

**PURIFICAÇÃO E SEQÜÊNCIA PARCIAL DE
AMINOÁCIDOS DA ADESINA 2134P ISOLADA DE
Escherichia coli ENTEROTOXIGÊNICA (ETEC).**

CLAUDIO ROBERTO NOBREGA AMORIM

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE BIOLOGIA DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM
BIOQUÍMICA.

ORIENTADORA: Profª Drª. MARIA SUMIKO
ARITA MATSUURA

Este exemplar corresponde à redação final
da tese () candidato a)
Claudio Roberto Nobrega
Amorim
e aprovada pela Comissão Julgadora.
19/8/96 Maria Arita

**CAMPINAS
1996**

CIDADE BC
 CHAMADA: 41 UNICAMP
Am 68p
 Ex. 28629
 NÚMERO BC/ 667196
 C ☐ D ☒
 VALOR R\$ 11,00
 DATA 19-08-96
 • CPD

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

Am68p

Amorim, Claudio Roberto Nobrega

Purificação e sequência parcial de aminoácidos da adesina 2134P isolada de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) / Claudio Roberto Nobrega Amorim. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Maria Sumiko Arita Matsuura.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Escherichia coli*. 2. Antígenos. 3. Aminoácido - Sequência. 4. Bactérias patogênicas. 5. Bioquímica. 6. Diarréia. I. Matsuura, Maria Sumiko Arita. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

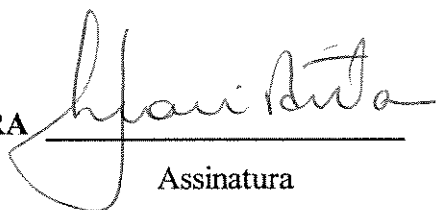
LOCAL E DATA:

CAMPINAS, 19 DE AGOSTO DE 1996

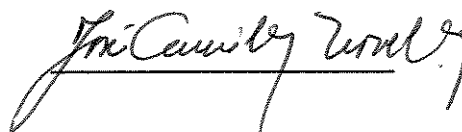
BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof.^a. Dr.^a. MARIA SUMIKO ARITA MATSUURA


Assinatura

Prof. Dr. JOSÉ CAMILLO NOVELLO


Assinatura

Prof. Dr. DOMINGOS DA SILVA LEITE


Assinatura

SUPLENTE:

Prof.^a. Dr.^a. NILCE CORRÊA MEIRELLES

Assinatura

APROVADO

*À minha Mãe, que com seu
amor, carinho, amizade e
coragem, serviram de exemplo
na minha conduta.*

*À Bia, que veio trazer mais
alegria para a nossa vida.*

*“Não se preocupe,
no final tudo
dá certo”.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^{ma} Dr^a Maria Sumiko Arita Matsuura, pela orientação, apoio, incentivo e conselhos durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, pela orientação, conselhos, apoio, incentivo, colaboração, por me agüentar durante todo este tempo e, principalmente pela grande amizade.

Ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, pelos ensinamentos, por toda a ajuda no dia-a-dia, e por participar da banca examinadora.

Ao Prof. Dr José Camillo Novello, pela participação na banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé, pelo apoio, colaboração, incentivo e por participar na banca examinadora.

À Prof^{ma} Dr^a Nilce Corrêa Meirelles, pelo apoio, colaboração, disposição no empréstimo de equipamentos e por participar da banca de qualificação.

À Prof^{ma} Dr^a Maria Sílvia Viccari Gatti, pelos ensinamentos, incentivo, apoio, colaboração e, principalmente, pela grande amizade.

À Prof^{ma} Dr^a Lucila Costallat Ricci, pelo apoio, colaboração e por permitir o uso da estrutura da pós-graduação da Microbiologia sempre que necessário.

Ao Prof. Dr. Lewis Joel Greene, do Centro Interdisciplinar de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pelo fornecimento de toda estrutura para o seqüenciamento de aminoácidos.

Ao Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada, do Departamento de Histologia e Embriologia - UNICAMP, pela ajuda nos procedimentos em microscopia eletrônica e fotografias.

Ao Sr. José César Rosa, do Centro Interdisciplinar de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pelo grande auxílio no seqüenciamento de proteínas.

Aos Professores do Curso de pós-graduação do Departamento de Bioquímica, por toda a ajuda intelectual e material.

Aos Professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pela convivência, disponibilidade de equipamentos e auxílio na resolução de problemas.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, pela disposição e ajuda.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pela disposição e ajuda.

Às Secretárias do Departamento de Bioquímica, Andréia e Marina, por toda ajuda na parte burocrática e pelo espírito prestativo sempre presente.

Às Secretárias do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Lúcia, Cleide e Lurdes, por toda ajuda na parte burocrática e pelo espírito prestativo sempre presente

Aos alunos do Curso de pós-graduação do Departamento de Bioquímica, pela convivência e amizade.

Aos alunos do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pela convivência e amizade.

À Mirtes, Isildinha, Terezinha, Jusceley, Ester e Airton, pela ajuda sempre que necessária.

Ao Carlos, Stella e Alessandra, pelo apoio, amizade e toda ajuda no dia-a-dia do laboratório

À Adriana de Souza, pela amizade e pela ajuda nos testes de aderência em células.

À Heloisa, pela grande amizade, apoio, ajuda e por sempre estar ao meu lado durante todos esses anos.

À Pan, Mickie e Valerinha, pela amizade, compreensão, apoio e ajuda sempre que necessário, dentro ou fora do laboratório.

À Cleide, Valéria, Beth, pela amizade e ajuda no laboratório.

Ao João, Artur, Marques, Nonaka e Lee, que tornaram a minha estada em Campinas mais agradável e divertida.

Ao Dante, Alexandre, Hélio e Eduardo, pela amizade e acolhida hospitaleira sempre que necessário.

Aos demais da turma, que se eu não parar de agradecer eu não termino a tese.

Ao meu pai, por todo amor, carinho, dedicação e apoio financeiro.

À minha família e aos meus amigos em Diadema, pelo apoio técnico, moral e financeiro durante todos esses anos.

À Marcia, que com seu amor, compreensão, carinho e amizade mudou completamente a minha vida nos últimos 16 meses.

À CAPES, CNPq e FAEP.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica clássica	4
2.2. <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva	4
2.3. <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	5
2.4. <i>Escherichia coli</i> enteroaderente ou enteroagregativa	6
2.5. <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica	6
2.5.1. Enterotoxinas	7
2.5.2. Adesinas	9
2.5.2.1. Fímbrias	10
2.6. Objetivos	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Amostra Bacteriana Padrão	16
3.2. Meios de cultura	16
3.3. Produção de antissoro	17
3.3.1. Detecção da adesina 2134P	17
3.4. Detecção das enterotoxinas	18
3.4.1. Detecção da enterotoxina termo-estável tipo I (STa)	18
3.4.2. Detecção da enterotoxina termo-estável tipo II (STb)	19
3.4.3. Detecção da enterotoxina termo-lábil (LT-I)	19
3.5. "Gold Immunolabeling"	20
3.6. Prova de Microhemaglutinação Manose Resistente (MHMR)	21
3.7. Teste de aderência em células	22
3.7.1. Preparo do tapete celular	22
3.7.2. Preparo do inóculo	22
3.7.3. Execução do teste	22
3.8. Purificação da adesina	23
3.8.1. Extração da adesina e precipitação com sulfato de amônio	23
3.8.2. Cromatografia em Sepharose CL 4B	24
3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	24
3.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) na presença de uréia	25
3.11. "Western Blotting"	26

3.12. Sequenciamento	27
4. RESULTADOS	29
4.1. Detecção da adesina 2134P	29
4.2. Detecção das enterotoxinas	30
4.3. "Gold Immunolabeling"	30
4.4. Prova de Microhemaglutinação Manose Resistente (MHMR)	31
4.5. Teste de aderência em células	31
4.6. Purificação da adesina	31
4.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	32
4.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) na presença de uréia	32
4.9. "Western Blotting"	32
4.10. Seqüenciamento	33
Tabelas e Figuras	34
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÕES	53
7. BIBLIOGRAFIA	55
8. APÊNDICE	70

ABREVIATURAS

ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EAgEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
ST	Enterotoxina termo-estável
LT	Enterotoxina termo-lábil
SLT	Shiga-like Toxin
VT	Verocitotoxina
CT	Toxina Colérica
KDa	Kilodaltons
CFA	Fator Antigênico de Colonização
TSA	Trypticase Soy Agar
TSB	Trypticase Soy Broth
CAYE	Casaminoacids Yeast Extract
MEA	Mínica+Alizarina+Eosina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
IHR	Imuno-Hemólise Radial
PBS	Tampão Salina Fosfatada
PBS-M	Tampão Salina Fosfatada+D-manose
BSA	Soro Albumina Bovina
MHMR	Microhemaglutinação Manose Resistente
MEM	Meio Mínimo Essencial de Eagle Modificado
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
TRIS	Trietil amino metano
PEG	Polietileno Glicol
IgG	Imunoglobulina G
PTH	Feniltiohidantoina
HPLC	High Performance Liquid Column

RESUMO

Colibacilose ocorre em leitões recém-nascidos e pós-desmame. A doença é caracterizada por diarreia aguda, desidratação progressiva e morte, o que leva a uma considerável perda econômica. Para a *Escherichia coli* causar doença, ela necessita de pelo menos dois fatores de virulência: a) produção de enterotoxinas e, b) produção de adesinas. A proposta deste estudo foi a detecção, isolamento, purificação e caracterização de uma nova adesina, conhecida como 2134P, em amostras de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) isoladas de leitões com diarreia no Brasil. Esta adesina foi detectada numa frequência alta (30,0%) em amostras de ETEC, que não expressavam as adesinas K88, K99, 987P, F41 e F42. Isto sugere um papel importante da adesina 2134P na enteropatogenia da colibacilose suína. A adesina 2134P isolada foi purificada por cromatografia em Sepharose CL 4B e analisada por SDS-PAGE corado com Coomassie Blue, apresentando uma única banda de 17 KDa., reconhecida pelo antissoro 2134P por “Western blot”. A técnica de “gold immunolabeling” revelou que a adesina 2134P é uma estrutura do tipo fimbria localizada na superfície da bactéria. A sequência dos quinze primeiros aminoácidos da porção N-terminal da adesina 2134P foi obtida, a qual apresentou uma homologia de 10 aminoácidos (66%) com a porção N-terminal da fimbria F107 (F18ab).

SUMMARY

Enterotoxigenic colibacillosis occurs in newborn piglets and weaned pigs. It is characterized by acute diarrhea, progressive dehydration and death in a few days which lead to considerable economic loss. Disease is caused by two main virulence factors of *Escherichia coli*: a) production of enterotoxins and, b) production of adhesins. The purpose of this study was the detection, isolation, purification and characterization of a novel adhesin, referred as 2134P, in *Escherichia coli* enterotoxigenic (ETEC) strains isolated from piglets with diarrhea in Brazil. This adhesin was detected in a high frequency (30.0%) in these ETEC strains, which didn't present the adhesins K88, K99, 987P, F41 and F42. It suggests the important role of adhesin 2134P in porcine enteropathogenesis. The adhesin 2134P was purified on Sepharose CL 4B column chromatography, and was analyzed by SDS-PAGE stained with Coomassie Blue, and presented only one band of approximately 17 KDa identified in Western blot using specific anti-2134P serum. Gold immunolabeling technique revealed that adhesin 2134P is a fimbrial structure on bacterial surface. It was obtained the first fifteen amino acids sequencing-signal of the N-termini portion of the adhesin 2134P, with a homology of 10 amino acids (66%) with the F107 (F18ab) fimbriae.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A bactéria *Escherichia coli*, da família *Enterobacteriaceae* é um bacilo gram-negativo, anaeróbico facultativo, membro da flora normal do homem, de mamíferos e de aves. Entretanto, algumas vezes, *E. coli* podem estar associadas também a infecções intra e extra-intestinais, tanto nos animais quanto no homem, e são classificados em diferentes grupos, de acordo com suas propriedades de virulência, interação com a mucosa dos hospedeiros, sintomas clínicos, epidemiologia e sorotipos (Donnenberg & Kaper, 1992).

Colibacilos relacionados à infecção intrainestinal estão classificados em 5 grupos: *E.coli* enterotoxigênica (ETEC), *E.coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E.coli* enterohemorrágica (EHEC), *E.coli* enteroagregativa (EAgEC), e *E.coli* enteroinvasiva (EIEC) (Levine, 1987).

Colibaciloses por *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC) em animais domésticos são freqüentes, afetando principalmente recém-nascidos e pós-desmame. É caracterizada por diarreia aguda, desidratação progressiva e morte em poucos dias, o que leva a uma considerável perda econômica (Morris & Sojka, 1985). Para causar doença, *E. coli* necessita de pelo menos dois fatores de virulência: 1) produzir enterotoxinas termo-estáveis (STa e STb) e/ou enterotoxinas termo-lábeis (LT-I e LT-II), que provocarão desequilíbrio salino nas células epiteliais do intestino delgado, levando à diarreia e, 2) produzir antígenos de aderência, conhecidos como adesinas, geralmente de estrutura fimbrial, ou fatores de colonização, que permitem à bactéria se aderir a receptores específicos nos enterócitos e colonizar o intestino do hospedeiro (Gyles, 1986; Holland, 1990). Após a adesão e colonização, a subsequente produção de enterotoxinas pela bactéria pode levar à diarreia. Cinco diferentes adesinas estavam relacionadas com ETEC suína, K88, K99, 987P, F41 e F42 (De Graaf & Mooi, 1986; Yano et al., 1986). Uma nova adesina conhecida como 2134P foi descrita em amostras de ETEC e era diferente biológica e sorologicamente daquelas até então descritas em ETEC suína (Casey et al., 1992).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As *Escherichia coli* patogênicas ao homem e aos animais podem causar tanto infecções entéricas (diarréia, disenteria, etc.) quanto extra-intestinais (bacteremia, urosepticemia, meningite, etc.).

As *Escherichia coli* causadoras de infecções entéricas possuem características próprias que as diferenciam entre si e, portanto, podem ser agrupadas em 5 grupos diferentes, sendo eles: *Escherichia coli* enteropatogênicas clássicas (EPEC), *Escherichia coli* enteroinvasivas (EIEC), *Escherichia coli* enterohemorrágicas (EHEC), *Escherichia coli* enteroaderentes ou enteroagregativas (EAEC) e, *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC) (Levine, 1987)

2.1. *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC)

As *Escherichia coli* enteropatogênicas clássicas são importantes, sendo a causa mais comum de diarreia infantil em países sub-desenvolvidos, principalmente em crianças com idade inferior a 2 anos (Sack, 1975; Trabulsi, 1981). Essas amostras causam o chamado “Attaching and Effacing”, processo de ligação da bactéria ao enterócito, seguida pela perda da microvilosidade, formação de pedestal e desorganização do citoesqueleto, possibilitando que a bactéria penetre à célula intestinal (Moon et al., 1983; Tzipori et al., 1989) ou às células HeLa e HEP-2 (Nataro et al., 1985). Este fenômeno foi também descrito em amostras isoladas de leitões (Janke et al., 1989) e em amostras relacionadas à doença do edema de suínos (Helie et al., 1991).

2.2. *Escherichia coli* enteroinvasivas (EIEC)

As *Escherichia coli* enteroinvasivas (EIEC) são importantes agentes causais de diarreia e disenteria (presença de muco, sangue e leucócitos nas fezes) infantil em países sub-desenvolvidos (Levine, 1987; Taylor et al., 1986, 1988) e em adultos, em países desenvolvidos (Levine, 1987). Essas bactérias destroem a borda ciliada das células epiteliais do intestino grosso, invadindo-as, causando morte celular, ulcerações e inflamação intestinal (Formal & Hornick, 1978; Levine, 1987, Wagner et al, 1988).

2.3. *Escherichia coli* enterohemorrágicas (EHEC)

As *Escherichia coli* enterohemorrágicas (EHEC) causam um quadro clínico semelhante àquele causado por amostras de EIEC, com exceção da ausência de febre e de leucócitos nas fezes (Levine, 1987). Estas bactérias são produtoras de citotoxinas denominadas “Shiga-like toxin” (SLT), também denominadas de verocitotoxina (VT), apresentando grande semelhança com a toxina de *Shigella dysenteriae*, podendo inclusive ser neutralizada com o mesmo antissoro (O’Brien & Holmes, 1987). Com a descoberta de uma nova toxina não neutralizável pelo antissoro anti-toxina de *Shigella*, estas toxinas foram então classificadas como SLT-I e SLT-II, respectivamente.

Em animais, uma nova citotoxina, denominada SLT-II variante (SLT-IIv) foi purificada por Marques et al. (1987), e têm sido relacionada com a doença do edema em suínos, uma doença freqüentemente fatal em leitões pré-desmame (Dobrescu, 1983; Linggood & Thompson, 1987; Marques et al., 1987).

A origem gênica das toxinas SLT-I e SLT-II está relacionada à presença de um bacteriófago nas amostras positivas, enquanto que para SLT-IIv, os genes são cromossomais (Mainil et al., 1989; Marques et al., 1987).

2.4. *Escherichia coli* enteroaderentes ou enteroagregativas (EAEC)

As *Escherichia coli* enteroaderentes ou enteroagregativas (EAEC) formam um grupo controverso de amostras de *Escherichia coli* associadas a diarreia humana, sem a presença de sangue e/ou leucócitos nas fezes. Pertencem a sorogrupos não tipáveis ou do tipo rugoso, identificadas pelas suas características de adesão à células HEp-2, do tipo agregativo, distinto da adesão localizada ou difusa, apresentado por amostras de EPEC. Essas amostras não produzem enterotoxinas ou citotoxinas (Mathewson et al., 1985; 1986; Levine, 1987; Vial et al., 1988).

2.5. *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC)

As amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC) constituem um grupo importante na patogenia da diarreia. As ETEC são consideradas, hoje em dia, uma das maiores causas de diarreia infantil em crianças de países sub-desenvolvidos (Aguero et al., 1985; Cravioto et al., 1988) ou diarreia dos viajantes (Merson et al., 1976).

Colibaciloses por ETEC são freqüentes em animais domésticos, afetando principalmente animais recém-nascidos e no período pós-desmame. Assim, ETEC é responsável por grandes danos econômicos na suinocultura e pecuária de bovino e ovinos (Gyles, 1986;

Holland, 1990). Para causar doença, *E. coli* necessita de pelo menos dois fatores de virulência conhecidos: 1) produzir enterotoxinas termo-estáveis (STa e STb) e/ou enterotoxinas termo-lábeis (LT-I e LT-II), que provocarão desequilíbrio salino nas células epiteliais do intestino delgado, levando à diarreia e, 2) produzir antígenos de aderência, conhecidos como adesinas, geralmente de estrutura fimbrial, ou fatores de colonização, que permitem à bactéria se aderir a receptores específicos nos enterócitos e colonizar o intestino. Após a adesão e colonização, a subsequente produção de enterotoxinas pode levar à diarreia.

Os fatores de virulência de ETEC serão, a seguir, descritos individualmente:

2.5.1. Enterotoxinas

Em 1967, Smith & Halls foram os primeiros a verificar que o sobrenadante da cultura de amostras de *E. coli* causavam acúmulo de líquidos em alça ligada de intestino de porco. Mais tarde, Smith & Gyles (1970) demonstraram a existência de dois tipos de enterotoxinas, as quais foram denominadas de termo-lábeis (LT), pois eram inativadas pelo calor (60°C por 15 minutos), e de termo-estáveis (ST), pois eram estáveis a 100°C por 15 minutos.

São conhecidas, atualmente, duas classes de enterotoxinas termo-lábeis, denominadas LT-I e LT-II. A enterotoxina LT-I é uma proteína de alto peso molecular (entre 85 e 90 KDa.), apresentando uma subunidade A e cinco subunidades B, imunogênica,

similar biológica e estruturalmente à toxina colérica (CT) da *Vibrio cholerae* (Honda et al., 1981; Yamamoto et al., 1987). Esta enterotoxina apresenta pelo menos duas variações: LTh (LT humana) e LTp (LT suína), que apresentam pequenas diferenças antigênicas. Estas enterotoxinas promovem uma elevação nos níveis de AMP cíclico intracelular (adenosina-3,5-monofosfato) em enterócitos, resultando na secreção de líquido para a luz intestinal (Honda et al., 1981). A enterotoxina LT-II é semelhante à LT-I quanto à atividade citotônica em células Vero, não sendo, contudo, neutralizada pelos soros anti-LT-I e anti-CT (Guth et al., 1986). Em 1986, Holmes et al. purificaram a LT-II, estabelecendo que a toxina é de natureza protéica, com peso molecular de 87 KDa., composta por uma subunidade A e cinco subunidades B com peso molecular de 28 e 11.8 KDa., respectivamente.

Burgess et al. (1978) demonstraram a existência de dois tipos de ST: STa e STb. A STa, solúvel em metanol, é ativa no intestino de camundongos recém-nascidos. É um peptídeo de baixo peso molecular (18 ou 19 resíduos de aminoácidos, Lazure et al., 1983; Thompson & Giannella, 1985), não imunogênico e sua ação resulta em secreção de líquidos para a luz intestinal com conseqüente diarreia. Esta enterotoxina possui duas variantes: a STp (ST suína) e a STh (ST humana). A STb é insolúvel em metanol, é um peptídeo de baixo peso molecular (48 resíduos de aminoácidos, Fujii et al., 1991), sensível a proteases e ativa em intestino de porcos desmamados, sendo que ela também altera o equilíbrio hidrossalino da mucosa do intestino delgado.

2.5.2. Adesinas

A superfície da *E. coli* é coberta por substâncias capazes de provocar reações imunológicas, as quais são comumente usadas para a classificação sorológica de amostras patogênicas e não patogênicas. Esses antígenos de superfície incluem substâncias conhecidas como adesinas, as quais são responsáveis pela ligação das bactérias à mucosa epitelial. Os antígenos de *E. coli* mais comuns são os antígenos O, K e H. A terminologia O (do alemão: Ohne Hauch) e H (do alemão: Hauch), introduzidas por Weil & Felix (1918a; 1918b), é usada para os antígenos somático (O) e flagelar (H). Os antígenos somáticos O são complexos lipopolissacarídeos e constituem parte da membrana externa. Eles são termoestáveis e não são inativados por temperaturas de 100°C ou 121°C. Os antígenos flagelares H são de natureza protéica e são inativados a 100°C. O termo antígeno K (do alemão: Kapsel) foi introduzido por Kauffmann & Vahlne. Eles são normalmente polissacarídeos ácidos os quais formam um envelope ou cápsula em torno da parede celular.

A capacidade de certas bactérias em se aderir à células eucarióticas é reconhecida como um fator fundamental para a colonização de tecidos do hospedeiro “in vivo”. Para muitos organismos patogênicos, a aderência é de fundamental importância, visto que eles têm que competir com os microorganismos comensais para ter sucesso na colonização da superfície das células epiteliais do hospedeiro. Mecanismos específicos de adesão parecem desempenhar um importante

papel na ligação da *Escherichia coli* a vários tecidos epiteliais. A colonização do epitélio é mediado por adesinas específicas com as quais a bactéria pode resistir à ação peristáltica do intestino.

2.5.3.1. Fímbrias

Esses antígenos de superfície, os quais conferem propriedades adesivas nas amostras enterotoxigênicas têm sido identificados como apêndices protéicos, não flagelares, filamentosos, normalmente de 7nm de diâmetro e de 0,2 a 2µm de comprimento, presentes na superfície da bactéria. A existência deste tipo de apêndice na superfície de diferentes espécies de bactérias já era relatado em 1949 por Anderson e por Houwink & van Iterson (1950). As terminologias mais comuns para essas estruturas são “fímbrias” (do latim “fio, linha” ou “fibra”), introduzida por Duguid et al. (1955), e “pili” (do latim “pêlo” ou “estrutura tipo pêlo”), introduzida por Brinton (1959). Ottow (1975) e Jones (1977) recomendam o uso do termo fímbria para organelas adesivas, e pili para apêndice sexual. Fímbrias são mais finas e mais numerosas do que os flagelos e conferem à bactéria propriedades adesivas, incluindo a atividade hemaglutinante.

Brinton (1965) e Duguid et al. (1966) distinguiram diversos tipos de fímbrias entre a família *Enterobacteriaceae*, principalmente baseados na sua morfologia e propriedades hemaglutinantes. O tipo mais comum de fímbria foi chamado de Fímbria tipo 1. A maioria das amostras de *E. coli*

patogênicas e não patogênicas produzem Fímbria tipo 1. Essas fímbrias são capazes de aderir a uma grande variedade de células eucarióticas, isto é, eritrócitos de diversas espécies animais (Salit & Gotschlich, 1977), leucócitos (Blumenstock & Jann, 1982), células epiteliais (Ofek & Beachey, 1978), e muitas outras células animais, vegetais e até de fungos (Duguid & Old, 1980). As propriedades adesivas da Fímbria tipo 1 são inibidas por D-manose. A Fímbria tipo 1 é a mais universal das fímbrias de *E. coli*. Seu peso molecular está próximo de 17 KDa., sua estrutura é rígida e os genes para sua codificação são encontrados no cromossomo da bactéria.

Um outro tipo de antígeno de aderência, chamado de K88, foi primeiramente descrito em 1961, por Ørskov et al., num trabalho sobre a análise sorológica de amostras de *E. coli* freqüentemente isoladas da doença do edema e de enterite em suínos. Este fator de colonização pode apresentar três variantes sorológicas denominadas K88ab, K88ac e K88ad, tendo o K88a como antígeno comum (Guinée & Jansen, 1979). O peso molecular de K88 varia de 23 KDa até 27,5 KDa, devido às suas variantes, sua estrutura é flexível e os genes que as codificam estão presentes em plasmídeos. Foi estabelecido que a fímbria K88 hemaglutina eritrócitos de cobaio e de galinha na presença de D-manose (Brinton, 1965; Duguid et al., 1955; Jones & Rutter, 1974; Salit & Gotschlich, 1977; Stirm et al, 1967a; 1967b). Desde a descoberta do antígeno K88, os antígenos de superfície característicos de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) suína têm atraído considerável atenção.

Foi reconhecido que diarreia neonatal suína era caracterizada pela proliferação de certos sorotipos de *E. coli* no intestino delgado, muitos dos quais apresentavam o antígeno K88 na sua superfície (Sojka, 1973). A capacidade destas amostras proliferarem e causarem doença tem sido atribuída às suas propriedades aderentes ao epitélio intestinal de leitões (Arbuckle, 1970; Bertschinger et al., 1972; Dress & Waxler, 1970; Wilson & Hohmann, 1974). Mais recentemente, Nagy et al. (1976; 1977) relataram a colonização do intestino delgado de suínos por amostras de ETEC que não apresentavam o antígeno K88. Nestas amostras foi encontrado outra adesina, denominada de 987P. Sua codificação pode ser tanto plasmidial quanto cromossômica, seu peso molecular está próximo de 20 KDa. e sua estrutura é rígida. Esta fimbria não demonstra nenhuma atividade hemaglutinante com hemácias animais que são normalmente utilizadas nos testes de microhemaglutinação (hemácias de cobaio, galinha, cavalo, boi, carneiro e, humana)(Isaacson & Richter, 1981).

Em 1972, Smith e Linggood relataram a descoberta feita por Sojka na qual muitas amostras enteropatogênicas para cordeiros e bezerros, embora tendo antígenos O diferentes, possuíam um antígeno K comum ou fortemente relacionado. Este antígeno foi chamado de “antígeno K comum”, Kco, e foi posteriormente designado como K99 (Ørskov et al., 1975). Amostras K99 positivas proliferam no intestino delgado ao passo que as amostras K99 negativas não. Por este motivo, foi concebido que o antígeno K99 funciona da mesma maneira que o K88 por facilitar a adesão da bactéria ao epitélio intestinal (Burrows et al., 1976). Sua estrutura é flexível, sua codificação é plasmidial e o seu peso molecular está próximo de 16,5 KDa. A fimbria

K99 aglutina eritrócitos de cavalo e de carneiro na presença de D-manose (Gaastra & DeGraaf, 1982).

Um antígeno de superfície, com características similares ao antígeno K88, em ETEC de origem humana foi primeiramente descrito por Evans et al. (1975). Este antígeno foi encontrado numa amostra de *E. coli* (H-10407) isolada da diarreia líquida de um paciente com diarreia severa do tipo colérica em Dacca, Bangladesh, e foi chamado de fator antigênico de colonização (CFA). Este antígeno de superfície foi chamado de CFA/I quando um segundo, imunologicamente distinto, antígeno de superfície de ETEC humana foi descoberto. O segundo antígeno de superfície foi, conseqüentemente, chamado de CFA/II, sendo que este apresenta três tipos distintos: CS1, CS2 e CS3 (Evans & Evans, 1978; Smyth, 1982). Mais recentemente outros dois tipos de CFA foram descritos, CFA/III e CFA/IV, este último também com três tipos distintos: CS4, CS5 e CS6 (McConnel et al., 1989). A codificação de todos os CFAs é plasmidial, seus pesos moleculares ficam entre 15KDa e 21KDa e suas estruturas são rígidas, exceto para CS3 e CS6.

Em 1982, De Graaf e Roorda purificaram e caracterizaram um novo antígeno de superfície, isolado de casos de diarreia em bovinos. Este antígeno foi chamado de F41. Ele foi caracterizado como uma estrutura filamentosa flexível composta de subunidades de proteína com um peso molecular de 29.500. O antígeno de aderência F41 tem um diâmetro de 3.2nm, sendo um pouco mais fino que o antígeno de aderência K99. Sua codificação é cromossômica e

demonstra atividade hemaglutinante frente a hemácias de cavalo, carneiro, cobaio e humana (Gaastra & De Graaf, 1982).

Um novo fator de colonização foi descrito por Yano et al. (1986) em amostras de *E. coli* de origem suína. Este antígeno, denominado F42, apresenta hemaglutinação com eritrócitos de cobaio, cavalo, carneiro, galinha e humano na presença de D-manose. Sua codificação é plasmidial (Silveira et al., 1987), seu ponto isoelétrico é em pH 3,2 e seu peso molecular está próximo de 31 KDa. (Leite et al., 1988.)

Bertschinger et al. (1990) descreveram uma nova fimbria, chamada de F107 na amostras de *E. coli* 107/86 (O139:K82) isolada de leitões com diarreia pós-desmame. Mais tarde, a fimbria F107 foi detectada em *E. coli* isoladas da doença do edema (Imberechts et al., 1992) e diarreia pós-desmame (Imberechts et al., 1994a; 1994b). Salajka et al. (1991; 1992) encontrou um novo fator de aderência, designado como 8813, em ETEC suína. Em 1992, um outro antígeno de aderência, chamado de 2134P foi descrito em amostras de ETEC isoladas de diarreia pós-desmame suína (Casey et al, 1992; Nagy et al., 1992). Sorg (1992) observou que as fimbrias F107 e 2134P possuíam determinantes antigênicos fimbriais comuns. Após isto, Rippinger et al. (1995) propuseram as designações fimbria F18ab para F107 e F18ac para as adesinas 2134P e 8813. Kennan et al. (1995) relataram a presença destas adesinas na Suécia em leitões com diarreia. Wittig et al. (1995) relacionou genes para a produção de enterotoxinas e/ou verotoxinas em amostras que expressavam as fimbrias da família F18.

A adesina 2134P é uma proteína de peso molecular aproximado de 17 KDa. e seu diâmetro é de aproximadamente 4nm (Nagy et al., 1992; Dean-Nystrom et al., 1993)

2.6. Objetivos

Os objetivos deste trabalho são:

- 1 - isolar a adesina 2134P da bactéria;
- 2 - purificar a adesina em alto grau de pureza;
- 3-caracterização sorológica, biológica e bioquímica da adesina;
- 4 - fazer o seqüenciamento da porção N-terminal da adesina;
- 5 - realizar o estudo epidemiológico da adesina nas amostras de ETEC isoladas de leitões com diarreia no Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostra Bacteriana Padrão

A amostra de *E. coli* padrão 2134 (O157 : H19) foi gentilmente cedida pelo Dr. H. W. Moon, NADC, Ames., IA, USA.

3.2. Meio de cultura

O cultivo da amostra de *E. coli* 2134 foi realizado em Trypticase Soy Agar (TSA), conforme recomendado por Casey et al., 1992) e em meio Minca (Guinée et al. 1977) suplementado com eosina alcoólica a 0.125% e amarelo de alizarina a 0,062%, sob condições microaeróbicas (técnica da vela) ou não (Wittig et al., 1994).

3.3. Produção de antissoro

O soro de coelho anti-2134P foi preparado, essencialmente como recomendado por Edwards e Ewing (1972) para o preparo de antissoros OK. Os coelhos adultos foram imunizados com suspensões da amostra *E. coli* 2134 cultivada em TSA, à 37°C por 18 hs. O antissoro específico para a adesina foi preparado através de absorção exaustiva do antissoro obtido em coelho com a amostra de *E. coli* homóloga, cultivada à 16°C por 72 horas, em meio de cultura TSA, como recomendado por Casey et al.(1992).

3.3.1. Detecção da adesina 2134P

Oitenta amostras de ETEC isoladas no Brasil de leitões com diarreia que não expressavam nenhuma das adesinas conhecidas (K88, K99, 987P, F41 e F42) foram examinadas para a presença da adesina 2134P. Todas as amostras de ETEC foram cultivadas em Trypticase Soy Agar (TSA-Difco) à 37°C "overnight" e em meio Minca (Guinée et al. 1977) suplementado com eosina alcoólica a 0.125% e amarelo de alizarina a 0,062%, sob condições microaeróbicas (método da vela) ou não (Wittig et al., 1994). A adesina 2134P foi detectada usando o antissoro específico para esta adesina através do método de soroaglutinação em lâmina.

3.4. Detecção das enterotoxinas

3.4.1. Detecção da enterotoxina termo-estável tipo I (STa)

A atividade enterotoxigênica foi determinada por métodos biológicos (Dean et al., 1972; Speirs et al., 1977) e foram confirmados através de hibridização de DNA, com sondas específicas, conforme descrito por Blanco et al. (1994).

As amostras de *E. coli* foram cultivadas em 10 ml do meio CAYE, em erlenmeyer de 125 ml, e incubadas à 37°C sob agitação (150 rpm), por 18 horas. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas, a 4.000 rpm por 40 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e mantidos à 4°C até a realização do teste.

Na detecção da produção da enterotoxina STa foi utilizado o método do camundongo recém-nascido (Dean et al., 1972).

Em 1 ml do sobrenadante de cada cultura foi adicionado uma gota da solução azul de Evans a 2% e, a seguir, 0,1 ml desta solução foi inoculada em camundongos recém-nascido (3-4 dias) por via intragástrica ou oral. Para cada amostra bacteriana testada foram inoculados 3 camundongos. Os animais foram mantidos à temperatura ambiente por 4 horas e, após esse período, foram sacrificados com éter e seus intestinos removidos. Os intestinos e carcaças de cada grupo foram pesados separadamente e, pelo valores obtidos na pesagem, estabeleceu-se a relação peso do intestino/peso da carcaça. Considerou-se positiva a amostra que apresentou um valor igual ou superior a 0,085.

3.4.2. Detecção da enterotoxina termo-estável tipo II (STb)

Os testes para detectar a produção da enterotoxina STb pelas amostras de *E. coli* foram realizados através de hibridização de DNA, com probes específicos, conforme descrito por Blanco et al. (1994).

3.4.3. Detecção da enterotoxina termo-lábil (LT-I)

Na detecção da produção da enterotoxina LT-I foram utilizados métodos sorológicos, a Imuno-Hemólise Radial (Yano et al., 1982), que foram confirmados através de hibridização de DNA, com sondas específicas, conforme descrito por Blanco et al. (1994).

Os testes de Imuno-Hemólise Radial foram realizados utilizando-se sangue de carneiro, coletado em solução de Alsever, que foi centrifugado a 2.000 rpm, sob refrigeração, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado, centrifugando-o por três vezes em tampão Trietanolamina a 1.500 rpm/4°C por 10 minutos. A hemácia foi suspensa a 5% em tampão Trietanolamina. Um volume de 2 ml desta suspensão foi adicionado a 20 ml de agarose 1%, à temperatura de 45°C, resultando numa concentração final de 0,5% de hemácias no gel. O gel foi vertido em placas e, após a solidificação, preparados orifícios de 5 mm no gel. Nestes orifícios foram adicionados 20 µl de sobrenadante das amostras bacterianas em teste. A seguir, foram mantidas em câmara úmida por 18 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, em cada orifício do gel foram adicionados 20 µl de anti-

toxina colérica (1:30) e as placas mantidas sob as mesmas condições por mais 4 horas. Após este período, foi adicionado o soro de cobaio (1:10), como fonte de complemento, diluído em tampão Trietanolamina, por toda a superfície do gel. As placas foram mantidas à 37°C em câmara úmida por 18 horas. As amostras que formaram regiões de hemólise (halos claros) ao redor dos orifícios, foram consideradas positivas.

3.5. "Gold Immunolabeling"

Estruturas da adesina 2134P foram observadas na amostras padrão 2134 e em uma outra amostra 2134P positiva detectada em nosso laboratório. Estas amostras foram cultivadas em TSA à 37°C e à 16°C e ensaiadas pela técnica de "immunolabeling" (Kennan & Monkton, 1990), utilizando soro anti-IgG de coelho marcado com ouro coloidal (Sigma).

A bactéria foi diluída em salina fisiológica e aplicada (50 µl) sobre a tela de cobre para microscopia eletrônica após o que, foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. O excesso foi secado com papel de filtro e deixado à temperatura ambiente por mais 30 minutos. Após isto, foi feito o bloqueio com PBS+BSA (0,5%) por 30 minutos. A lâmina (tela) foi incubada com o antissoro 2134P (anticorpo primário) por 1 hora, e depois lavada com PBS. Depois de lavada, a lâmina foi incubada com o anticorpo marcado com ouro coloidal (anticorpo secundário) por 30 minutos. A lâmina foi lavada com água por 10 minutos e, depois, fixada com glutaraldeído (2,5%) por 5 minutos. Após a fixação, foi lavada com água e deixada para secar à temperatura ambiente por 1 hora. Após a secagem, foi corada com acetato de uranila (2% em água) por 5 minutos.

A leitura das lâminas foi feita em um microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss), operado a 80 KW.

3.6. Prova de Microhemaglutinação Manose-Resistente (MHMR)

Eritrócitos de cobaio, de galinha e humano, foram coletados no dia do experimento, utilizando-se solução de citrato de sódio a 3,8%, como anticoagulante. Os eritrócitos de cavalo e boi foram coletados assepticamente em solução de Alsever e conservadas à 4°C. As hemácias foram lavadas três vezes com salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 1% de manose (Difco) (PBS-M) e utilizadas na concentração de 1%.

Para a realização da prova de MHMR foram utilizadas placas de microtítulo (Falcon Plastics) de base côncava. Suspensão bacteriana foi diluída em série, à razão 2, diretamente nas placas de microtítulo, em volumes de 50 µl, utilizando-se como diluente PBS-M. Sobre estas diluições aplicou-se igual volume de suspensão de eritrócitos a 1,5%. Durante a realização do ensaio, os componentes foram mantidos em banho de gelo, conforme recomendação de Jones & Rutter (1974). As placas foram incubadas por pelo menos 1 hora à 4°C, quando, então, procedeu-se a leitura da prova.

3.7 Teste de adesão em células

3.7.1. Preparo do tapete celular

As células HEp-2 foram cultivadas em placas de cultura de tecido (Falcon Plastics) de 24 orifícios, contendo no seu interior lamínulas. Cada orifício recebeu 1 ml de meio Eagle (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. As células foram acrescentadas na concentração de 2×10^4 células/ml. Depois de pronta, a placa foi incubada à 37°C e 5% de CO₂ até atingir a semiconfluência do tapete, o que levou 48 horas.

3.7.2. Preparo do inóculo

O inóculo consistiu de cultura bacteriana em Trypticase Soy Broth (TSB-Difco) num volume de 3 ml por tubo. No momento do teste, cada tubo foi agitado individualmente para a sua homogeneização.

3.7.3. Execução do teste de adesão

No momento do teste, as placas de cultura de tecido foram lavadas com PBS (0,01 M, pH 7,4), 1 ml por orifício, por 3 vezes para a retirada do antibiótico. Após lavagem, foi repostado 0,9 ml de meio Eagle/orifício acrescentando-se 1% de D-manose estéril. O inóculo foi acrescentado em volume de 100 µl, sempre em duplicata (dois orifícios para cada amostra). A placa, então, foi incubada à 37°C por 3 horas.

Após o período de incubação, o “tapete celular” foi lavado por 10 vezes com PBS, fixado com metanol (1 ml/orifício) por, no mínimo, 15 minutos, e corado com os corantes May-Grünwald por 5 minutos e Giemsa por 20 minutos. Depois de secas, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro para observação em microscópio óptico.

3.8. Purificação da adesina

3.8.1. Extração da adesina e precipitação com sulfato de amônio

O antígeno 2134P foi purificado conforme descrito por Dean-Nystrom (1993) com modificações. A amostra de *E. coli* padrão 2134 foi cultivada em Trypticase Soy Broth (TSB - Difco) à 37°C por 18 horas sob agitação (150 rpm). Em seguida centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos, o precipitado coletado foi ressuspenso em tampão fosfato (0,05 M) com salina (0,15 M) - PBS - e “sheared” em um mixer por 2 minutos (2 vezes). Após isto, o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos; o sobrenadante foi coletado e precipitado com sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ a 60% de saturação à 4°C. O material foi então centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos e o precipitado foi ressuspenso em tampão fosfato 0,5 M contendo 13 mM de Triton X-100. Logo após o material foi dialisado exaustivamente em tampão fosfato 0,5 M

3.8.2. Cromatografia em Sepharose CL 4B

Logo após a diálise do material em tampão fosfato 0,5 M, a amostra foi aplicada em uma coluna de cromatografia Sepharose CL 4B equilibrada com o mesmo tampão. As frações coletadas foram concentradas com polietilenoglicol (PEG) e testadas em um gel de ágar noble (Difco) a 1% para o teste de imunodifusão, e em SDS-PAGE, a fim de se identificar o pico no qual se encontrava a adesina. Este procedimento foi repetido até a obtenção do material puro.

3.9. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

Análises eletroforéticas foram feitas segundo Laemmli (1970) utilizando minigéis de poliacrilamida a 10%. A montagem dos géis e condições de corrida seguiram a metodologia descrita no “Hoefer Electrophoresis Catalog and Exercises” (1991).

As amostras protéicas foram tratadas com tampão de amostra 2 vezes concentrado (0,125 M de Tris-HCl, Sigma, pH 6,8; 4% de SDS Sigma; 20% de glicerol, Reagen; 10% de β -mercaptoetanol, Sigma e 0,5% de Azul de bromofenol, Merck), aquecidas em banho-maria fervente por 5 minutos e aplicadas nas canaletas do gel. A corrida eletroforética consistiu na aplicação de uma corrente de 100 Volts por aproximadamente 3 horas, ou até que o indicador (azul de bromofenol) atingisse o final do gel de separação. Como marcadores de peso molecular, utilizamos os seguintes marcadores: Fosfolipase B (94.000), Albumina (67.000), Ovalbumina (43.000), Anidrase Carbônica (30.000),

Inibidor de Tripsina (20.100) e Lactoalbumina (14.400), encontrados no “kit” de baixo peso molecular da Pharmacia.

Os géis foram corados com Coomassie Blue (Fairbanks et al., 1971). Após a eletroforese, o gel de poliacrilamida-SDS foi transferido para um recipiente contendo solução corante/fixador (0,125% de Coomassie Blue R-250, Sigma; 50% de metanol, Merck e 10% de ácido acético, Merck) por 1 hora sob agitação ocasional. Após este período, o gel foi imerso na solução de descoloração I (50% de metanol e 10% de ácido acético), mantido sob agitação constante por 1 hora. A seguir, a solução I foi substituída pela solução de descoloração II (ácido acético a 7% e metanol a 5%) sob agitação ocasional por 2 horas. O procedimento foi repetido com a solução II até a completa remoção da cor de fundo existente no gel.

3.10. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) na presença de uréia

O número de subunidades diferentes da adesina foi determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% em presença de uréia 6M e Triton X-100 2%, segundo descrito no método de Alter et al. (1980). Foram realizadas duas pré-eletroforeses, a primeira utilizando como solução de corrida ácido acético 5% e desenvolvida com a voltagem de 120V e 26mA, durante uma hora e a segunda ácido acético 5% e β mercaptoetanol 1,3M com 110V e 16mA, durante 45 minutos. A seguir, a eletroforese foi realizada, utilizando como solução de corrida ácido acético 5%, aplicando no gel amostras de 15 μ l da adesina pura contendo uréia 6M, ácido acético e β mercaptoetanol 1,3 M, a qual foi

desenvolvida usando 105 V e 12 mA por 4 horas à 25°C. Na coloração e fixação do gel foi usado "Comassie blue" R em metanol, ácido acético e água, como descrito para eletroforese convencional.

3.11. "Western Blotting"

Para o "western blot", os antígenos bacterianos foram separados por SDS-PAGE e transferidos para filtros de nitrocelulose de 0,45µm e reagidos com o soro policlonal anti-2134P e proteína A conjugada com peroxidase (Towbin, 1979).

Após realizada a SDS-PAGE, o gel foi colocado sobre papel de nitrocelulose, previamente recortado no tamanho do gel, e montado no suporte da cuba de transferência contendo tampão específico (0,063 M de Tris; 0,48 M de glicina, Ecibra; e 20% de metanol, pH 8,3).

A transferência das proteínas do gel para o papel de nitrocelulose foi realizada durante 120 minutos à temperatura ambiente, aplicando uma diferença de potencial de 80 Volts. Para a visualização das bandas transferidas, o papel de nitrocelulose foi imerso em solução de Ponceau 3R a 0,5% em ácido acético a 5% por 10 minutos. Após o reconhecimento das bandas transferidas, os radicais livres do papel foram bloqueados pela imersão deste em solução de leite Molico a 5% em PBS (tampão fosfato 0,05 M; NaCl 0,15 M; pH 7,4) gelado por 30 minutos e lavado por 3 vezes com PBS.

Após as lavagens, o papel foi imerso em soro de coelho anti-2134P absorvido e diluído 1:200 com PBS. Ao final de 1 hora de incubação à temperatura ambiente, repetiu-se as lavagens com PBS.

Imunoglobulina G (IgG) de carneiro anti-IgG de coelho, conjugada com peroxidase (Sigma), foi utilizada como segundo anticorpo, que após diluição apropriada (1:1000) em PBS foi aplicado sobre o papel em volume suficiente para cobri-lo. Após 1 hora de incubação em temperatura ambiente, o papel foi novamente lavado por 3 vezes com PBS.

A revelação foi realizada submergindo o papel de nitrocelulose por até 10 minutos em solução de Diaminobenzidina (5 mg dissolvidos em 30 ml de PBS) contendo 150 µl de peróxido de hidrogênio (30 volumes). A reação foi interrompida pela lavagem do papel de nitrocelulose em água destilada. O papel foi então colocado entre papel filtro para a secagem sendo posteriormente fotografado.

3.12. Seqüenciamento

O seqüenciamento automático de peptídeos e proteínas foi realizado através de seqüenciador construído no Centro de Química de Proteínas-FMRP-USP em colaboração com o Prof. Dr. Bill Kohr, seu inventor e patenteador. A montagem da coluna foi realizada com 5mg de sílica na extremidade inferior e 8mg de resina C₁₈ na porção superior. A coluna foi lavada com três injeções de 0,5ml de metanol e três injeções de 0,5ml de solução aquosa de TFA 1% no sentido C₁₈-Sílica, anteriores à aplicação da amostra. As amostras, cerca de 150µl, foram secas em concentrador rotatório e redissolvidas em solução aquosa de TFA 0,1% e injetadas na coluna até um volume máximo de 0,10ml. A secagem da coluna foi realizada através da passagem de argônio ultrapuro (99,9%) por 12 minutos antes do início do programa. Todos os reagentes foram

transferidos através da pressurização de frascos e linhas por argônio e os ciclos programados no método de sequência foram: SPIKE300 para o seqüenciamento senso estrito e CONV8 para a conversão do derivado intermediário de ATZAA (Atherton et al., 1993). A identificação dos derivados de aminoácidos foi realizada através da comparação com o perfil de eluição de uma solução padrão de PTHAA (Applied Biosystems, Inc.) cuja ordem de eluição era conhecida. A separação completa de todos os derivados é realizada em 32 minutos e está sincronizada ao ciclo de degradação do seqüenciador. A quantificação dos derivados foi realizada mediante razão entre as áreas dos picos da amostra e padrão. Todos os resultados foram corrigidos pelo padrão interno de nor-leucina cuja variação de área apresentou erro padrão inferior a 5%.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Detecção da adesina 2134P

Como mostra a Tabela 1, 19 (23,7%) das 80 amostras de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) de origem suína expressaram a adesina 2134P, quando cultivadas em meio TSA e testadas por soroaglutinação em lâmina. Foi observado um aumento na detecção da adesina (22/80 - 27,5%), quando as amostras de ETEC foram cultivadas em meio Minca suplementado com 0,125% de eosina solúvel em álcool e 0,062% de amarelo de alizarina. Este número aumentou ainda mais, quando as amostras foram cultivadas em meio Minca suplementado e em condições microaeróbicas (24/80 - 30.0%).

4.2. Detecção das enterotoxinas

A Tabela 2 mostra a relação entre a expressão da adesina 2134P e o tipo de enterotoxina produzida pelas amostras de ETEC estudadas.

A associação entre a expressão da adesina 2134P e as amostras de ETEC que produziam somente STa e/ou STb e LT-I foi encontrada em 9 amostras (37,5%).

Uma alta frequência da enterotoxina STb foi detectada sozinha (6/24) ou simultaneamente com as enterotoxinas STa e/ou LT-I (15/34) entre as amostras de ETEC positivas para a adesina 2134P. Portanto, 21/24 (87,5%) das amostras de *E. coli* 2134P⁺ estavam correlacionadas com a produção de STb.

A produção da enterotoxina LT-I foi observada em 10 (41,6%) amostras de ETEC que expressavam a adesina 2134P

4.3. "Gold Immunolabeling"

A microscopia eletrônica das preparações coradas negativamente e de "gold immunolabeling" (Figura 1) demonstraram que a adesina 2134P tem estrutura do tipo fímbria na superfície bacteriana, quando cultivada à 37°C. Quando a bactéria era cultivada à 16°C por 72 horas, essas estruturas não foram observadas na superfície da bactéria (Figura 2).

4.4. Prova de Microhemaglutinação Manose-Resistente (MHMR)

A amostra de *E. coli* padrão 2134 foi testada nos ensaios de microhemaglutinação manose-resistente. A amostra não aglutinou as hemácias testadas (cobaio, cavalo, boi, galinha e humana) na presença de D-manose, tanto quando crescida à 37°C como quando crescida à 16°C.

4.5. Teste de adesão em células

A bactéria padrão *E. coli* 2134 apresentou aderência difusa em células HEp-2 (Figura 3). O teste foi realizado com inóculo de 100 µl e incubação por 3 horas na presença de 1% de D-manose.

4.6. Purificação da adesina

A purificação da adesina 2134P se deu após “shearing” em mixer por 2 minutos e posterior centrifugação a 10.000 rpm. O sobrenadante foi precipitado com sulfato de amônio a 60%, e centrifugado a 10.000 rpm. O precipitado foi ressuspenso em tampão fosfato 0,5 M com 13 mM de Triton X-100 e aplicado em coluna de cromatografia Sepharose CL 4B eluída com tampão fosfato 0,5 M. A adesina 2134P foi eluída no volume morto, estando contida no primeiro pico coletado (Figuras 4 e 5).

4.7. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

As frações coletadas da cromatografia em Sepharose CL 4B foram aplicadas em eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O perfil eletroforético da fração que continha a adesina 2134P é apresentado na Figura 6b. Os géis foram corados com Coomassie Blue, e apresentaram apenas uma banda com peso molecular aproximado de 17.000 daltons.

4.8. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) na presença de uréia.

A fração coletada da cromatografia em Sepharose CL 4B e que apresentou apenas uma banda na SDS-PAGE foi aplicada em um gel de poliacrilamida na presença de uréia para verificar a presença de mais de uma subunidade diferente. O gel foi corado com Coomassie Blue e apresentou somente uma banda.

4.9. “Western Blotting”

Após eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, as bandas foram transferidas para o papel de nitrocelulose e tratada com o soro anti-2134P, soro de carneiro anti-IgG de coelho marcado com peroxidase e reveladas com diaminobenzidina. “Western Blot” usando o soro anti-2134P identificaram a banda de 17.000 daltons como sendo o antígeno 2134P (Figura 6a).

4.10. Seqüenciamento

Os quinze resíduos presentes na porção N-terminal da adesina 2134P foram determinados através de seqüenciamento automático e foi obtida a seqüência singular Q¹-Q²-G³-D⁴-V⁵-K⁶-F⁷-F⁸-G⁹-X¹⁰-V¹¹-X¹²-A¹³-X¹⁴-K¹⁵. Os dados para o seqüenciamento automático encontram-se apresentados na Tabela 3. No primeiro ciclo de seqüenciamento foram detectados 2,870 pmol de PTH-Gln. A seqüência mencionada confirmou a homogeneidade da purificação da adesina 2134P.

Tabela 1 - Expressão da adesina 2134P em amostras de ETEC em diferentes meios de cultura e condições de incubação.

Meios de Cultura				
	TSA^a	Minca	MEA^b	MEA+CO₂^c
Nº de amostras	19	--d	22	24
2134P ⁺	(23,7%)		(27,5%)	(30,0%)

a- Trypticase Soy Agar

b- Minca + Eosina + Amarelo de Alizarina

c- Minca + Eosina + Amarelo de Alizarina na presença de CO₂

d- Não determinado

Tabela 2 - Associação da adesina 2134P com o tipo de enterotoxina produzida por amostras de ETEC isoladas de leitões com diarreia no Brasil.

Tipo de enterotoxina	Número de amostras de ETEC 2134P⁺
STa ^a	1
STb ^b	6
LT-1 ^c	2
STa-STb	7
STa-LT-I	0
STb-LT-1	7
STa-STb-LT-1	1
Total	24

a- Enterotoxina termo-estável tipo 1

b- Enterotoxina termo-estável tipo 2

c- Enterotoxina termo-lábil tipo 1

Tabela 3. Quantidades de aminoaciltiofeniltio-hidantoínas recuperadas (em pmol) após seqüenciamento do terminal amínico da adesina 2134P de *E. coli*. O volume aplicado foi de 60 pmol.

CICLO	AMINOÁCIDO	PRODUTO
1	Q	2,870
2	Q	3,390
3	G	4,425
4	D	3,706
5	V	4,445
6	K	4,102
7	F	1,423
8	F	1,891
9	G	7,586
10	X	--
11	V	1,870
12	X	--
13	A	2,947
14	X	--
15	K	6,516

Tabela 4. Distribuição das amostras de *E. coli* produtoras das fimbrias da família F18 em todo o mundo.

Amostra de <i>E. coli</i>	Variante fimbrial	Isolada de porcos com	País de origem	Referência
107/86	F18ab ¹	Doença do edema	Suíça	Bertschinger et al., 1990
S 674/72	F18ab	Diagnóstico indistinto	Alemanha	Wittig et al., 1994
8199	F18ac	Diarréia	Suíça	Rippinger, 1993
1126/90	F18ac	Diarréia	Suíça	Imberechts et al., 1994a
2134	F18ac ¹	Diarréia	Hungria	Nagy et al, 1992
2203	F18ac	Diarréia	Hungria	Nagy et al, 1990
S1414	F18ac	Diarréia	Alemanha	Wittig et al., 1994
Av 24	F18ac	Diarréia	Austrália	Kennan & Monkton (1990)
8872	F18ac ¹	Diarréia	República Tcheca	Salajka et al, 1991; 1992

1 - a denominação original da fimbria da amostra 107/86 era “F107”, da amostras 2134 era “2134P”, e da amostra 8872 era “8813”.

* - tabela extraída do artigo de Rippinger et al., 1995.

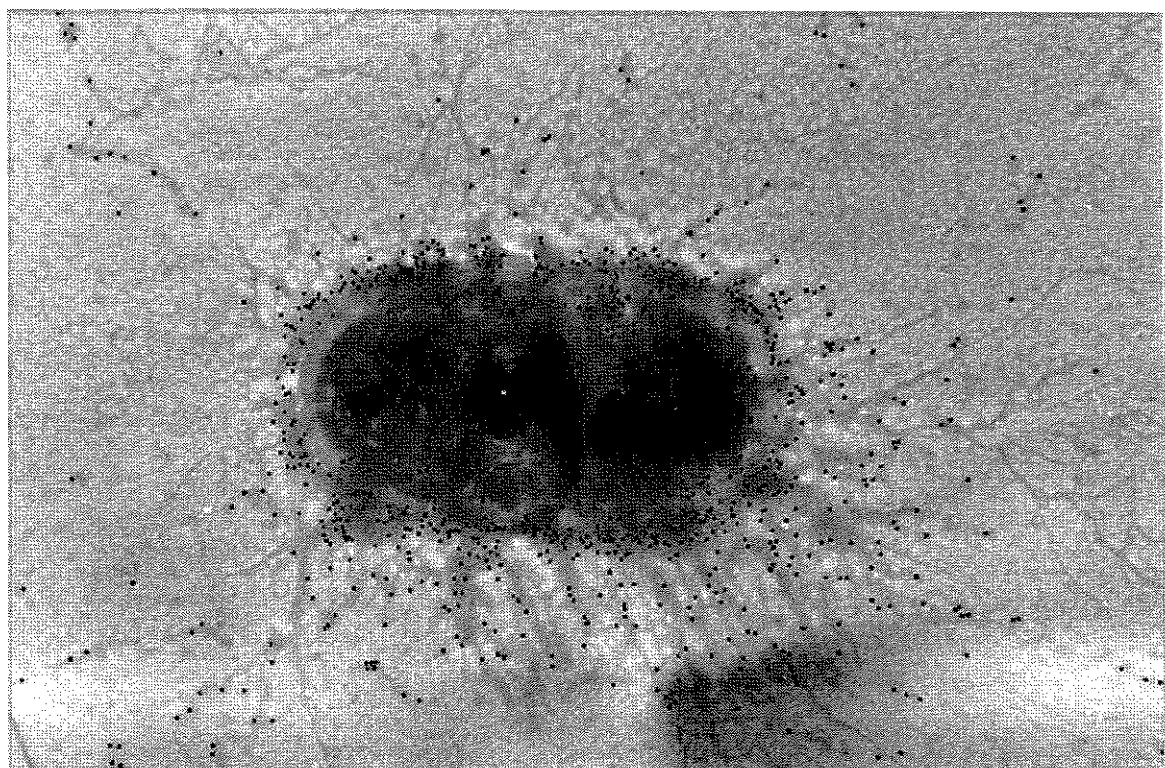


Figura 1. - Teste de "gold immunolabeling" com a amostra *E. coli* padrão 2134 utilizando o soro anti-2134P e soro anti-IgG de coelho marcado com ouro coloidal (aumento 42.000X).

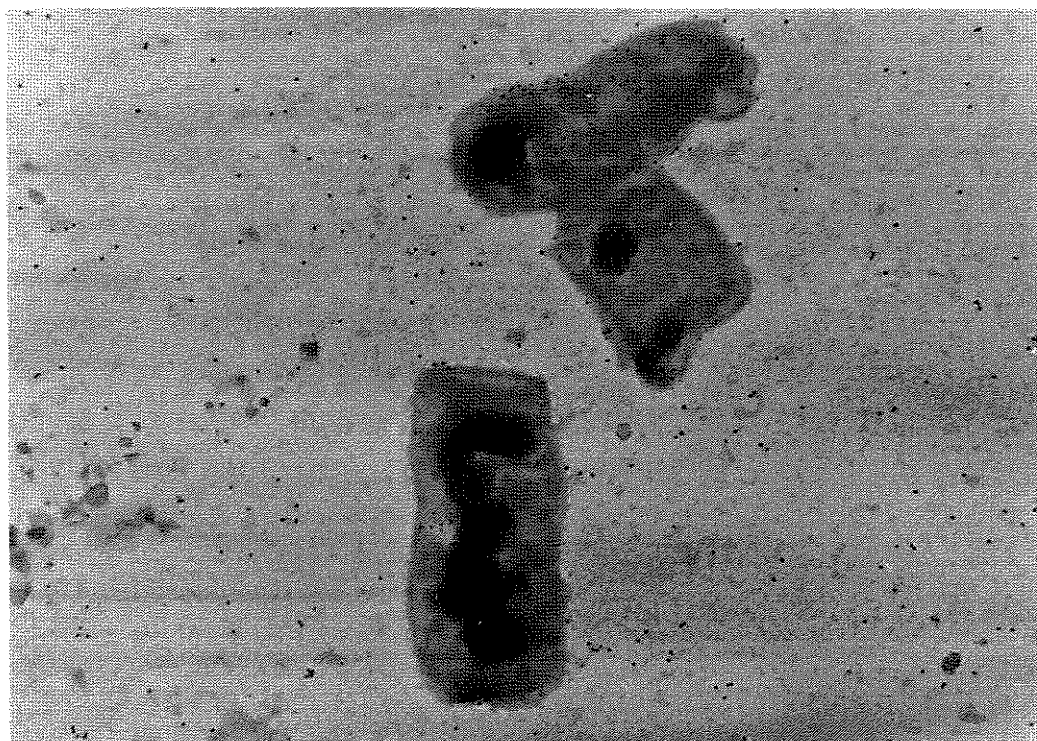


Figura 2. Eletromicrografia mostrando a ausência de fímbria quando a amostra padrão *E. coli* 2134 é cultivada a 16°C por 72 horas (aumento 43.516X).

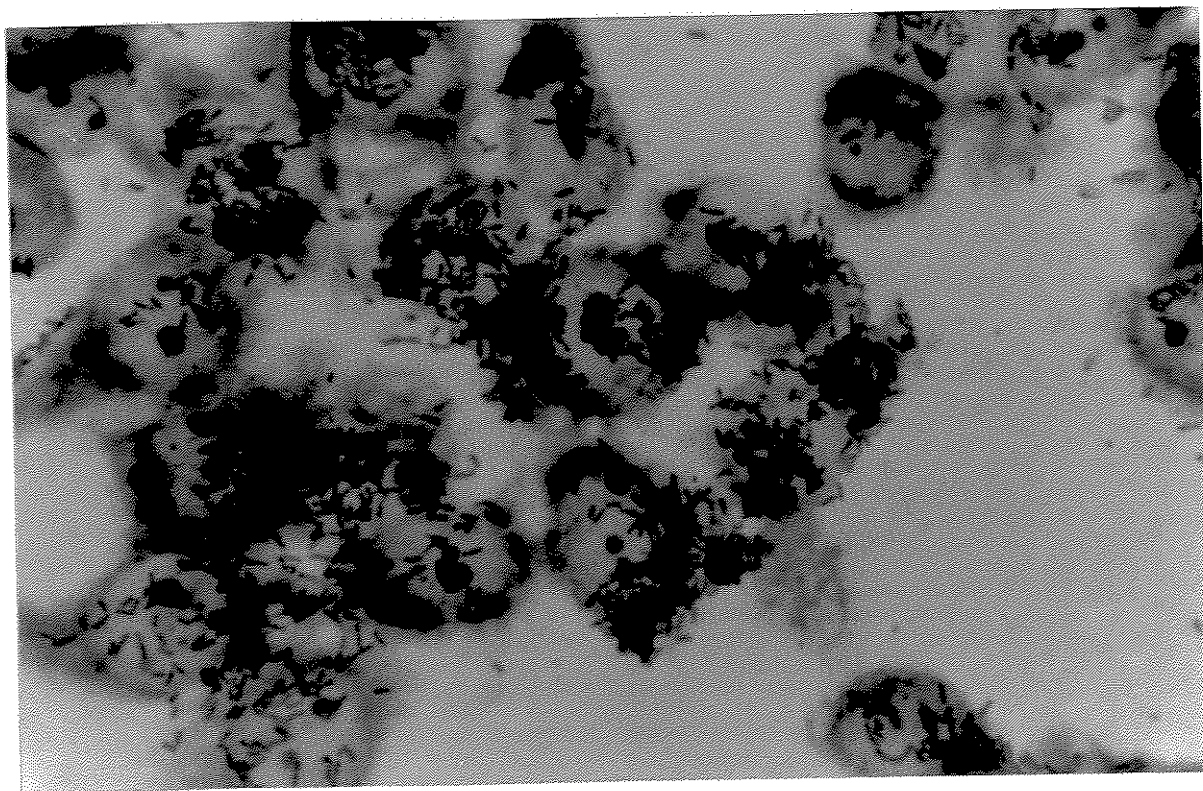


Figura 3. Aderência da amostra padrão de *E. coli* 2134 às células HEp-2. As bactéria foram cultivadas a 37°C por 18 horas, e incubadas por 3 horas com as células na presença de 1% de D-manose. As bactérias apresentam um padrão de aderência difusa ao redor das células (aumento 1000X).

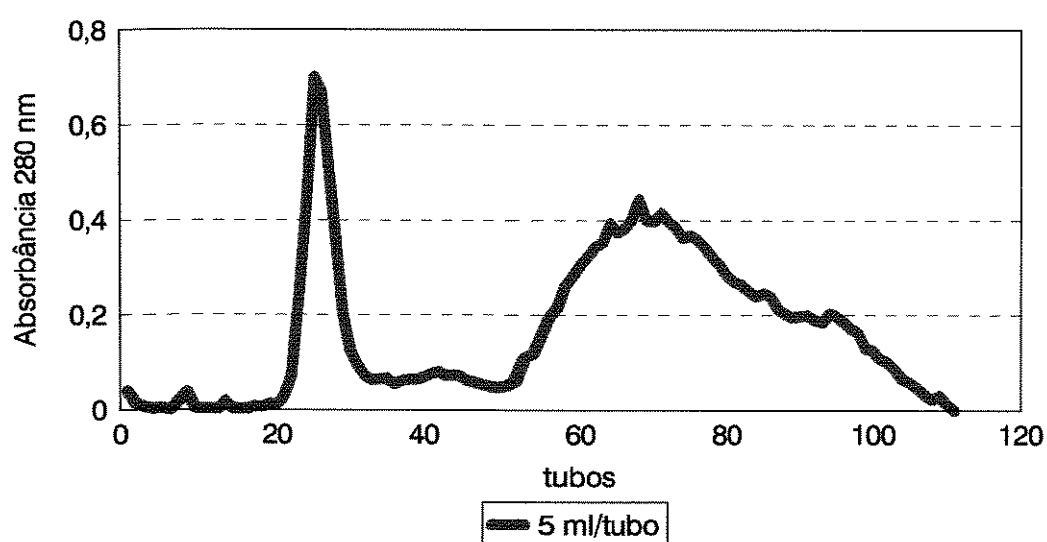


Figura 4. Perfil cromatográfico do extrato bruto da adesina 2134P após passagem em coluna Sepharose CL 4B, equilibrada e eluída com tampão fosfato 0,5 M. As frações foram coletadas em volume de 5 ml por tubo. A adesina foi detectada no primeiro pico. A absorbância das frações foi medida no comprimento de onda igual a 280 nm.

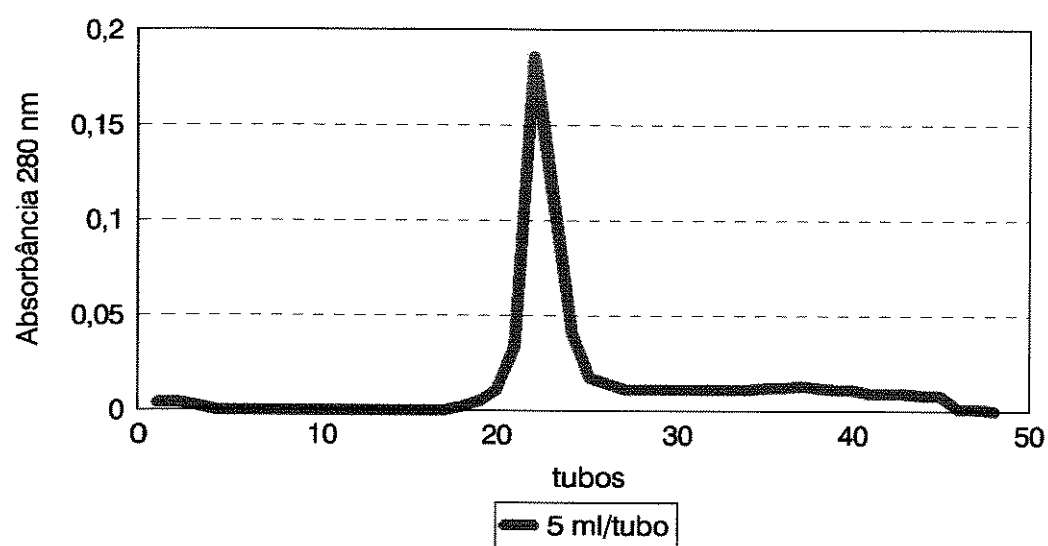


Figura 5 . Recromatografia do pico contendo a adesina 2134P (primeiro pico). As condições e coluna utilizadas foram as mesmas da figura anterior.

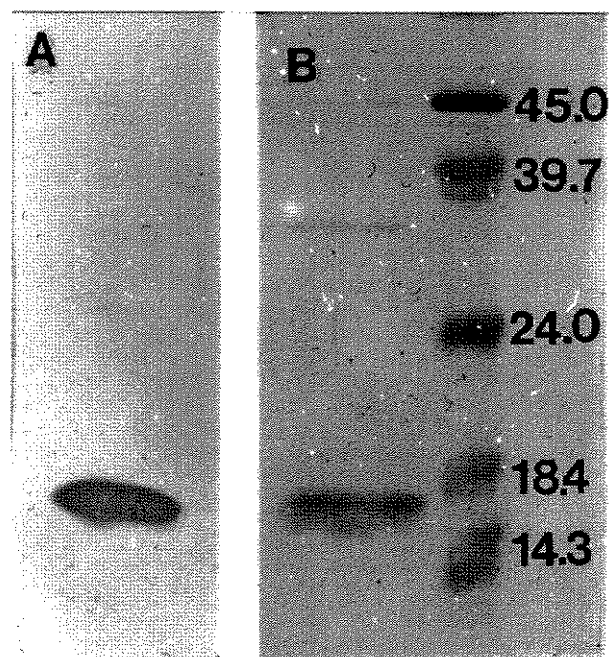


Figura 6. - Identificação da adesina 2134P pelo SDS-PAGE corado com Coomassie Blue (B) e "western blot" com o soro policlonal anti-2134P (A). 2134P foi purificado pela homogeneização, precipitação com sulfato de amônio a 60%, solubilização em Triton X-100 e cromatografia em coluna de Sepharose CL 4B. Números ao lado representam o peso molecular dos marcadores de peso molecular.

F107 Gln-Gln-Gly-Asp-Val-Lys-Phe-Phe-Gly-Asn-Val-Ser-Ala-Thr-Thr

2134P Gln-Gln-Gly-Asp-Val-Lys-Phe-Phe-Gly- X -Val- X -Ala- X -Lys

Figura 7. Alinhamento dos quinze primeiros aminoácidos da porção N-terminal da estrutura primária da subunidade FedA da fímbria F107 (F18ab) com a sequência de aminoácidos da adesina 2134P

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Colibaciloses por *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC) são freqüentes em animais domésticos, afetando principalmente recém-nascidos e pós-desmame. É caracterizada por diarreia aguda, desidratação progressiva e morte em poucos dias, o que leva a uma considerável perda econômica (Morris & Sojka, 1985). Uma nova adesina conhecida como 2134P foi descrita em amostras de ETEC e era diferente biológica e sorologicamente daquelas até então descritas em ETEC suína (De Graaf & Mooi, 1986; Yano et al., 1986; Casey et al., 1992). Posteriormente, a adesina 2134P foi incluída na família de fimbrias F18 (Tabela 4), sendo classificada como F18ac.

O estudo epidemiológico da adesina 2134P em amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênica de suínos, no Brasil, não é ainda descrito. Como mostra a Tabela 1, a alta freqüência da adesina 2134P (30,0%) detectada em amostras de *E. coli* que não expressavam K88,

K99, 987P, F41 ou F42, isoladas de leitões com diarreia, sugerem, indubitavelmente, um importante papel desta adesina na etiologia da colibacilose suína no Brasil.

Como mostra a Tabela 1, a adição de 0,125% de eosina solúvel em álcool e de 0,062% de amarelo de alizarina ao meio de cultura Minca, conforme recomendado por Wittig et al. (1994), aumentou a detecção da adesina 2134P. O cultivo das amostras de ETEC no mesmo meio de cultura, em condições microaeróbicas, favoreceu ainda mais a detecção da adesina nestas amostras.

A Tabela 2 mostra a correlação entre a expressão da adesina 2134P e a produção de enterotoxinas pelas amostras de *E. coli*. A correlação foi mais prevalente com a enterotoxina STb (87,5%), mas também apresentou uma correlação grande com as enterotoxinas STa (37,5%), e com a LT-I (41,6%). A grande correlação da adesina 2134P com a enterotoxina STb também foi verificada por Wittig et al. (1995), no qual eles observaram a presença do gene para STb em 96,27% (129/134) das amostras por eles estudadas, enquanto que para STa a presença foi menor, mas igualmente significativa (81/134 - 60,45%), em concordância com os dados aqui apresentados. Essa concordância pode se dar, provavelmente, pelo fato da adesina ter uma ampla distribuição por todo o mundo, uma vez que já foi relatada em diversos países (Tabela 4).

Dean-Nystrom et al. (1993) obtiveram da amostra de *E. coli* 2487, um transconjugante obtido através da conjugação da amostra de *E. coli* 2134 com a amostra 1475 (*nalR*) e mostraram em uma preparação da bactéria, que a adesina 2134P é uma proteína de estrutura fimbrial, confirmando o que havia sido relatado por Nagy et al. (1992) e por Kennan & Monkton (1990). Como mostrado na Figura 1, o soro anti-

2134P, através de “gold immunolabelling”, seguindo metodologia descrita por Kennan & Monkton (1990), reconheceu uma estrutura do tipo fimbria na superfície da bactéria, confirmando a presença da adesina 2134P nas nossas amostras. Os dados da microscopia eletrônica mostram que, ao contrário do que ocorre com a bactéria cultivada à 37°C, ela não apresenta estruturas do tipo fimbria quando cultivada à 16°C (Figura 2). Isto está de acordo com o que acontece com os fatores de colonização expressados por outras amostras de *E. coli* humana e animal (Gaastra & DeGraaf, 1982).

Os testes de microhemaglutinação manose-resistente (MHMR) apresentaram resultados negativos com todas as hemácias testadas (boi, cavalo, cobaio, galinha e humana), tanto com as amostras de *E. coli* crescidas à 16°C como com as amostras crescidas à 37°C, estando de acordo com os resultados apresentados por Kennan & Monkton (1990) para a fimbria Av 24. Esses resultados poderiam sugerir que talvez a fimbria fosse manose-sensível (infelizmente os testes sem a presença de D-manose não foram feitos), mas os resultados da adesão em células HEp-2 indica que a fimbria não é manose-sensível, uma vez que esta apresentou aderência difusa neste teste na presença de 1% de D-manose, não sendo, portanto, inibida pela sua presença (Figura 3). Esta aderência às células é mais um forte indicativo da importância da adesina 2134P como um fator de virulência em amostras de *E. coli* patogênicas para suínos.

O isolamento da adesina 2134P da superfície da bactéria foi obtido através de ruptura mecânica, seguindo a descrição de Stirm et al. (1967a). A precipitação foi realizada com sulfato de amônio (60%) e a ressuspensão do antígeno conforme descrito por Dean-Nystrom et al.

(1994), apenas substituindo o detergente CHAPS por Triton X-100, obtendo-se o mesmo resultado final. Por apresentar uma hidrofobicidade aparentemente muito grande, a adesina 2134P foi purificada inicialmente utilizando-se uréia a 2 M no tampão de cromatografia, para evitar a agregação da fimbria. Esse procedimento resultou na obtenção da fimbria com elevado grau de pureza (Figuras 4 e 5). Porém, a presença de uréia durante o seqüenciamento de aminoácidos, prejudicou o sinal de seqüência, uma vez que o resíduo N-terminal, uma glutamina, reage com a uréia e pode ciclizar-se em piroglutâmico (PCA), que é um tipo de bloqueio N-terminal; com isso, o produto inicial de seqüenciamento pode ser reduzido e diminuir os dados relativos ao número de ciclos identificáveis. Esse problema pode ser contornado, em parte, pelo uso de piroglutamato aminopeptidase, que pode remover o PCA e, com isto, melhorar a detecção do N-terminal (segundo aminoácido). Porém, a retirada da uréia não prejudicou, pelo menos aparentemente, o processo de purificação, tornando-o, no entanto, um pouco mais trabalhoso. O uso de guanidina-HCl talvez possa vir a substituir a uréia, com a vantagem de não prejudicar no seqüenciamento de aminoácidos.

O uso de HPLC para a purificação da adesina foi ineficaz pois, devido a sua alta hidrofobicidade, a adesina ficou retida em todas as colunas de fase-reversa utilizadas (C_2 , C_8 e C_{18}).

As análises eletroforéticas demonstraram que a adesina 2134P encontrava-se pura, pois apresentaram apenas uma banda no gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) na coloração com Coomassie Blue (Figura 6b). As análises mostraram, também, que o peso molecular aproximado da adesina é de torno de 17.000 daltons, confirmando o que foi relatado anteriormente por outros autores (Kennan

& Monkton, 1990; Nagy et al., 1992; Casey et al., 1992; Dean-Nystrom et al., 1994). Foi observado, também, que se faz necessário o uso de uma proporção alta (2:1) de β -mercaptoetanol em relação à amostra, quando esta é purificada sem a presença de uréia, pois a adesina se agrega e o gel apresenta bandas com pesos moleculares mais altos, dando-se a impressão de contaminação. Esses pesos são, normalmente, o dobro e o quádruplo do peso da adesina.

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de uréia foi utilizada para confirmar a pureza da adesina e observar a presença de mais de uma subunidade da adesina com o mesmo peso molecular, mas com carga elétrica diferente. Essa metodologia foi utilizada a fim de substituir o PAGE convencional, uma vez que, como dito anteriormente, a adesina é muito hidrofóbica e, num PAGE convencional, ela não entraria no gel, sendo, portanto, necessária a presença de uréia em altas concentrações (6 M). O gel apresentou apenas uma banda, confirmando a pureza da amostra.

Após as análises eletroforéticas, foram feitos ensaios de “western blot” para verificar se a banda única apresentada no gel de poliacrilamida-SDS era realmente a adesina 2134P. Após a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, foi feita a transferência para o papel de nitrocelulose; após a transferência, os radicais livres do papel foram bloqueados com as proteínas do leite Molico, sendo, em seguida, tratado com o soro anti-2134P, soro de carneiro anti-IgG de coelho marcado com peroxidase e revelado com diaminobenzidina. Os ensaios de “western blot” revelaram que a proteína de 17.000 daltons apresentada como banda única nos géis de poliacrilamida, era realmente a adesina 2134P (Figura 6a), confirmando o que foi apresentado por Dean-Nystrom et al. (1994).

A determinação da porção N-terminal da adesina 2134P foi feita através de seqüenciamento automático utilizando-se química de Edman para a determinação dos aminoácidos. A montagem da coluna foi realizada com 5mg de sílica na extremidade inferior e 8mg de resina C₁₈ na porção superior. Através de seqüenciamento automático foi obtida a seqüência singular Q¹-Q²-G³-D⁴-V⁵-K⁶-F⁷-F⁸-G⁹-X¹⁰-V¹¹-X¹²-A¹³-X¹⁴-K¹⁵. No primeiro ciclo de seqüenciamento foram identificados 2,870 pmol de PTH-Gln. Como mencionado acima, a presença de uréia prejudicou a análise do seqüenciamento, principalmente porque havia uma glutamina na primeira posição do N-terminal. O caráter hidrofóbico apresentado pela proteína impossibilitou a determinação da seqüência além do décimo quinto aminoácido, pois a partir daí, o sinal de seqüenciamento se tornava muito fraco e dificultava a identificação acurada do aminoácido liberado. Os aminoácidos 10, 12 e 14 não deram sinais confiáveis, mas forneceu a indicação de que o aminoácido 10 seria uma arginina; o aminoácido 12 poderia ser uma alanina ou uma serina, no caso desta última, um aminoácido de difícil detecção por ser muito lábil e formar logo subprodutos e, o aminoácido 14 seria uma treonina, outro aminoácido lábil e de difícil detecção, principalmente em quantidades pequenas, como no nosso caso.

Essa seqüência apresenta uma homologia em torno de 66% com o N-terminal da fimbria F107 (F18ab). Essa homologia subiria para 80% caso fosse confirmados os aminoácidos serina na posição 12, e treonina na posição 14 (Figura 7). Isso vem reforçar a idéia de que a adesina 2134P e a fimbria F107, entre outras, pertencem a uma mesma família de adesinas, denominada F18, assim como acontece com K88 (K88ab, K88ac e K88ad). Além desse, existem outros indicativos de “parentesco”

entre essas duas fímbrias: O soro anti-F107 apresentou reação cruzada com 5 (38,46%) amostras 2134P⁺, incluindo aí, a amostra padrão de *E. coli* 2134 (dados não mostrados); a fímbria F107 também apresenta uma correlação grande com as enterotoxinas produzidas por *E. coli* enterotoxigênica, sendo, também, mais prevalente com a enterotoxina STb (84,62%) (dados não mostrados).

Existem, porém, dados consistentes que provam que 2134P e F107 não são a mesma adesina: o peso molecular atribuído à fímbria F107 é de 15.099 daltons (Imberechts et al., 1992), enquanto para 2134P é de 17.000; a amostra de *E. coli* 107/86, padrão para a fímbria F107, apresenta aderência não característica em cultura celular, enquanto 2134P apresenta aderência difusa (Figura 3); apesar de algumas amostras apresentarem reação cruzada com os antissoros das duas fímbrias, outras amostras só reagem com o antissoro contra uma das duas; e, apesar da fímbria F107 ter sido isolada também de amostras de leitões com diarreia pós-desmame (Imberechts et al., 1994), ela foi inicialmente isolada de amostras de leitões com doença do edema (Bertschinger et al., 1990; Imberechts et al., 1992), o que ainda não ocorreu com a adesina 2134P, que só foi isolada de leitões com diarreia pós-desmame (Nagy et al, 1992; Casey et al., 1992; Dean-Nystrom et. al., 1994).

Todos os dados apresentados neste trabalho, sugerem que estudos posteriores a cerca das características estruturais, morfológicas, biológicas e antigênicas da adesina 2134P são necessários, os quais, nós acreditamos, devem ser de extrema importância na elucidação da etiologia da colibacilose suína, visto que o uso de bacterina ou preparações fimbriais como vacinas contra as doenças diarreicas, podem levar a uma

pressão sorológica favorecendo a seleção de novas adesinas em amostras patogênicas para suínos.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os estudos epidemiológicos da adesina 2134P através da técnica sorológica mostraram que esta esteve presente em 30% das amostras por nós estudadas (amostras que não apresentavam as adesinas K88, K99, 987P, F41 e F42), um número relativamente alto em termos de epidemiologia.

A adesina está fortemente correlacionada com a presença de enterotoxinas ou genes para enterotoxinas, principalmente com a enterotoxina STb.

Os testes de microhemaglutinação confirmaram que a adesina 2134P não hemaglutina nenhum dos eritrócitos por nós testados (boi, cavalo, cobaio, galinha e humano).

A amostra de *E. coli* 2134, padrão para a adesina 2134P, apresentou modelo de aderência difusa em cultura celular (células HEp-2), mesmo quando incubada na presença de D-manose, sendo, portanto, manose-resistente.

A adesina foi isolada através de procedimentos mecânicos e químicos; foi purificada por métodos cromatográficos; parcialmente caracterizada e identificada por métodos eletroforéticos e imunológicos (“western blot”).

A adesina teve a sua porção N-terminal seqüenciada e foram apresentados 12 dos 15 primeiros aminoácidos desta porção, demonstrando, assim, a pureza da preparação.

BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

- Aguero, M.E., Reyes, L., Prado, V., Ørskov, I., Ørskov, F. & Cabello, F.C.** 1985. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in a population of infants with diarrhea in Chile. J.Clin. Microbiol. 22: 576-581.
- Alter, B.P., Goff, S.C., Efremov, G.D., Gravely, M.E. & Huisman, T.H.J.** 1980. Globin chain electrophoresis a new approach to the determination of the G γ /A γ ratio in fetal haemoglobin and to studies of globin synthesis. Br. J. Haematol. 44: 527-534.
- Anderson, T.F.** 1949. On the mechanisms of adsorption of bacteophages and host cells. In: Miles, A.A. & Pirie, N.W. (ed), The nature of the bacterial surface. Oxford Univ. Press, Oxford, England. pp 79-95.
- Arbuckle, J.B.R.** 1970. The location of *Escherichia coli* in pig intestine. J Med. Microbiol. 3: 333-340.

- Atherton, D., Fernandez, J., DeMott, M., Andrews, L. & Mische, S.M.** 1993. Routine protein sequence analysis below ten picomoles: one sequencing facility's approach (Angeletti, R.H., ed.), V4, San Diego, Academic Press, pp. 409-419.
- Bertschinger, H.U., Moon, H.W. & Whipp, S.C.** 1972. Association of *Escherichia coli* with small intestinal epithelium. I. Comparision of enteropathogenic and non-enteropathogenic porcine strains in pigs. *Infect. Immun.* 5: 595-605.
- Bertschinger, H.U., Bachmann, M., Mettler, C., Pospischil, A., Schraner, E.M., Stamm, M., Sydler, T. & Wild, P.** 1990. Adhesive fimbriae produced in vivo by *Escherichia coli* O139:K12(B):H1 associated with enterotoxaemia in pigs. *Vet. Microbiol.* 25: 267-281.
- Blanco, M., Blanco, J., Blanco, J.E., Gonzales, A.M., Gomes, T.A.T., Zerbini, L.F., Yano, T. & Pestana de Castro, A.F.** 1994. Genes coding for shiga-like toxins in bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) strains belonging to different O:K:H serotypes. *Vet. Microbiol.* 42 : 105-110.
- Blumenstock, E. & Jann, K.** 1982. Adhesion of piliated *Escherichia coli* strains to phagocytes: differences between bacteria with manose-sensitive pili and those with manose-resistant pili. *Infect Immun.* 35: 264-269.
- Brinton, C.C.Jr.** 1959. Non-flagellar appendages of bacteria. *Nature.* 183: 782-786.

- Brinton, C.C.Jr.** 1965. The structure, function, synthesis and genetic control of bacteria pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram-negative bacteria. *Transaction of the N.Y. Acad. Sci.* 27: 1003-1054.
- Burgess, M.N., Bywater, R.J., Cowley, C.M., Mullan, N.A. & Newsome, X.** 1978. Biological evaluation of a methanol soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs rabbits and calves. *Infect. Immun.* 21: 526-531.
- Burrow, M.R., Sellwood, R. & Gibbons, R.A.** 1976. Haemagglutinating and adhesive properties associated with the K99 antigen of bovine strains of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 96: 2269-275.
- Casey, T.A., Nagy, B. & Moon, H.W.** 1992. Pathogenicity of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* that do not express K88, K99, F41 and 987P adhesins. *Am. J. Vet. Res.* 53(9) : 1488-1492.
- Cravioto, A., Reyes, R.E., Ortega, R., Fernández, G., Hernández, R. & López, D.** 1988. Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of life. *Epidem. Inf.* 101: 123-134.
- Dean, A.G., Ching, A.C., Williams, R.G. & Harden, L.B.** 1972. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice. Application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, 125 : 407-411.
- Dean-Nystrom, E.A., Casey, T.A., Schneider, R.A. & Nagy, B.** 1993. A monoclonal antibody identifies 2134P fimbriae as adhesins on enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from postweaning pigs. *Vet. Microb.* 37 : 101-114.

- De Graaf, F.R. & Roorda, I.** 1982. Production and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from the calf enterotoxigenic *Escherichia coli* strain B41 M. Infect. Immun. 36: 751-753.
- De Graaf, F.R. & Mooi, F.R.** 1986. The fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. In: Rose, A. H. and Tempest, D. W., eds. Advances in Microbiol. Physiol. vol. 28. New York: Academic Press Inc., 65-143.
- Dobrescu, L.** 1983. New biological effect of edema disease principle (*Escherichia coli* neurotoxin) and its use as an "in vitro" assay for this toxin. Am. J. Vet. Res. 44: 31-34.
- Donnenberg, M.S. & Kaper, J.B.** 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 60: 3953-3961.
- Dress, D.T. & Waxler, G.L.** 1970. Enteric colibacillosis in gnotobiotic swine, An electron microscopic study. Am. J. Vet. Res. 31: 1159-1171.
- Duguid, J.P., Anderson, E.S. & Campbell, I.** 1966. Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. J. Pathol. Bacteriol. 92: 107-138.
- Duguid, J.P. & Old, D.C.** 1980. Adhesive properties of *Enterobacteriaceae*. In: Beachey, E.H., ed. Bacterial adherence. New York. Chapman & Hall. pp.185-217.
- Duguid, J.P., Smith, I.W., Dempester, G. & Edmunds, P.N.** 1955. Non-flagellar filamentous appendages "fimbriae" and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. J. Pathol. Bacteriol. 70: 335-348.
- Edwards, P.R. & Ewing, W.H.** 1972. Identification of *Enterobacteriaceae*. 3rd Ed. Burgess Publis. Comp.

- Evans, D.G. & Evans, D.J.Jr.** 1978. New surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O6 and O8. *Infect. Immun.* 21: 638-647.
- Evans, D.G., Silver, R.P., Evans, D.J.Jr., Chase, D.G. & Gorbach, S.L.** 1975. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. *Infect. Immun.* 12: 656-667.
- Formal, S.B. & Hornick, R.B.** 1978. Invasive *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 137: 641-644.
- Fujii, Y., Hayashi, M., Hitotsubashi, S., Fuke, Y., Yamanaka, H. & Okamoto, K.** 1991. Purification and characterization of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J. Bacteriol.* 173: 5516-5522.
- Gaastra, W. & DeGraaf, F.R.** 1982. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiol. Rev.* 46: 129-161.
- Guinée, P.A.M., Veldkamp, J. & Jansen, W.H.** 1977. Improved Minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 15: 676-678.
- Guinée, P.A.M. & Jansen, W.H.** 1979. Behavior of *Escherichia coli* K antigens K88ab, K88ac and K88ad in immunoelectrophoresis, double diffusion, and hemagglutination. *Infect. Immun.* 23: 700-705.
- Guth, B.E.C., Twiddy, E.M., Trabulsi, L.R. & Holmes, R.K.** 1986. Variation in chemical properties and antigenic determinants among type II heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 54: 529-536.

- Gyles, C.L.** 1986. *Escherichia coli*. In: Gyles & C.O. Thoen (eds.). Pathogenesis of bacterial infections in animals. The Iowa State University Press, Ames, EUA, pp 114-131.
- Helie, P., Morin, M., Jacques, M & Fairbrother, J.M.** 1991. Experimental infection of newborn pigs an attaching and effacing *Escherichia coli* O45:"E65" strain. *Infect. Immun.* 59: 814-821.
- Holland, R.E.** 1990. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 3: 345-375.
- Holmes, R.K., Twiddy, E.M. & Pickett, C.L.** 1986. Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 53: 464-477.
- Honda, T., Tsuji, T., Takeda, T. & Miwatani, T.** 1981. Immunological nonidentity of heat-labile enterotoxin from human and porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 34: 337-340.
- Houwick, A.L. & van Iterson, W.** 1950. Electron microscopical observations on bacterial cytology. II. A study on flagellation. *Biochim. Biophys. Acta.* 5: 10-44.
- Imberechts, H., De Greve, H., Schlicker, C., Bouchet, H., Pohl, P., Charlier, G., Bertschinger, H., Wild, P., Vandekerckhove, J., Van Damme, J., Van Montagu, M. & Lintermans, P.** 1992. Characterization of F107 fimbriae of *Escherichia coli* 107/86, which causes edema disease in pigs, and nucleotide sequence of the F107 major fimbrial subunit gene, *fedA*. *Infect. Immun.* 5: 1963-1971.
- Imberechts, H., Van Pelt, N., De Greve, H. & Lintermans, P.** 1994a. Sequences related to the major subunit gene *fedA* fo F107 fimbriae in porcine *Escherichia coli* strains that express adhesive fimbriae. *FEMS.* 119: 309-314.

- Imberechts, H., Bertschiger, H.U., Stamm, M., Sydler, T., Pohl, P., De Greve, H., Hernalsteens, J.P., Van Montagu, M. & Lintermans, P.** 1994b. Prevalence of F107 fimbriae on *Escherichia coli* isolated from pigs with oedema disease or postweaning diarrhoea. *Vet. Microb.* 40: 219-230.
- Isaacson, R.E. & Richter, P.** 1981. *Escherichia coli* 987P pilus: purification and partial characterization. *J Bacteriol.* 146: 784-789.
- Janke, B.H., Francis, D.H., Collins J.E., Libal, M.C., Zeman, D.H. & Johnson, D.D.** 1989. Attaching and effacing *Escherichia coli* infectious in calves, pigs, lamb and dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1: 6-11.
- Jones, G.W.** 1977. The attachment of bacteria to the surfaces of animal cells. In: Reissing, J.L. (ed.), *Microbial interactions, receptors and recognition*, series B, vol 3. Chapman & Hall, London. pp 139-176.
- Jones, G.W. & Rutter, J.M.** 1974. The association of K88 antigen with haemagglutinating activity in porcine strains of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 84: 135-144.
- Kauffmann, F. & Vahlne, G.** Ueber die Bedeutung des serologischen Formenwechsels für die Bakteriophagenwirkung in der Coli-Gruppe. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B* 22: 119-137.
- Kennan, R.M. & Monckton, R.P.** 1990. Adhesive fimbrial associated with porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* of the O141 serotypes. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2006-2011.
- Kennan, R., Söderlind, O. & Conway, P.** 1995. Presence of F107, 2134P and Av24 fimbriae on strains of *Escherichia coli* isolated from Swedish piglets with diarrhoea. *Vet. Microbiol.* 43: 123-129.

- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Leite, D.S., Yano, T. & Pestana de Castro, A.F.** 1988. Production, purification and partial characterization of a new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 139: 295-306.
- Lazure, C., Seidah, N.G., Cretien, M., Lallier, M. & St. Pierre, S.A.** 1983. Primary structure determination of *E. coli* heat-stable enterotoxin of porcine origin. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 61: 287-292.
- Levine, M.M.** 1987. *E. coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *Infect. Dis.* 155: 377-389.
- Linggood, M.A. & Thompson, J.M.** 1987. Verotoxin production among porcine strains of *Escherichia coli* and its association with oedema disease. *J. Med. Microbiol.* 25: 359-362.
- Mainil, J., Daube, G., Deprez, P., Kaeckenbeeck, A. & Pohl, P.** 1989. Detection and identification of pathotypes of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from weaned piglets using genes probes for seven *Escherichia coli* toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* 59: 345-350.
- Marques, L.R.M., Peiris, J.S.M., Crys, S.J. & O'Brien, A.D.** 1987. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produced a variant of shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol. Lett.* 44: 33-38.

- Matherwson, J.J., Johnson, P.C., Du Pont, H.L., Morgan, D.R., Thornton, S.A., Wood, L.V. & Ericson, C.D.A.** 1985. A newly recognized cause of traveller's diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 151: 471-475.
- Matherwson, J.J., Johnson, P.C., Du Pont, H.L., Satterwhite, T.K. & Winsor, D.K.** 1986. Pathogenicity of enteroadherent *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 154: 524-527.
- McConnell, M., Chart, H., Field, A.M., Hibberd, M. & Rowe, B.** 1989. Characterization of a putative colonization factor (PCFO166) of enterotoxigenic *Escherichia coli* serogroup O166. *J. Gen. Microbiol.* 135: 1135-1144.
- Merson, M.H., Morris, G.K., Sack, D.A., Wells, J.G., Greech, W.B., Feeley, J.C., Sack, R.B., Kapikain, A.Z. & Gangarosa, E.J.** 1976. Traveller's diarrhea in Mexico: a prospective study of american physicians and family members attending a congress. *N. Engl. J. Med.* 294: 1299-1305.
- Moon, H.W., Whipp, S.C., Argenzio, R.A., Levine, M.M. & Giannella, R.A.** 1983. Attaching and effacing activities fo rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pigs and rabbit intestines. *Infect. Immun.* 41: 1340-1351.
- Morris, J.A. & Sojka, W.J.**, 1985. *Escherichia coli* as pathogens in animals. In: Sussman, M. ed. "The virulence of *Escherichia coli* : reviews and methods". New York: Academic Press Inc., 45-47.
- Nagy, B., Moon, H.W. & Isaacson, R.E.** 1976. Colonization of porcine small intestine by *Escherichia coli*: ileal colonization and adhesion by pig enteropathogens that lack K88 antigen and by some acapsular mutants. *Infect. Immun.* 13: 1214-1220.

- Nagy, B., Moon, H.W. & Isaacson, R.E.** 1977. Colonization of porcine intestine by enterotoxigenic *Escherichia coli*: selection of piliated forms "in vivo", adhesion of piliated forms to epithelial cells "in vitro", and incidence of a pilus antigen among porcine enteropathogenic *E. coli*. *Infect. Immun.* 16: 344-352.
- Nagy, B., Casey, T.A., Whipp, S.C. & Moon, H.W.** 1992. Susceptibility of porcine intestine to pilus-mediated adhesion by some isolates of piliated enterotoxigenic *Escherichia coli* increase with age. *Infect. Immun.* 60: 12285-1294.
- Nataro, J.P., Scaletsky, I.C.A., Kaper, J.B., Levine, M.M. & Trabulsi, L.R.** 1985. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 48: 378-383.
- O'Brien, A.D. & Holmes, R.K.** 1987. Shiga and shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* 51: 206-220.
- Ofek, I. & Beachey, E.H.** 1978. Mannose binding and epithelial cell adherence of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 22: 247-254.
- Ørskov, I., Ørskov, F., Smith, H.W. & Sojka, W.J.** 1975. The establishment of K99, a termolabile, transmissible *Escherichia coli* K antigen, previously called "Kco", possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* 83: 31-36.
- Ørskov, I., Ørskov, F., Sojka, W.J. & Leach, J.M.** 1961. Simultaneous occurrence of *Escherichia coli* B and L antigens in strains from diseased swine. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* 53: 404-422.
- Ottow, J.C.G.** 1975. Ecology, physiology and genetics of fimbriae and pili. *Annu. Rev. Microbiol.* 29: 79-108.

- Rippinger, P.** 1993. Ödemkrankheit und Absetzdurchfall beim Schwein: Antigenvarianten der Fimbrien 107 bei verschiedenen *E. coli*-Stämmen. Thesis. University of Zürich.
- Rippinger, P., Bertschinger, H.U., Imberechts, H., Nagy, B., Sorg, I., Stamm, M., Wild, P. & Wittig, W.** 1995. Designations F18ab and F18ac for the related fimbrial types F107, 2134P and 8813 of *Escherichia coli* isolated from porcine postweaning diarrhoea and from oedema disease. *Vet. Microbiol.* 45: 281-295.
- Sack, R.B.** 1975. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* 29: 333-353.
- Salajka, E., Alexa, P. & Saljkova, Z.** 1991. Výskyt factoru virulence u kmenu *Escherichia coli* vyvolávajících edémovou nemoc a prujmy u sedat po odstavu. *Veterinarství.* 41: 9-10.
- Salajka, E., Salajkova, Z., Alexa, P. & Hornich, M.** 1992. Colonization factor different from K88, K99, F41 and 987P in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from postweaning diarrhoea in pigs. *Vet. Microbiol.* 32: 163-175.
- Salit, I.E. & Gotschlich, E.C.** 1977. Hemagglutination by purified type 1 *Escherichia coli* pili. *J. Exp. Med.* 146: 1169-1181.
- Silveira, W.D., Yano, T., Azevedo, J.L. & Castro, A.F.P.** 1987. Plasmid-mediated production of a new colonization factor (F42) in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Rev. Genet.* x,4: 635-646.
- Smith, H.W. & Halls, S.** 1967. Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. *J. Pathol. Bacteriol.* 93: 531-543.

- Smith, H.W. & Gyles, C.L.** 1970. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. J. Med. Microbiol. 3: 387.
- Smih, H.W. & Linggood, M.A.** 1972. Further observations on *Escherichia coli* enterotoxins with particular regard to those produced by atypical piglets strains and by calf and lamb strains: the transmissible nature of these enterotoxins and of a K antigen possessed by calf and lamb strains. J. Med. Microbiol. 5: 243-250.
- Smyth, C.J.** 1982. Two manose-resistant hamagglutinins on enterotoxigenic *Escherichia coli* of serotype O6:K15:H15 or H- isolated from traveller's or infantile diarrhoea. J. Gen. Microbiol. 128: 22081-2096.
- Sojka, W.J.** 1973. Enteropathogenic *Escherichia coli* in man and farm animals. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 6: 52-63.
- Sorg, I.** 1992. Die Ödemkrankheit des Schweines: Isolierung, Reinigung und Charakterisierung der Fimbrien 107 von *Escherichia coli* O139:K12(B):H1. Vet.-med. Diss., Zürich, Schweiz.
- Speirs, J.I., Stavrics, S. & Konowalchuk, J.** 1977. Assay of *Escherichia coli* enterotoxin with vero cells. Infect. Immun., 16: 617-622.
- Stirm, S., Ørskov, F. & Mansa, B.** 1967a. Episome-carried surface antigen K88 of *Escherichia coli*. II. Isolation and chemical analysis. J. Bacteriol. 93: 731-739.
- Stirm, S., Ørskov, F., Ørskov, I. & Birch-Andersen, A.** 1967b. Episome-carried surface antigen K88 of *Escherichia coli*. III. Morphology. J. Bacteriol. 93: 740-748.

- Taylor, D.N., Echeverria, P., Pal, T., Sethabutr, O., Saiborisuth-Srichamorn, S., Rowe, B. & Gross, J.** 1986. The role of *Shigella* spp., enteroinvasive *Escherichia coli* and other enteropathogens as causes of childhood dysentery in Thailand. *J. Infect. Dis.* 153: 1132-1138.
- Taylor, D.N., Echeverria, P., Sethabutr, O., Pitaranqsi, C., Leksomboon, V., Blacklow, N., Rowe, B., Gross, R. & Gross, J.** 1988. Clinical and microbiologic features of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infections detected by DNA hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1326-1366.
- Thompson, M.R. & Giannella, R.A.** 1985. Revised amino acid sequence for a heat-stable enterotoxin produced by an *Escherichia coli* strain (18D) that is pathogenic for humans. *Infect. Immun.* 47: 834-836.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA.* 76: 4350-4354.
- Trabulsi, L.R.** 1981. Microbiologia das infecções intestinais; atualização em microbiologia clínica. Vol I. Atheneu, R.J. pp 135.
- Tzipori, S., Gibson, R. & Montanaro, J.** 1989. Nature and distribution of mucosal lesions associated with enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in piglets and the role of plasmid-mediated factors. *Infect. Immun.* 57: 1142-1150.

- Vial, P.A., Robins-Browne, R., Lior, H., Prado, V., Kaper, J.B., Nataro, J.P., Maneval, D., Elsaye, A. & Levine, M.M.** 1988. Characterization of enteroadherent aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J. Infect. Dis.* 158: 70-79.
- Wagner, A.R., Murray, B.E., Echeverria, P, Mathewson, J.J. & DuPont, H.L.** 1988. Enteroinvasive *Escherichia coli* in travellers diarrhea. *J. Infect. Dis.* 158: 640-642.
- Weil, E. & Felix, A.** 1918a. Untersuchungen über die gewöhnlichen Proteusstämmen und ihre Beziehungen zu den X-Stämmen. *Wien. Klin. Wochenschr.* 23: 637-639.
- Weil, E. & Felix, A.** 1918b. Ueber die Doppelnatur der Rezeptoren beim Paratyphus β . *Wien. Klin. Wochenschr.* 36: 986-988.
- Wilson, M.R. & Hohmann, A.W.** 1974. Immunity to *Escherichia coli* in pigs: adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to isolated intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 10: 776-782.
- Wittig, W., Prager, R., Stamm, M., Streckel, W. & Tschäpe, H.** 1994. Expression and plasmid transfer of genes coding for the fimbrial antigen F107 in porcine *Escherichia coli* strains. *Zbl. Bakt.* 281: 130-139.
- Wittig, W., Klie, H., Gallien, P., Lehmann, S., Timm, M. & Tschäpe, H.** 1995. Prevalence of the fimbrial antigens F18 and K88 and of enterotoxins and verotoxins among *Escherichia coli* isolated from weaned pigs. *Zbl. Bakt.* 283 : 95-104.
- Yamamoto, T, Gojobori, T. & Yokota, T.** 1987. Evolutionary origin of pathogenic determinants in enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* O1. *J. Bacteriol.* 169: 1352-1357.

- Yano, T., Oliveira, M.S., Fontes, C.F., Almeida, A.C.P. & Pestana de Castro, A.F. 1982.** 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.
- Yano, T., Leite, D.S., Camargo, I.J.B. & Pestana de Castro, A.F., 1986.** A probable new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. *Microbiol. Immunol.*, 30: 495-508.

APÊNDICE

8. APÊNDICE

8.1. Meios de cultura

Todos os meios de cultura utilizados neste trabalho foram esterilizados, normalmente, em autoclave à 121°C por 20 minutos, ou por filtração esterilizante em membrana Millipore de 0,22 µm.

8.1.1. Meio TSB (Trypticase Soy Broth)

O meio TSB (Difco) foi preparado de acordo com as especificações do fabricante.

8.1.2. Meio TSA

Meio TSB	1000 ml
Ágar bacteriológico	15 g

Autoclavados e distribuídos em placas de Petri esterilizadas.

8.1.3. Meio de CAYE (Casaminoacids Yeast Extract)

a) Meio Base

Extrato de levedura	5,00 g
Casaminoácidos	20,00 g
NaCl	2,50 g
K ₂ HPO ₄	8,75 g
Água destilada	1000 ml

b) Solução de sais

MgSO ₄	5,00 %
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,50%
FeCl ₃	0,50%

A solução (b) foi preparada dissolvendo-se as substâncias em 100 ml de H₂SO₄ 0,001 M. Adicionou-se 1 ml da solução de sais para cada 1000 ml do meio base.

8.1.4. Meio Mínimo Essencial de Eagle Modificado (MEM)

O meio MEM (CULTILAB) foi preparado de acordo com as especificações do fabricante, com água bidestilada, pH ajustado para 7,2 com NaHCO_3 à 7,5% e esterilizado por filtração.

8.1.5. Meio Minca

a) Meio Base

KH_2PO_4	1,36 g
Extrato de levedura	1,50 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10,10 g
Glicose	1,00 g
Ágar	20,00 g
Casaminoácidos	1,00 g
Água destilada	1000 ml

b) Solução de sais

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10,000 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,000 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,135 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,400 g
Água Milli Q estéril	1000 ml

Adicionou-se 1 ml da solução de sais para cada 1000 ml do meio base.

8.2. Soluções e Reagentes

Os sais utilizados no preparo das soluções são todos de grau analítico.

8.2.1. Solução de Alsever

Glicose	20,50 g
Citrato de sódio	8,00 g
NaCl	4,20 g
Água destilada	1000 ml

8.2.2. Tampão Fosfato (PB)

Solução A

Fosfato de potássio ou sódio monobásico 1 M

Solução B

Fosfato de potássio ou sódio dibásico 1 M

O pH da solução B foi ajustado com a solução A.

8.2.3. Tampão Salina Fosfatada (PBS)

Para o preparo do tampão fosfato, procedeu-se como descrito acima, ajustando-se o pH em 7,4. Para o preparo do tampão PBS, misturou-se 50 ml de PB com 50 ml de solução de cloreto de sódio (NaCl) 3 M. O volume foi completado para 1000 ml com água destilada.

8.2.4. Tampão Salina Fosfatada com 1% de D-manose (PBS-M)

PBS 0,05 M pH 7,4	100 ml
D-manose	1,0 g

8.2.5. Tampão Trietanolamina (solução estoque)

MgSO ₄ .7H ₂ O	1,20 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,20 g
NaCl	75,00 g
Trietanolamina	28 ml
Água destilada	1000 ml

Ajustado para o pH final 7,4.

8.2.5.1. Tampão Trieta (solução de uso)

Tampão Trieta (solução estoque)	100 ml
Gelatina	0,5 g
Água destilada	1000 ml

8.2.6. Solução de ATV (Associação de Tripsina-Versene)

a) Salina

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	2,9 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Água destilada	1000 ml

Autoclavado e armazenado à 4°C.

b) Tripsina

Tripsina (Difco)	2,0 g
Solução salina (a)	10 ml

c) Solução de Versene

Versene (EDTA)	0,2 g
Solução salina (a)	10 ml

d) Solução de Vermelho de fenol

Vermelho de fenol	0,5 g
NaOH 1 N	3,5 ml

e) Solução final

Solução de tripsina (b)	50,0 ml
Solução de versene (c)	10,0 ml
Solução de vermelho de fenol (d)	1,5 ml

Ajustada para o pH 7,5.

Esterilizada por filtração.

8.2.7. Citrato de Sódio 3,8%

Citrato de sódio	38 g
Água destilada	1000 ml