrócitos de cavalo apresentada por esta amostra.

A caracterização eletroforética das amostras bacterianas através da extração de proteínas totais revelou uma elevada similaridade entre os padrões de bandas apresentados pelas amostras 31A$^+$ e FY$^+$ (resultado não apresentado). Não foi possível a diferenciação das amostras bacterianas quanto à presença ou não das bandas de proteína de 19 e 20 kDa, correspondentes às subunidades das fímbrias 31A e FY (Shimizu *et alii*, 1987), devido à grande quantidade de bandas de proteína no gel.

Através da metodologia de extração de proteínas de superfície foi possível a visualização das subunidades proteicas relacionadas às fímbrias 31A e FY e a determinação de dois grupos de amostras eletroforeticamente distintos.

Os extratos de proteínas de superfície das amostras Att25, 54-5 e 2147-4, incubadas a 37° C, apresentaram um padrão de bandas de proteína claramente distinto do padrão de bandas apresentado pelas amostras 11a, 31A, BZ43 e BZ2468 crescidas a 37° C (Figuras 5.9, 5.10, 5.11 e 5.12).

As amostras Att25, 54-5 e 2147-4 apresentaram uma banda característica de aproximadamente 20 kDa, a qual foi relacionada à subunidade da fímbria FY (Girardeau *et alii*, 1988; Shimizu *et alii*, 1987) (Figuras 5.9 e 5.11).

As amostras 31A, BZ43 e BZ2468, incluindo a amostra 11a, apresentaram uma banda característica de aproximadamente 17 kDa, que foi relacionada à subunidade da fímbria 31A (Shimizu *et alii*, 1987) (Figura 5.12).

A determinação do peso molecular da banda da subunidade da fímbria 31A, realizada por Shimizu *et alii* (1987), difere da estimativa realizada no presente trabalho. Este resultado pode ser explicado pelas condições de corrida eletroforética utilizadas neste trabalho. Foram empregados lisozima e beta-lactoglobulina como padrões de baixo peso molecular, com 14,3 kDa e 18,4 kDa, respectivamente, ao contrário de Shimizu *et alii* (1987), que utilizaram marcadores de 14,4 e 21,5 kDa para a determinação do peso molecular da subunidade da fímbria, tornando sua determinação sujeita a maiores variações. Verificou-se, experimentalmente, que uma variação de 1 mm nas medições de migração no gel pode resultar em variações de 500-800 Da na

determinação do peso molecular de uma banda de proteína na faixa de peso molecular correspondente a 18 kDa. Apesar das regressões de ajuste dos padrões terem fornecido valores de $r^2 > 0,98$ (GL = 3), a natureza da equação de ajuste dos pontos permite a ocorrência de uma variação maior na determinação dos pesos moleculares nos extremos da faixa de ajuste, isto é, as proteínas de alto e baixo peso molecular estão sujeitas a erros na determinação do peso molecular através da fórmula da regressão ($\log MW = a \cdot RF + b$).

Os resultados obtidos para a amostra 11a foram diferentes dos anteriormente relatados na literatura. No trabalho de Morris *et alii* (1985), esta amostra foi originalmente classificada como portadora da fímbria FY, através de tipagem sorológica com antissoros específicos. Entretanto, as reações de aglutinação com antissoros específicos realizadas indicaram que a amostra 11a não apresenta a fímbria FY, pois quando empregou-se antissoro anti-FY específico (absorvido com a amostra Att25 crescida a 16° C) não ocorreu aglutinação. As outras amostras FY^+ testadas apresentaram aglutinação positiva com este antissoro (Tabela 5.8). O reconhecimento desta amostra pelo antissoro anti-31A específico (absorvido com a amostra 31A crescida a 16° C) sugeriu que a 11a apresenta a expressão da fímbria 31A (Tabela 5.8). Este resultado foi confirmado pelos resultados das extrações de proteína de superfície, onde o padrão de bandas da amostra 11a não revelou a ocorrência da subunidade proteica de 20 kDa referente à

fímbria FY (Figura 5.9), e o padrão de bandas desta amostra apresentou grande similaridade com o padrão geral apresentado pelas amostras 31A+, incluindo a banda de 17 kDa referente à subunidade da fímbria 31A (Figura 5.12).

A utilização de antissoros policlonais não-absorvidos resultou na ocorrência de reações de aglutinação inespecíficas e na reação cruzada da amostra 11a com os antissoros anti-31A e anti-FY (Tabelas 5.8 e 5.9), indicando a presença de antígenos de superfície comuns entre as amostras BZ43 e Att25 e as demais amostras bacterianas.

Quando analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão através de coloração negativa com PTA, todas as amostras bacterianas incubadas a 37° C apresentaram estruturas semelhantes a fímbrias (Figuras 5.1a a 5.7a) com exceção da amostra BZ2468, a qual não apresentou fímbrias típicas (Figura 5.6a).

A micrografia eletrônica da amostra BZ2468 revelou a presença de fragmentos de estruturas semelhantes a fímbrias, destacados da superfície bacteriana (Figura 5.6), diferindo do resultado apresentado por Shimizu *et alii* (1987), onde esta amostra bacteriana foi fortemente fimbriada.

As mesmas amostras bacterianas incubadas a 16° C não apresentaram estruturas semelhantes a fímbrias, com excessão da amostra 11a (Figuras 5.1b a 5.7b). Algumas amostras, contudo, apresentaram flagelos em maior quantidade quando incubadas a 16° C (Figuras 5.1b, 5.6b e 5.7b).

A amostra 11a apresentou-se fortemente fimbriada quando incubada a 16° C (Figura 5.4b), indicando a possível presença de fímbrias tipo I, não temperatura-dependentes. A determinação da presença desta fímbria através do padrão de hemaglutinação com eritrócitos não foi realizada através da metodologia de hemaglutinação em lâmina devido à reação D-manose resistente com eritrócitos de cobaia que esta amostra apresentou, impossibilitando a realização do ensaio na ausência de D-manose (Tabela 5.3).

Os resultados de microscopia eletrônica, associados aos resultados de aglutinação com antissoros específicos e eletroforese dos extratos de proteína de superfície, confirmaram a regulação temperatura-dependente da expressão das fímbrias FY e 31A (Shimizu *et alii*, 1987). Este mecanismo de regulação dependente de temperatura foi encontrado em várias outras fímbrias de amostras de *Escherichia coli* de origem não-humana (Christensen *et alii*, 1985).

A ausência da produção de hemolisina (Tabela 5.2) está de acordo com dados de literatura para amostras portadoras das fímbrias FY e 31A de origem bovina (Leite *et alii*, 1989; Morris *et alii*, 1987; Shimizu *et alii*, 1987).

A ausência da produção de LT também foi esperada para amostras analisadas (Tabela 5.2), uma vez que não há relatos frequentes da produção deste tipo de toxina por amostras de *E. coli* de origem bovina associadas a casos de diarréia (Morris *et alii*, 1987).

A produção de toxina termoestável (STI) foi detectada apenas na amostra 11a (Tabela 5.2), o que foi relatado em trabalhos anteriores (Leite *et alii*, 1989). Em amostras de *E. coli* de origem bovina a produção de STI encontra-se sempre associada à produção do antígeno K99, sendo codificada por plasmídios (Guinée & Jansen, 1979). A amostra 11a apresentou plasmídios, porém não apresentou marcadores de resistência a antibióticos associados a estes e, portanto, a transferência dos plasmídios por conjugação não foi realizada.

Não foram encontrados relatos na literatura de amostras portadoras de fímbrias FY e 31A que apresentassem produção de verotoxina (SLT) (Leite *et alii*, 1989; Morris *et alii*, 1987; Shimizu *et alii*, 1987). A detecção da produção desta citotoxina nas amostras 54-5 e 31A, e possivelmente na amostra BZ2468 (Tabela 5.2), foram resultados contraditórios e merecem estudos posteriores no sentido de sua confirmação, possivelmente com a realização do teste utilizando-se outros meios de cultura para crescimento das amostras e/ou o emprego de sondas moleculares (DNA) para detecção de VT.

A resistência a vários antibióticos apresentada pelas amostras Att25, 31A e BZ2468 (Tabela 5.1) sugeriu a presença de plasmídios nestas amostras, os quais foram verificados através de eletroforese em gel de agarose (Figuras 5.17 e 5.18) e análises de conjugação (item 5.3).

A análise dos transconjugantes, possuindo um ou mais plasmídios, para hemaglutinação com eritrócitos de boi

e reação com antissoros específicos não detectou a expressão das fímbrias FY e 31A em nenhum dos transconjugantes testados (item 5.3), sugerindo que a expressão destas fímbrias apresentava codificação cromossômica nas amostras parentais.

Frente aos resultados negativos das análises de expressão das fímbrias FY e 31A nos transconjugantes das amostras 31A, BZ2468 e Att25 e à não existência de plasmídios nas amostras BZ43 e 2147-4, determinou-se que localização da codificação destas fímbrias encontrava-se a nível cromossômico.

As análises genéticas foram então redirecionadas no sentido da obtenção de mutantes que não expressassem as fímbrias FY ou 31A, utilizando-se para isto uma das linhagens que não apresentavam plasmídios (BZ43 e 2147-4) e mutação com transposon. A linhagem BZ43 foi selecionada para este propósito, uma vez que se obteve um mutante expontâneo Sm^r (Tabela 5.1) desta linhagem.

A metodologia de mutagênese direcionada para proteínas de exportação por inativação insercional, empregando-se o transposon TnphoA (Taylor *et alii*, 1989), foi considerada mais adequada para se estudar a expressão destas fímbrias em *E. coli* (Taylor *et alii*, 1987). Para isto, utilizou-se o transposon TnphoA (Km^r, $phoA^+$) inserido no plasmídio pRT733 (vetor suicida, Ap^r, replicação dependente da proteína Pi).

A característica mais importante deste modelo é a apresentação do fenótipo phoA (colônias azuis) apenas quando a inserção do transposon ocorre no quadro de leitura de proteínas com sequências de exportação (peptídio sinal), de modo que os mutantes "azuis" seguramente apresentam proteínas de espaço periplasmático, de membrana ou de exportação mutagenizadas.

O resultado de MRHA negativa com hemácias bovinas das amostras mutantes BZ43xp4 e BZ43xp6 foi indicativo da inativação insercional da expressão da fímbria 31A nestes mutantes, uma vez que esta fímbria está associada à hemaglutinação de eritrócitos bovinos (Shimizu *et alii*, 1987).

Contudo, as análises com antissoros específicos anti-31A mostraram que as amostras BZ43xp4 e BZ43xp6 apresentavam reação positiva com o antissoro anti-31A absorvido com a amostra 31A incubada a 16° C (Tabela 5.10), indicando que as amostras mutantes expressavam algum antígeno de superfície, reconhecido pelo antissoro absorvido, que se expressava a 37° C, sugerindo que este antígeno poderia ser a fímbria 31A alterada ou subunidades proteicas mutagenizadas, associadas à membrana externa das células, que tivessem retido o epitopo de reconhecimento dos anticorpos anti-31A.

A visualização de fímbrias das amostras mutantes BZ43xp4 e BZ43xp6 em microscopia eletrônica de transmissão (Figura 5.8a e 5.8b) indicou que a amostra BZ43xp6

apresentou a expressão de flagelos e de estruturas semelhantes a fímbrias, ao passo que a amostra BZ43xp4 apresentou flagelos, porém não apresentou a expressão de estruturas semelhantes a fímbrias (Figuras 5.8a e 5.8b).

A análise eletroforética dos padrões de proteínas totais da amostra parental BZ43 e das amostras mutantes BZ43xp4 e BZ43xp6 não permitiu inferir qualquer alteração dos padrões de bandas (Figura 5.15). Entretanto, a análise eletroforética dos padrões de proteínas de superfície das amostras mutantes BZ43xp4 e BZ43xp6, coradas através da coloração de prata (Figura 5.14), revelou uma alteração no padrão das subunidades protéicas destas amostras quando comparadas com a amostra BZ43 original. Observou-se no padrão de bandas das amostras mutantes a ausência de uma banda com aproximadamente 17 kDa, a qual poderia corresponder à subunidade proteica da fímbria 31A, e que se expressava nitidamente na amostra parental BZ43 (Figura 5.14).

Estes resultados sugeriram que a subunidade protéica de 17 kDa, não detectada nas amostras mutantes, seria a subunidade da proteína associada à propriedade de hemaglutinação dos eritrócitos de bovino na amostra BZ43, a qual, estando ausente nos mutantes, acarretaria hemaglutinação negativa.

Através da análise eletroforética de proteínas de membrana dos mutantes e da amostra parental BZ43 foi possível identificar uma alteração no padrão de bandas do

mutante BZ43xp4, com a eliminação da expressão de uma banda correspondente a uma subunidade proteica de aproximadamente 35 kDa, a qual se expressava no mutante BZ43xp6 e na amostra parental BZ43 (Figura 5.16). Esta outra alteração foi relacionada à codificação de alguma proteína de membrana associada à expressão da fímbria.

Os resultados obtidos sugerem que a inserção do transposon TnphoA pode ter ocorrido em regiões diferentes no cromossomo das amostras mutantes BZ43xp4 e BZ43xp6, porém resultou na inativação da expressão de hemaglutinação das duas amostras. Na amostra BZ43xp6 o transposon promoveu a inativação insercional da expressão da fímbria 31A e na amostra mutante BZ43xp4 ocorreu, além da inativação da expressão da proteína de 17 kDa, a eliminação da expressão de uma fímbria.

Em ambas as amostras, contudo, ocorreu a expressão de um antígeno de superfície que promoveu a reação de aglutinação com o antissoro anti-31A absorvido com a amostra 31A crescida a 16° C (Tabela 5.10).

Este resultado foi confirmado pela reação com o antissoro anti-31A absorvido com a amostra BZ43xp4 (não-fimbriada) crescida a 37° C. O antissoro absorvido perdeu a capacidade de reconhecimento das amostras 31A$^+$ e mutantes (Tabelas 5.8 e 5.10), indicando que o antígeno de superfície expressado pela amostra BZ43xp4 seria a subunidade da fímbria 31A, a qual era exportada mas não polimerizada.

Este resultado foi indicativo de que a inserção do transposon teria afetado a codificação de alguma proteína envolvida na polimerização das subunidades da fímbria na membrana externa da amostra BZ43xp4, resultando na expressão da subunidade na membrana externa e no seu reconhecimento pelo anticorpo anti-31A, porém não haveria formação da fímbria. Na amostra BZ43xp6 o reconhecimento poderia ter sido mediado por um processo semelhante, ou ainda pelo reconhecimento da fímbria pelos anticorpos do soro.

O antissoro anti-31A aborvido com a amostra BZxp4 incubada a 37° C foi empregado na realização de um "Western blotting" de proteínas totais das amostras $31A^+$ e mutantes, com o intúito de verificar se ocorreu a remoção do anticorpo específico anti-subunidade de 17 kDa do soro e se a fímbria expressada pela amostra BZ43xp6 é uma fímbria diferente da 31A. O "Western blot" (resultado não apresentado) mostrou que não houve reconhecimento da banda correspondente a proteína de 17 kDa em nenhuma das amostras bacterianas, indicando que a amostra BZ43xp4 expressou esta proteína, e não ocorreu o reconhecimento de nenhuma outra proteína da amostra BZ43xp6 pelo antissoro, sugerindo que a fímbria expressa por esta amostra pode ser 31A.

Os resultados levaram à formulação de duas hipóteses para a interpretação destes resultados:

1) A amostra BZ43 expressaria mais de um tipo de fímbria, e a fimbria presente na amostra BZ43xp6, detectada através de microscopia eletrônica, seria uma fímbria diferente da 31A, sem capacidade hemaglutinante de eritrócitos de boi.
2) A amostra BZ43 expressaria apenas 1 tipo de fímbria, 31A, a qual seria heteropolimérica, composta por uma subunidade associada à formação da fímbria e uma adesina com propriedade de hemaglutinação de eritrócitos de bovino.

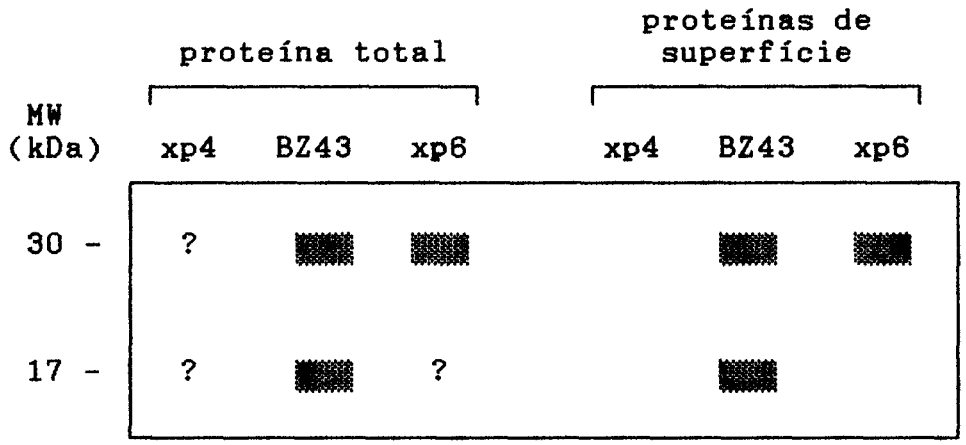
A primeira hipótese pressupõe, na amostra BZ43xp4, a inativação da expressão da fímbria 31A (17 kDa) e da segunda fímbria proposta (relacionada à não-expressão de uma proteína de membrana de 35 kDa), o que poderia ter sido acarretado pela inserção do transposon em dois pontos do cromossomo bacteriano. Na amostra BZ43xp6 teria ocorrido apenas a inativação insercional da fímbria 31A (proteína de superfície de 17 kDa), mantendo-se a expressão da outra fímbria proposta.

Esta hipótese poderia ser confirmada através da realização de um "Western blotting" das proteínas totais e de superfície da amostra parental BZ43 e das amostras mutantes BZ43xp4 e BZ43xp6, empregando-se um antissoro anti-31A absorvido com a amostra crescida a 16º C. Assim, seriam mantidos no antissoro os anticorpos específicos anti-31A e,

possivelmente, os anticorpos contra a segunda fímbria proposta (presente na amostra BZ43xp6). O resultado esperado neste teste poderia revelar a presença da subunidade da segunda fímbria, talvez CS31A, com 30 kDa, nos extratos de proteína total e de superfície da amostra parental BZ43 e do mutante BZ43xp6, ao passo que os extratos de proteína de superfície da amostra BZ43xp4 não apresentariam esta banda.

Caso a inserção do transposon tenha se dado em proteínas de montagem das fímbrias poderia ocorrer um acúmulo de subunidades de fímbrias no citoplasma ou espaço periplasmático, e assim, haveria a possibilidade de ocorrer uma reação positiva para estas bandas nos extratos de proteínas totais.

Assim sendo, um "Western blot" destas amostras apresentaria o seguinte resultado:



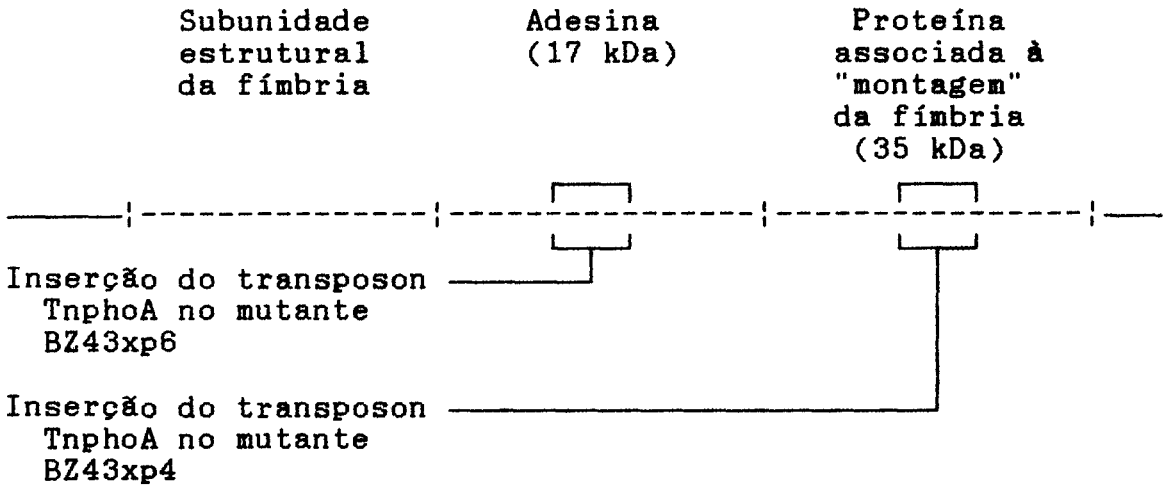
Um "Western blot" realizado com o antissoro anti-31A absorvido com a amostra BZ43 crescida a 16° C (resultado não apresentado) confirmou a não-expressão da subunidade de 17 kDa da fímbria 31A nas amostras mutantes BZ43xp4 e

BZ43xp6. Entretanto, não foi possível a visualização com nitidez da reação com a subunidade proposta de 30 kDa, sendo que estudos posteriores são necessários para a confirmação da expressão desta.

A segunda hipótese propõe que a codificação da subunidade, adesina e proteína de montagem da fímbria estariam localizados em único operon. A inserção do transposon teria ocorrido em sítios diferentes na amostra BZ43xp4 e BZ43xp6, resultando em dois mutantes com hemaglutinação negativa e fenotipicamente diferentes (BZ43xp6 apresentam fímbrias).

Supondo uma estrutura linear, uma possível representação dos genes envolvidos na codificação da fímbria seria:

Operon da fímbria 31A



Na linhagem mutante BZ43xp6 a inserção do transposon TnphoA teria se dado no gene codificador da adesina associada à hemaglutinação de eritrócitos bovinos,

resultando num fenótipo não-hemaglutinante e fimbriado. No mutante BZ43xp4 a inserção teria se dado num gene envolvido com a montagem da fímbria, acarretando a inativação da expressão da fímbria e das características de hemaglutinação.

Foram encontrados na literatura exemplos que apoiavam as duas hipótese, como no caso das estruturas heteropoliméricas das fímbrias tipo I (Hanson *et alii*, 1988) e tipo P (Arthur *et alii*, 1988) e da ocorrência de mais de um tipo de fímbria na amostra 31A, sendo que a fímbria CS31A não apresenta propriedades adesivas (Girardeau *et alii*, 1988).

As fímbrias tipo I e tipo P são heteropoliméricas, compostas por uma pilina, envolvida na estruturação da fímbria, e por outras proteinas intimamente associadas à estrutura da fímbria, responsáveis pelas características de adesão. A fímbria tipo I, purificada por Hanson *et alii* (1988), apresentou uma estrutura de fímbria composta por subunidades de 17 kDa, responsáveis pela organização do pilus, e de subunidades de 28, 16,5 e 14,5 kDa, as quais apresentaram-se intimamente associadas ao pilus, porém em menor quantidade. A subunidade de 28 kDa, associada à extremidade distal do pilus, foi a porção protéica responsável pela propriedade de adesão aos receptores de D-manose. A fímbria **pap** (pili associados a pielonefrite), é também heteropolimérica. O operon *pap* foi clonado e a expressão de 9 proteínas associadas à formação do pilus P

foi descrita: *PapA*, a subunidade do pilus; *PapH*, associada à base do pilus; *PapE*, *PapF* e *PapG*, associadas à extremidade do pilus; *PapC*, responsável pela polimerização do pilus; *PapD*, associada ao transporte das subunidades do pilus; *PapB* e *PapI*, associadas à ativação transcricional do operon (Arthur *et alii*, 1989). *PapG* foi descrita como sendo a subunidade envolvida na interação com o receptor específico e propriedade de adesão (Lund *et alii*, 1987).

Por analogia a estes modelos, a fímbria 31A poderia ser constituída por uma adesina e uma pilina, sendo que a adesina corresponderia à subunidade de 17 kDa e a pilina relacionada a outra subunidade proteica não determinada. Não foram visualizadas alterações no padrão de proteínas de superfície da amostra BZ43xp6 que indicassem qual seria a subunidade envolvida na formação do pilus em comparação com o padrão de bandas da amostra BZ43xp4, não-fimbriada (Figura 5.15).

Entretanto, os modelos propostos são baseados em evidências experimentais associadas a modelos descritos na literatura e não puderam ser confirmados pelos experimentos realizados.

Outra perspectiva a ser considerada é a possibilidade da expressão de dois tipos de fímbrias na amostra BZ43, possivelmente reguladas por um sistema de montagem comum, o que resultaria na não expressão das duas fímbrias na amostra BZ43xp4, associada à inativação de uma proteína de montagem de 35 kDa, e na expressão de apenas um

tipo na amostra BZ43xp6, associada à inativação da expressão da fímbria 31A (17 kDa).

A avaliação das capacidades de adesão da amostra BZ43 e das amostras mutantes BZ43xp4 e BZ43xp6 a células HeLa em cultura de tecidos (Figuras 5.19, 5.20 e 5.21) demonstrou que a adesão a células HeLa é uma característica codificada por uma adesina ou antígeno capsular independente da característica de hemaglutinação de eritrócitos bovinos. Este resultado sugere que os receptores envolvidos na adesão a HeLa não são os mesmos receptores associados à propriedade de aglutinação de eritrócitos bovinos.

Um teste de adesão realizado com enterócitos de bovino (resultado não apresentado) demostrou-se que as amostras BZ43, BZ43xp4 e BZ43xp6 apresentam a mesma capacidade de adesão a enterócitos, sugerindo que a propriedade de aglutinação de eritrócitos de bovino não apresenta correlação com a capacidade de adesão a eritrócitos bovinos, envolvendo, provavelmente, receptores diferentes.

A realização do teste de competição em modelo de camundongo recém-nascido (item 5.6) demonstrou que a amostra BZ43 não é patogênica neste modelo animal. O fenótipo selvagem, capaz de aglutinar eritrócitos bovinos, pareceu não conferir à amostra selvagem nenhuma capacidade de adesão aumentada em relação à amostra mutante BZ43xp6 (não-hemaglutinante) neste modelo animal.

7. Conclusão

A partir da análise dos resultados de hemaglutinação, perfil eletroforético de proteínas totais, de superfície e de membrana, aglutinação com antissoros específicos absorvidos e adesão a células HeLa em cultura de tecidos, foi possível concluir que:

- As amostras Att25, 54-5 e 2147-4 apresentam fímbria tipo FY, cuja codificação genética foi localizada a nível cromossômico. As amostras 31A, BZ43, BZ3468 e 11a apresentam fímbria tipo 31A, cuja codificação genética foi localizada a nível cromossômico.

- A amostra 11a, classificada em trabalhos anteriores (Morris *et alii*, 1985) como portadora de fímbria FY através de testes de aglutinação com antissoros específicos; foi classificada como portadora de fímbria 31A, através de aglutinação com antissoros específicos e perfil eletroforético de proteínas de superfície.

- Na amostra BZ43 as características de hemaglutinação e de adesão a células HeLa são propriedades codificadas por adesinas diferentes e não envolvem, necessariamente, a expressão de fímbria.

- A amostra BZ43 apresentou a propriedade de hemaglutinação de eritrócitos bovinos associada à expressão de uma proteína de superfície com subunidade de aproximadamente 17 kDa. Nesta amostra a capacidade de hemaglutinação e de expressão de fímbria são características distintas.

- A amostra mutante BZ43xp4 apresentou a perda da expressão de fímbria e hemaglutinação associada à ausência de uma proteína de superfície com subunidade de aproximadamente 35 kDa e da proteína de superfície de 17 kDa.

- A amostra BZ43 (selvagem) e a amostra mutante BZ43xp6 (não-hemaglutinante) não promovem diarréia em infecção experimental de camundongos de 3 dias. Neste animal, a amostra BZ43xp6 não apresentou menor capacidade de adesão que a amostra selvagem BZ43, em ensaio de competição.

8. Perspectivas

Acreditamos que para a elucidação dos mecanismos de expressão das fímbrias 31A e FY são necessários experimentos complementares aos realizados, visando a:

a) Purificação das fímbrias 31A e FY, com a determinação de sua constituição molecular e das possíveis subunidades protéicas associadas.

b) Confirmação da expressão de apenas um tipo de fímbria na amostras BZ43 e determinação do sítio de inserção do transposon TnphoA no cromossomo das amostras BZ43xp4 e BZ43xp6, de modo a localizar a proteína inativada pela inserção e determinar sua atividade na expressão da fímbria 31A.

c) Mutagênese das amostras portadoras de fímbria FY e determinação das propriedades de adesão, sítio de inserção do transposon e expressão desta fímbria nos mutantes.

d) Clonagem e expressão do operon das fímbrias FY e 31A e determinação das sequências gênicas e proteínas envolvidas na montagem e na codificação das fímbrias.

e) Avaliação de outras características associadas a patogenicidade em *E. coli*, como produção de colicina V e sideróforo, associados a amostras septicêmicas.

f) Estabelecimento de um modelo experimental de patogenicidade para estas amostras com o intúito de verificar a participação das fímbrias FY e 31A como determinantes de virulências em amostras de *Escherichia coli* associadas a diarréia e septicemia.

9. Resumo

Amostras de *Escherichia coli* portadoras das fímbrias FY e 31A, associadas a diarréia e septicemia em bovinos, foram estudadas visando determinar a localização da expressão gênica destas fímbrias. As amostras bacterianas 31A$^+$: BZ43, BZ2468 e 31A e FY$^+$: Att25, 54-5, 2147-4 e 11a, foram analisadas quanto à produção de enterotoxinas (STI e LT), VT, hemolisina, resistência a antibióticos, hemaglutinação D-manose resistente com eritrócitos e reação com antissoros específicos. A caracterização das fímbrias envolveu microscopia eletrônica, análise eletroforética de proteínas totais, de superfície e de membrana em SDS-PAGE e "Western Blotting". Foi também verificada a presença de plasmídios conjugativos nas amostras bacterianas e a caracterização dos transconjugantes para a expressão de FY e 31A. Uma amostra portadora de fímbria 31A (amostra BZ43) foi mutagenizada com transposon TnphoA. A expressão de 31A foi avaliada através de aglutinação com antissoros específicos, hemaglutinação de eritrócitos de boi, adesão a células HeLa em cultura de tecido e patogenicidade em teste de competição em camundongo.

A análise dos padrões de hemaglutinação, proteínas totais, proteínas de superfície e aglutinação com antissoros específicos permitiu a determinação das subunidades protéicas destas fímbrias como sendo aproximadamente 20 kDa para FY e 17 kDa para 31A. A amostra 11a, anteriormente

classificada como portadora de fímbria FY, foi reclassificada como portadora de fímbria 31A através dos resultados de SDS-PAGE de proteínas de superfície e reação com antissoros específicos.

As amostras Att25, BZ2468 e 31A apresentaram plasmídios conjugativos com marcas de resistência a antibióticos, porém não codificaram para a expressão de fímbrias nas linhagens transconjugantes, sugerindo que a expressão destas fímbrias ocorre a nível cromossômico.

A amostra BZ43 mutagenizada com TnphoA originou duas amostras não-hemaglutinantes (eritrócitos bovinos) que apresentaram reação com o anticorpo específico anti-31A. A perda da capacidade de hemaglutinação foi relacionada à ausência da subunidade da fímbria 31A (17 kDa) em SDS-PAGE de proteínas de superfície. Uma das amostras mutantes apresentou fímbrias em microscopia eletrônica. A ausência de fímbrias no outro mutante foi relacionada à não expressão de uma proteína de membrana de 35 kDa.

A perda da capacidade de hemaglutinação de eritrócitos de bovino, associada ou não à expressão de fímbrias, não alterou o padrão de adesão a células HeLa dos mutantes (AD).

A amostra BZ43 e o mutante fimbriado não apresentaram patogenicidade no teste de competição em camundongos de 3 dias de idade. A perda da capacidade de hemaglutinação parece não conferir uma menor adesão da amostra mutante nestes animais.

10. Abstract

Escherichia coli strains associated with diarrhea and septicemic infections of cattle were studied to determine the genetic expression of FY and 31A fimbriae. The strains 31A$^+$: BZ43, BZ2468 and 31A, and FY$^+$: Att25, 54-5, 2147-4 and 11a, were evaluated for enterotoxin production (STI and LT), VT, hemolysin, antibiotic resistance, mannose-resistant RBC hemagglutination, and reaction with specific antisera. The characterization of fimbriae involved electron microscopy, SDS-PAGE of total, surface and membrane proteins and Western blotting. Conjugative plasmids in the strains were transferred and analyzed for FY and 31A expression.

Hemagglutination, SDS-PAGE of total and surface proteins and reaction with specific antisera allowed the location of the fimbrial subunits at 20 kDa for FY and 17 kDa for 31A. Strain 11a, originally grouped as FY by others, was classified as 31A based on SDS-PAGE of surface proteins and reaction with specific antisera.

Strains Att25, BZ2468 and 31A had conjugative plasmids coding antibiotic resistance marks, but transconjugants failed to express the fimbriae, suggesting it could be located in the bacterial chromosome.

Strain BZ43 (31A) was mutagenized using TnphoA transposon and mutants with negative hemagglutination of bovine RBC were assayed with specific antiserum, and tested for adhesion to HeLa cells in tissue culture and

pathogenicity in the mouse competition assay. Loss of hemagglutinating capacity was related to the lack of the 31A fimbriae subunit (17 kDa) on SDS-PAGE of surface proteins. One mutant strain showed fimbriae under electron microscopy. The absence of fimbriae in the other mutant strain was related to a missing 35 kDa membrane protein. Both mutants reacted positively with absorbed anti-31A antiserum suggesting that fimbrial epithopes were expressed.

Loss of bovine RBC hemagglutination did not altered the adhesion patter to HeLa cells (AD), either in the fimbriated or in the non-fimbriated mutant strain.

Strain BZ43 and the fimbriated mutant strain were non-pathogenic to 3 day old mice in the competition assay. The lack of hemagglutination seemed not to interfere with adhesion properties of the mutant strain in this assay.

11. Referências Bibliográficas

Anderson, D. G. & Moseley, S. L. *Escherichia coli* F41 adhesin: genetic organization, nucleotide sequence, and homology with the K88 determinant. J. Bacteriol., 170: 4890-6, 1988.

Appleyard, R. K. Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. Genetics, 39: 440, 1954.

Aronson, M.; Medalia, O.; Schori, L. *et alii* Prevention of *Escherichia coli* colonization of the urinary tract by blocking bacterial adherence with methyl alpha-D-mannopyranoside. J. Infect. Dis., 139: 329, 1979.

Arthur, M.; Campanelli, C.; Arbeit, R. D.; Kim, C.; Steinbach, S.; Johson, C. E.; Rubin, R. H. & Goldstein, R. Structure and copy number of gene clusters related to the pap P-adhesin operon of uropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun., 57: 314, 21, 1989.

Baldini, M. M.; Kaper, J. B.; Levine, M. M.; Candy, D. C. A. & Moon, H. W. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 2: 534-8, 1983.

Benedetti, C. A. Análise eletroforética de proteínas de membrana de *Pseudomonas avenae* e *Psedomonas rubbrilineans* patogênicas a gramíneas. (Tese de Mestrado). IB, UNICAMP, 1990.

Birnboin, H. C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. Nucleic. Acid Res., 7: 1531-23, 1979.

Blum, H; Beier, H. & Gross, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis, 8: 93-9, 1987.

Bolivar, F. & Backman, K. Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. Methods Enzymol., 68: 245, 1979.

Boop, C. A.; Greene, K. D.; Downes, F. P.; Sowers, E. G.; Wells, J. G. & Wachsmuth, I. K. Unusual verotoxin-producing *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. J. Clin. Microbiol., 25: 1486-9, 1987.

Boyer, H. W. & Roulland-Dussoix, D. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet., 146: 199, 1969.

Castro, A. F. P. de; Serafim, M. B.; Brito, J. R. F.; Barcellos, D. S. E. N. de & Colli, I. A. G. Virulence factors present in cultures of *Escherichia coli* isolated from pigs in the region of Concórdia, Santa Catarina, Brazil. Pesq. Vet. Bras., 4: 109-14, 1984.

Chang, P. P.; Moss, J.; Twiddy, E. M. & Holmes, R. K. Type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* activates adenylate cyclase in human fibroblasts by ADP ribosylation. Infect. Immun., 55: 1854-8, 1987.

Christensen, G. D.; Simpson, W. A. & Beachey, E. H. Microbial adherence in infection. *In*: Mandell; Douglas & Bennett. Principles and practice of infectious diseases. 2ed. Parte I, Seção A, Cap.2. pp.6-23. 1985.

Cleary, T. G.; Mathewson, J. J.; Faris, E. & Pickering, L. K. Shiga-like cytotoxin production by enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. Infect. Immun., 47: 335-7, 1983.

Conterpois, M., Martel, J. L.; Bordas, C.; Hayers, F.; Millet, A.; Ramisse, J. & Sendral, R. Fréquence des pili FY et K99 parmi des souches *Escherichia coli* isolées de veaux diarrheiques en France. Ann. Rech. Vet., 16: 25-8, 1985.

Cowan, M. M. & Fletcher, M. Rapid screening method for the detection of bacterial mutants with altered adhesion abilities. Journal of Microbiological Methods, 7: 241-249, 1987.

Cravioto, A.; Gross, R. J.; Scotland, S. M. & Rowe, B. Adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropahtogenic serotypes. Curr. Microbiol., 3: 95-9, 1979.

Cravioto, A.; Scotland, S. M. & Rowe, B. Hemagglutination activity and colonization factor antigens I and II enterotoxigenic and non-enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from humans. Infect. Immun., 36: 189-97, 1982.

Curtiss III, R; Maurelli, A. T. & Gulig, P. A. Genetic analysis of pathogenesis of enteric bacteria. *In*: Owen, P. & Foster, T. J. (eds.). Immunochemical and molecular genetic analysis of bacterial pathogens. cap.6. pp.67-81. Elsevier, 1988.

Daigneault-Sylvestre, N & Kluepfel, D. Method for rapid screening of cellulolytic streptomycetes and their mutants. Can. J. Microbiol, 25: 858-860, 1979.

Davis, B. D. & Minglioli, E. S. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12. J. Bacteriol., 60: 17-28, 1950.

Davis, C. P.; Avots-Avotins, A. E. & Fader, R. C. Evidence for a bladder cell glycolipid receptor for *Escherichia coli* and the effect of neuramic acid and colomic acid on adherence. Infect. Immun., 34: 944, 1981

De Graaf, F. K. & Klaasen, P. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of 987P fimbriae. Mol. Gen. Genet., 204: 75-81, 1986.

De Graaf, F. K. & Roorda, I. Production, purification, and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from calf enteropathogenic *Escherichia coli* B41M. Infect. Immun., 36: 751-3, 1982.

de Ree, J. M.; Schwillens, P. & van den Bosch, F. Molecular cloning of F11 fimbriae from a uropathogenic *Escherichia coli* and characterization of fimbriae with polyclonal and monoclonal antibodies. FEMS Microbiol. Lett., 29: 91-7, 1985.

Dean, A. G.; Ching, Y. C.; Williams, R. G. & Harden, L. B. Test for *Escherichia coli* enterotoxin of diarrhea in children in Honolulu. J. Infect. Dis., 125: 407-11, 1973.

Drasar, B. S. & Hill, M. J. Human intestinal flora. The distribution of bacterial flora in the intestine. London, Academic Press, 1974: 36-43.

Duguid, J. P. & Old, D. C. Adhesive properties of Enterobacteriaceae. *In*: Beachey, E. H. (ed.). Bacterial adherence (receptors and recognition). Ser. B. Vol. 6. p.184. London and Methuem, New York, Chapman and Hall, 1980.

DuPont, H. L.; Formal, S. B.; Hornick, R. B.; Snyder, M. J.; Libonati, J. P.; Sheahan, D. G.; LaBrec, E. H. & Kalas, J. P. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. N. Engl. J. Med., 285; 1-9, 1971.

Dykes, C. W.; Halliday, I. J.; Hobden, A. N.; Read, M. J. & Harford, S. A comparison of the nucelotide sequence of the A subunit of heat-labile enterotoxin and cholera toxin. FEMS Microbiol. Lett., 26; 171-4, 1985.

Echeverria, P.; Seriwatana, J.; Patamaroj, U.; Moseley, S. L.; McFarland, A.; Chityothin, O. & Chaicumpa, W. Prevalence of heat-stable II enterotoxigenic *Escherichia coli* in pigs, water, and people at farms in Thailan as determined by DNA hybridization. J. Clin. Microbiol., 19: 489-91, 1984.

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

Embden, J. D. A.; De Graaf, F. K.; Schouls, L. M. & Teppema, J. S. Cloning and expression of a deoxyribonucleic acid fragment that encodes for the adhesive antigen K99. Infect. Immun., 29: 1125-33, 1980.

Erskine, R. J.; Eberhart, R. J.; Grasso, P. J. & Scholz, R. W. Induction of *Escherichia coli* mastitis in cows fed selenium-deficient or selenium-supplemented diets. Am. J. Vet. Res., 50: 2093-100, 1989.

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: 725-30, 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 and O8. Infect. Immun., 21: 638-47, 1978.

Evans, D. G.; Evans, D. J., Jr.; Tjoa, W. S. & DuPont, H. L. Detection and characterization of colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea. Infect. Immun., 19: 727-36, 1978.

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: 656-67, 1975.

Evans, D. J., Jr.; Evans, D. G. & DuPont, H. L. Hemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* determined with human, bovine, chicken, and guinea pig erythrocytes in the presence and absence of mannose. Infect. Immun., 23: 336-46, 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: 235-42, 1980.

Ewing, W. H.; Davis, B. R. & Montague, T. S. Studies on the occurence of *Escherichia coli* serotypes associated with diarrheal disease. Atlanta, GA: US Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Communicable Disease Center, 1963 *apud* Levine, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J. Infect. Dis., 155(3): 377-389, 1987.

Firon, N.; Ofek, I & Sharon, N. Interaction of mannose-containing oligosaccharides with the fimbrial lectin of *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 105: 1426, 1982.

Formal, S. B. & Hornick, R. B. Invasive *Escherichia coli*. J. Infect. Dis., 137: 641-4, 1978.

Franklin, A.; Söderlind, O. & Möllby, R. Plasmids coding for enterotoxins, K88 atigen and colicins in porcine *Escherichia coli* strains of O-group 149. Med. Microbiol. Immunol., 170: 63-72, 1981.

Gaastra, W. & de Graaf, F. K. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Microbiol. Rev., 46(2): 129-161, 1982.

Girardeau, J. P.; Dubourguier, H. C. & Conterpois, M. Attachement des *Escherichia coli* enteropathogens a la muquese intestinale. Bull. Group. Tech. Vet., 190(4B):49-60, 1980.

Girardeau, J. P; Vartanian, M. Der; Ollier, J. L. & Conterpois, M. CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. Infect. Immun., 56(8): 2180-8, 1988.

Green, B. A.; Neil, R. J.; Ruyechan, W. T. & Holmes, R. K. Evidence that a new enterotoxin of *Escherichia coli* which activates adenylate cyclase in eucariotic target cell is not plasmid mediated. Infect. Immun., 41: 383-90, 1983.

Greenberg, R. N. & Guerrant, R. L. *E. coli* heat-stable enterotoxin. Pharmacol. Ther., 13: 507, 1980.

Guinée, P. A. M. & Jansen, W. H. Detection of enterotogenicity and attachment factors in *Escherichia coli* strains of humam, porcine, and bovine origin; a comparative study. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infectionskr. Hyg. Abt. Orig. Reihe A, 243: 245-57, 1979.

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: 676-8, 1977.

Gyles, C. L. Limitations of the infant mouse test for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins. Can. J. Comp. Med., 34: 337-40, 1979.

Hagberg, L.; Hull, R.; Hull, S. *et alii* Contribution of adhesion to bacterial persistence in the mouse urinary tract. Infect. Immun., 40: 265, 1983.

Hagbert, L.; Jodal, U.; Korhonen, T. K. *et alii* Adhesion, hemagglutination, and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections. Infect. Immun., 31: 564, 1981.

Hale, T. L.; Sansonetti, P. J.; Schad, P. A.; Austin, S. & Formal, S. B. Characterization of virulence plasmids and plasmid-associated outer membrane proteins in *Shigella flexneri, Shigella sonnei*, and *Escherichia coli*. Infect. Immun., 40: 340-50, 1983.

Hanson, M. S.; Hempel, J. & 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): 3350-8, 1988.

Hison, G. & Williams, P. H. Adhesins of pathogenic *Escherichia coli*. *In*: Hopwood, D. A. & Chater, K. E. Genetics of bacterial diversity. cap.14, pp.287-307. London, Academic Press, 1989.

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

Holmes, T. K.; Twiddy, E. M. & Pickett, C. L. Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun., 53: 464-73, 1986.

Honda, T.; Arita, M. & Miwatani, T. Characterization of new hydrophobic pili of human enterotoxigenic *Escherichia coli*: a possible new colonization factor. Infect. Immun., 43: 959-65, 1984.

Hughes, J. M.; Murad, F.; Chang, B. & Guerrant, R. L. Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. Nature, 271: 755-6, 1978.

Jackman, P. J. H. & Whiley, R. A. Microbial systematics, identification and fingerprinting based on electrophoretic analysis of proteins. Campinas, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, 1990.

Janke, B. H.; Francis, D. H.; Collins, J. E.; Libal, M. C.; Zeman, D. H.; Johson, D. D. & Neiger, R. D. Attaching and effacing *Escherichia coli* infection as a cause of diarrhea in young calves. J. Am. Vet. Med. Assoc., 196: 897-901, 1990.

Jayappa, H. G.; Goodnow, R. A. & 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: 350-4, 1985.

Jones, G. W. & Rutter, J. M. The association of K88 antigens with hemagglutination activity of porcine strains of *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol., 84: 135-44, 1974.

Karmali, M. A.; Petric, M.; Corazon, L.; Fleming, P. C.; Arbus, G. S. & Lior, H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. J. Infect. Dis., 151: 775-82, 1985.

Kauffman, F. The serology of the coli group. J. Immunol., 57: 71-100, 1947 *apud* Levine, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J. Infect. Dis., 155(3): 377-389, 1987.

Kauffmann, F. & Vahlne, G. Ueber die Bedeutung des serologischen Formenwechsels für die Bakteriophagen-wirkung in der Coli-Gruppe. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 22(B): 119-37, 1946 *apud* Gaastra, W. & de Graaf, F. K. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Microbiol. Rev., 46(2): 129-161, 1982.

Knutton, S.; Looyd, D. R. & McNeish, A. S. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. Infect. Immun., 55: 69-77, 1987.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London), 227: 680-5, 1970.

Leffler, H. & Svanborg-Edén, C. Glycolipid receptors for uropathogenic *Escherichia coli* on human erythrocytes and uroepithelial cells. Infect. Immun., 34: 920-9, 1981.

Leite, D. da S.; Garcia, M.; Yano, T. & Pestana de Castro, A. F. Detecção da adesina FY em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarréia no Brasil. Rev. Microbiol. (São Paulo), 20: 292-5, 1989.

Levine, M. M. *Escherichia coli* infections. *In*: Bacterial vaccines. cap.7, pp.187-235. London, Academic Press, 1984.

Levine, M. M. *Escherichia coli* infections. New England J. Med., 313: 445-7, 1985.

Levine, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J. Infect. Dis., 155(3): 377-389, 1987.

Levine, M. M.; Rennels, M. B.; Daya, V. & Hughes, T. P. Hemagglutination and colonization factors in enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* that cause diarrhea. J. Infect. Dis., 141(6): 733-7, 1980.

Levine, M. M.; Xu, J.; Kaper, J. B.; Lior, H.; Prado, V.; Tall, B.; Nataro, J.; Karch, H. & Wachsmuth, K. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis e hemolytic uremic syndrome. J. Infect. Dis., 156: 175-82, 1987.

Lintermans, P. F.; Pohl, P.; Bertels, A.; Charlie, G.; Vandekerckhove, J.; Van Damme, J.; Schoup, J.; Schilicker, C.; Korhonen, T.; De Greve, H. *et alii*. Characterization and purification of the F17 adhesin on the surface of bovine enteropathogenic and septicemic *Escherichia coli*. Am. J. Vet. Res., 49: 1794-9, 1988.

Lohuis, J. A.; Schukken, Y. H. & Kremer, W. D. *Escherichia coli*-mastitis bij het rund. II. Pathogenese en symptomatische therapie. Tijdschr Diergeneeskd, 114: 890-8, 1989.

Lund, B.; Lindberg, F.; Marklund, B.-I. & Normak, S. The PapG protein is the alpha-D-galactopyranosil-(1-->4)-beta-D-galactopyrano-binding adhesin of uropathogenic *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 5898-5902, 1987.

Marques, L. R. M.; Moore, M. A.; Wells, J. G.; Wachsmuth, I. K. & O'Brien, A. D. Production of Shiga-like toxins by *Escherichai coli*. J. Infect. Dis., 154: 338-41, 1986.

Marques, L. R. M.; Peiris, J. S. M.; Cryz, S. J. & O'Brien, A. D. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variante of Shiga-like toxin II. FEMS Microbiol. Let., 44: 33-8, 1987.

Mathewson, J. J.; Johnson, P. C.; DuPont, H. L.; Satterwhite, T. K & Winsor, D. K. Pathogenicity of enteroadherent *Escherichia coli*. J. Infect. Dis., 154: 524-7, 1986.

Mathewson, J. J.; Johnson, P. C.; DuPont, H. L.; Morgan, D. R.; Thornton, S. A.; Wood, L. V. & Ericson, C. D. A newly recognized cause of travelers' diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*. J. Infect. Dis., 151: 471-5, 1985.

Maurer, L. & Orndorff, P. E. Identification and characterization of genes determining receptor binding and pilus length of *Escherichia coli* type I pili. J. Bacteriol., 169: 640-5, 1987.

McConnell, M. M.; Thomas, L. V.; Scotland, S. M. & Rowe, B. The possession of coli surface antigen CS6 by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups 025, 027, 0148, and 0159: a possible colonization factor? Curr. Microbiol., 14: 51-4, 1986.

Millan, J. L. S.; Boyd, D.; Dalbey, R.; Wickner, W. & Beckwith, J. Use of phoA fusions to study the topology of the *Escherichia coli* inner membrane protein leader peptidase. J. Bacteriol., 171: 5536-41, 1989.

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

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: 281-283, 1985.

Moon, H. W.; Kohler, E. M.; Schneider, R. A. & Whipp, S. C. Prevalence of pilus antigens, enterotoxins types and enteropathogenicity among K88 negative enterotoxigenic *Escherichia coli* from neonatal pigs. Infect. Immun., 27: 222-30, 1980.

Moon, H. W.; Whipp, S. C.; Argenzio, R. A.; Levine, M. M. & Giannella, R. A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestins. Infect. Immun., 41: 1340-51, 1983.

Morris, J. A.; Chantermm, N. & Sherwood, D. Ocurrence and properties of FY(Att25)$^+$ *Escherichia coli* associated with diarrhoea in calves. The Veterinary Record, 121: 189-191, 1987.

Morris, J. A.; Sojka, W. J. & Ready, R. A. Serological comparison of the *Escherichia coli* prototype strains for the F(Y) and Att 25 adhesins implicated in neonatal diarrhoea in calves. Research in Veterinary Science, 38: 246-247, 1985.

Mouricout, M.; Petit, J. M.; Carias, J. R. & Julien, R. Glycoproteins glycans that inhibit adhesion of *Escherichia coli* mediated by K99 fimbriae: treatment of experimental colibacillosis. Infect. Immun., 58: 98-106, 1990.

Moxley, R. A. & Francis, D. H. Natural and experimental infection with an attaching and effacing strain of *Escherichia coli* in calves. Infect. Immun., 53: 339-46, 1986.

Nataro, J. P.; Scaletsky, I. C. A.; Kaper, J. B.; Levine, M. M. & Trabulsi, L. R. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun., 48: 378-83, 1985.

O'Brien, A. D. & Holmes, R. K. Shiga and Shiga-like toxins. Microbiol. Rev., 51: 206-20, 1987.

O'Brien, A. D.; LaVeck, G.; Thompson, M. R. & Formal, S. B. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. J. Infect. Dis., 146: 763-9, 1982.

Ofek, I.; Mosek, A. & Sharon, N. Mannose-specific adherence of *Escherichia coli* freshly excreted in the urine of patients with urinary tract infections and of isolates subcultured from the infected urine. Infect. Immun., 34: 708, 1981).

Orskov, I. & Orskov, F. Host parasite relationships in gram-negative infections. *In*: Hanson, L. A.; Kallos, P. & Westphal, O. (eds.). Progress in Allergy. Vol. 33. pp-80-105. Karger, Basel, 1983.

Overall, 1970 *apud* Levine, M. M. *Escherichia coli* infections. *In*: Bacterial vaccines. cap.7, pp.187-235. London, Academic Press, 1984.

Pearson, G. R.; Watson, C. A.; Hall, G. A. & Wray, C. Natural infection with an attaching and effacing *Escherichia coli* in the small and large intestines of a calf with diarrhoea. Vet. Rec., 124: 297-9, 1989.

Pohl, P.; Lintermans, P. & Van Muylen, K. Fréquence des adhésines K99 et Att25 chez les *Escherichia coli* du veau. Ann. Med. Vet., 128: 555-8, 1984.

Polotsky, Y. U. E.; Dragunskaya, E. M.; Seliverstova, V. G.; Avdeeva, T. A.; Chakhutinskaya, M. G.; Kétyi, I.; Vertényi, A.; Ralovich, B.; Emödy, L.; Málovics, I.; Safonova, N. V.; Snigirevskaya, E. S. & Karyagina, E. L. Pathogenic effect of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Escherichia coli* causing infantile diarrhoea. Acta. Microbiol. Hung., 24: 221-36, 1977.

Rene, P. & Silverblatt, F. Serological response to *Escherichia coli* pili in pyelonephritis. Infec. Immun., 37: 749, 1982.

Reynolds, D. J.; Morgan, J. H.; Chanter, N.; Jones, P. W.; Bridger, J. C.; Debney, T. G. & Bunch, K. J. Microbiology of calf diarrhoea in southern Britain. The Veterinary Record, 119: 34-39, 1986.

Riley, L. W.; Remis, R. S.; Helgerson, S. D.; McGee, H. B.; Wells, J. G.; Davis, B. R.; Herbert, R. J.; Olcott, E. S.; Johnson, L. M.; Hargrett, N. T.; Blake, P. A. & Cohen, M. L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med., 308: 681-5, 1982.

Rothbaum, R.; McAdams, A. J.; Gianella, R. & Partin, J. C. A clinicopathologic study of enterocyte-adherent *Escherichia coli*: a cause of protracted diarrhea in infants. Gastroenterol., 83: 441-54, 1982.

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

Scaletsky, I. C. A.; Silva, M. L. M. & Trabulsi, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*to HeLa cells. Infect. Immun., 45: 534-6, 1984.

Schukken, Y. H.; Kremer, W. D. & Lohuis, J. A. *Escherichia coli*-mastitis bij het rund. I. Klinische diagnostiek en epidemiologische aspecten. Tijdschr Diergeneeskd, 114: 829-38, 1989.

Scotland, S. M.; Smith, H. R. & Rowe, B. Two distinct toxins active in Vero cells from *Escherichia coli* O157. The Lancet., ii: 885-6, 1985.

Serafim, M. B.; Pestana de Castro, A. F.; Lemos dos Reis, M. H. & Trabulsi, L. R. Passive immune hemolysis for detection of heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli* isolated from different sources. Infect. Immun., 24: 606-10, 1979.

Serafim, M. B.; Pestana de Castro, A. F.; Leonardo, M. B. & Monteiro, A. R. A single radial immune hemolysis (SRIH) test for the detection of thermolabile (LT) enterotoxin of *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol., 14: 473-8, 1981.

Serafim, M. B.; Pestana de Castro, A. F.; Rangel, H. A. & Pustiglione Neto, L. Isolation of heat-stable enterotoxin-producing straisn of *Escherichia coli* isolated from cases of diarrhea in Campinas, SP, Brazil. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, 19: 144-7, 1977.

Serény, B. Experimental *Shigella* keratoconjunctivitis. A preliminary report. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 2: 293-6, 1955.

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. Immunol., 31(5): 417-26, 1987.

Silva, R. M.; Toledo, R. F. & Trabulsi, L. R. Biochemical and cultural characteristics of invasive *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol., 14: 441-4, 1980.

Simon, R.; Priefer, U. & Puhler, A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engeneering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Biotechnology, 1: 784-91, 1983.

Smith, H. R.; Scotland, S. M.; Chart, H. & Rowe, B. Vero cytotoxin production and presence of VT genes in strains of *Escherichia coli* and *Shigella*. FEMS Microbiol. Let., 42: 173-7, 1987.

Smith, H. R.; Scotland, S. M.; Stokes, N. & Rowe, B. Examination of strains belonging to entopathogenic *Escherichia coli* sorogroups for genes enconding EPEC adherence factor and Vero cytotoxins. J. Med. Microbiol., 31: 235-40, 1990.

Smyth, C. J. Two mannose-resistant haemagglutinins on enterotoxigenic *Escherichia coli* of serotype O6:K15:H16 or H- isolated from travellers' and infantile diarrhoea. J. Gen. Microbiol., 128: 2081-96, 1982.

Snodgrass, D. R.; Terzolo, H. R.; Sherwood, D.; Campbell, I.; Menzies, J. D. & Synge, B. A. Aetiology of diarrhoea in young calves. Vet. Rec., 119: 31-4, 1986.

Speirs, J. I.; Stavric, S. & Konowalchuk, J. Assay of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with vero cells. Infection and Immunity, 16(2): 617-622, 1977.

Strim, S.; Orskov, I. & Orskov, F. K88, an episome-determined protein antigen of *Escherichia coli*. Nature, 209: 507-8, 1966.

Strockbine, N. A.; Marques, L. R. M.; Newland, J. W.; Smith, H. W.; Holmes, R. K. & O'Brien, A. D. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. Infect. Immun., 53: 135-40, 1986.

Tacket, C. O.; Maneval, D. R. & Levine, M. M. Purufication, morphology, and genetics of a new fimbrial putative colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* O159:H4. Infect. Immun., 55: 1063-1069, 1987 *apud* Levine, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J. Infect. Dis., 155(3): 377-389, 1987.

Taylor, J. Host specificity and enteropathogenicity of *Escherichia coli*. J. Appl. Bacteriol., 3: 316-25, 1961 *apud* Levine, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J. Infect. Dis., 155(3): 377-389, 1987.

Taylor, R. K.; Manoil, C. & Mekalanos, J. J. Broad-host-range vectors for delivery of TnphoA: use in genetic analysis of secreted virulence determinants of *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol., 171(4): 1870-8, 1989.

Thomas, L. V.; Cravitoto, A.; Scotland, S. M. & Rowe, B. New fimbrial antigen type (E8775) that may represent a colonization factor in enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans. Infect. Immun., 35: 1119-24, 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: 2319-26, 1985.

Toledo, M. R. F. & Trabulsi, L. R. Correlation between biochemical and serological characteristics of *Escherichia coli* and results of the Serény test. J. Clin. Microbiol., 17: 419-21, 1983.

Ulshen, M. H. & Rollo, J. L. Pathogenesis of *Escherichia coli* gastroenteritis in man --- another mechanism. N. Engl. J. Med., 302: 99-101, 1980.

Van Die, I.; Wauben, M.; Van Megen, I.; Bergmans, H. *et alii* Genetic manipulation of major P-fimbrial subunits and consequences for formation of fimbriae. J. Bacteriol., 170(12): 5870-6, 1988.

Vial, P. A.; Robins-Browne, R.; Lior, H.; Prado, V.; Kaper, J. B.; Nataro, J. P.; Maneval, D.; Elsayed, A. & Levine, M. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. J. Infect. Dis., 158: 70-9, 1988.

Wanger, A. R.; Murray, B. E.; Echeverria, P.; Mathewson, J. J. & DuPont, H. L. Enteroinvasive *Escherichia coli* in travelers diarrhea. J. Infect. Dis., 158: 640-2, 1988.

Weil, E. & Felix, A. Ueber die Doppelnatur der Rezeptoren beim Paratyphus *B*. Wien. Klin. Wochenschr., 36: 986-8, 1918b *apud* Gaastra, W. & de Graaf, F. K. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Microbiol. Rev., 46(2): 129-161, 1982.

Weil, E. & Felix, A. Untersuchungen über die gewöhnlichen Proteusstämme und ihre Beziehungen zu den X-Stämme. Wien. Klin. Wochenschr., 23: 637-9, 1918a *apud* Gaastra, W. & de Graaf, F. K. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Microbiol. Rev., 46(2): 129-161, 1982.

Whipp, S. G.; Moon, H. W. & Argenzio, R. A. Comparison of enterotoxic activities of heat-stable enterotoxins from class 1 and class 2 *Escherichia coli* of swine origin. Infect. Immun., 31: 245-51, 1981.

Wray, C.; McLaren, I. & Pearson, G. R. Occurence of `attaching and effacing´ lesions in the small intestine of calves experimentalli infected with bovine isolates of verocytotoxic *Escherichia coli*. Vet. Rec., 125: 365-8, 1989.

Yamamoto, T.; Gojobori, T. & Yokota, T. Evolutionary origin of pathogenic determinants in enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* 01. J. Bacteriol., 169: 1352-7, 1987.

Yano, T.; Garcia, M.; Leite, D. S.; Camargo, I. J. B. de & Castro, A. F. P. de. Fimbria-like adhesive factor (EAF 44) from a verocytotoxigenic *Escherichia coli* of bovine origin. Res. Vet. Sci., 45: 418-9, 1988.

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

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, 171: 171-178, 1982.

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