

ESTUDO COMPARATIVO EM LINHAGENS DE
Enterobacter cloacae **ISOLADAS DE PLANTAS**
E DE CASOS CLÍNICO-HOSPITALARES

JÚLIO RODRIGUES NETO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Tomomasa Yano

Tese apresentada ao Instituto de Biologia,
da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Microbiologia.

CAMPINAS - SÃO PAULO
1997

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	7/UNICAMP
V.	Ex
TOMBO BC/	32992
PROC.	39398
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	07/03/98
N.º CPD	

CM-00106185-0

FICHA CATALAGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA-UNICAMP

Rodrigues Neto, Júlio

R618e Estudo comparativo em linhagens de
Enterobacter cloacae isoladas de plantas
e de casos clínico-hospitalares/ Júlio
Rodrigues Neto. Campinas, SP: s.n. , 1997.
65f. illus.

Orientador: Tomomasa Yano

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual
de Campinas, Instituto de Biologia

1- *Enterobacter cloacae* (bactéria). 2- Infecção
hospitalar. 3- Epidemiologia. I. Yano, Tomomasa.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia. III. Título.

Campinas, 24 de novembro de 1997.

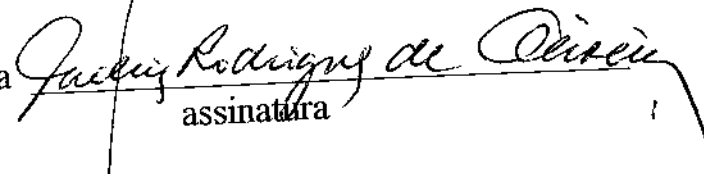
BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

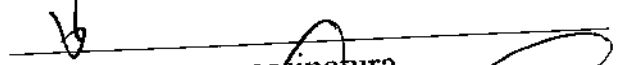
Prof. Dr. Tomomasa Yano (orientador)


assinatura

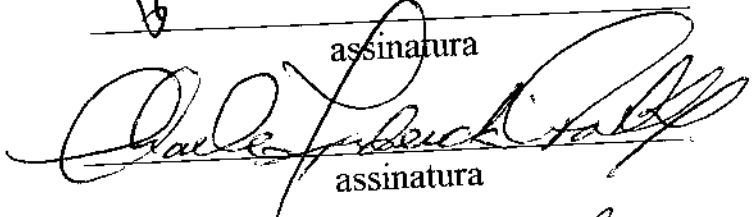
Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira


assinatura

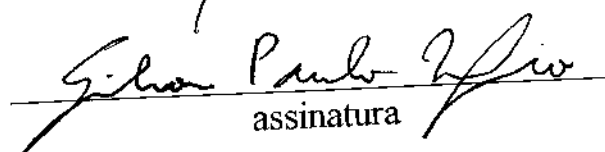
Profa. Dra. Yoko Bomura Rossato


assinatura

Prof. Dr. Charles Frederick Robbs


assinatura

Dr. Gilson Paulo Manfio


assinatura

SUPLENTES:

Dr. Valdemar Atilio Malavolta Júnior

assinatura

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

assinatura

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, pela ajuda incondicional e orientação no decorrer do Curso e elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Charles Frederick Robbs, do Centro de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos/EMBRAPA, pelo fornecimento de culturas bacterianas e valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira, da UNICAMP, pelo tempo dispendido no exame deste trabalho e pelas valiosas críticas e sugestões.

À Profa. Dra. Yoko Bomura Rossato, da UNICAMP/CEBMEG, pelo auxílio e sugestões.

Aos colegas da Seção de Bacteriologia Fitopatológica do Instituto Biológico, Irene, Luís Otávio e Valdemar, pela grande ajuda e incentivo e, sobretudo pela amizade ao longo desta jornada.

Ao Gilson, Mônica, Kátia, Lyrian e Susy, da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, pelo grande auxílio prestado, e um agradecimento especial à Valéria pela enorme paciência e ajuda.

Aos responsáveis pelo Setor de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz, pelo fornecimento de culturas bacterianas.

A minha mãe,

esposa e filhos,

dedico.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
ABREVIACÕES UTILIZADAS	viii
RESUMO	ix
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Culturas bacterianas	11
3.2. Preparo de antissoros	13
3.3. Testes serológicos	13
3.4. Preparo de proteínas totais.....	14
3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	14
3.6. Extração e padronização do DNA genômico das linhagens	14
3.7. “Screening” de primers	15
3.8. Visualização eletroforética dos perfis e análise dos produtos de RAPD	16
3.9. Testes de patogenicidade em bulbos de cebola	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. Testes serológicos	19
4.2. Eletroforese de proteínas totais	22
4.3. RAPD	22
4.3.1. Quantificação dos DNA	22
4.3.2. Seleção de primers e amplificação em PCR	26
4.4. Testes de patogenicidade	36

5. CONCLUSÕES	40
6. BIBLIOGRAFIA	42
7. APÊNDICES	51

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1 - Eletroforese de proteínas totais de 12 linhagens de *E. cloacae*, e linhagens de *E. nimipressuralis* (841) e *E. dissolvens* (1289)..... 23
- Figura 2 - Padronização da concentração de DNA. Da esquerda para a direita: Fago Lâmbda a 9,2; 13,8; 18,4; 23,0; 32,2 e 46,0 ng/μl; C, controle água Milli-Q; canaletas 8 a 21, DNA de linhagens de *E. cloacae* 25
- Figura 3 - “Screening” de primers. Linhagens testadas: 1140 e 1249. Canaletas 1 e 22, 100 BPL e kB DNA Marker, respectivamente..... 27
- Figura 4 - Padrão de bandas obtidos em 20 linhagens de *E. cloacae*, *E. nimipressuralis* e *E. dissolvens*, por amplificação em RAPD, primer UBC # 2 28
- Figura 5 - Padrão de bandas obtidos em 19 linhagens de *E. cloacae* por amplificação em RAPD, primer UBC # 4 29
- Figura 6 - Padrão de bandas obtidos em 19 linhagens de *E. cloacae* e *E. nimipressuralis*, por amplificação em RAPD, primer UBC # 6.... 30
- Figura 7 - Padrão de bandas obtidos em 20 linhagens de *E. cloacae*, *E. nimipressuralis* e *E. dissolvens*, por amplificação em RAPD, primer UBC # 8 31
- Figura 8 - Dendrograma das linhagens de *E. cloacae* obtido a partir do método de “Neighbor-Joining”. As distâncias foram baseadas nas diferenças dos perfis após amplificação em RAPD com primer UBC # 2, concentração 20 ng/μl DNA..... 32

	Página
Figura 9 - Dendrograma das linhagens de <i>E. cloacae</i> obtido a partir do método de “Neighbor-Joining”. As distâncias foram baseadas nas diferenças dos perfis após amplificação em RAPD com primer UBC # 4, concentração 20 ng/μl DNA.....	33
Figura 10 - Dendrograma das linhagens de <i>E. cloacae</i> obtido a partir do método de “Neighbor-Joining”. As distâncias foram baseadas nas diferenças dos perfis após amplificação em RAPD com primer UBC # 8, concentração 20 ng/μl DNA.....	34
Figura 11 - Patogenicidade de <i>E. cloacae</i> em bulbos de cebola. A: linhagem 1251 (clínica) [nível 1 de infecção]; B: linhagem 1184 (manga) [nível 2]; C: linhagem 1250 (clínica) [nível 3]; D: linhagem 1140 (melão) [nível 4]	37

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Origem e código das linhagens de <i>Enterobacter cloacae</i> utilizadas neste estudo	12
Tabela 2 - Resultados dos testes imunológicos de dupla difusão em ágar obtidos com linhagens de <i>E. cloacae</i> , <i>E. dissolvens</i> e <i>E. nimipressuralis</i>	20
Tabela 3 - Quantificação dos DNA obtidos pela técnica de extração com Tiocianato de guanidina	24

**ESTUDO COMPARATIVO EM LINHAGENS DE *Enterobacter cloacae*
ISOLADAS DE PLANTAS E DE CASOS CLÍNICO-HOSPITALARES.**

Autor: JÚLIO RODRIGUES NETO

Orientador: Prof. Dr. TOMOMASA YANO

RESUMO

Vinte linhagens de *Enterobacter cloacae* entre isolados de plantas e de origem clínico-hospitalar foram estudadas por meio de serologia, eletroforese de proteínas totais e RAPD. Teste de patogenicidade em bulbos de cebola também foi aplicado. Com a finalidade de se comparar as linhagens, também foram incluídas neste estudo as culturas tipo de *Enterobacter dissolvens* e *Enterobacter nimipressuralis*.

Serologicamente, foi verificado que as linhagens oriundas de plantas são similares, com exceção de uma linhagem, e puderam ser diferenciadas das linhagens clínicas. Entretanto, quando comparadas por meio de eletroforese de proteínas totais, as linhagens de *E. cloacae* se mostraram mais homogêneas, embora com diferenças nos padrões de proteínas.

Dentre as técnicas empregadas RAPD foi a mais sensível, discriminando três grupos genômicos, onde as linhagens vegetais aparecem

homogêneas e são claramente distinguidas, enquanto que as linhagens clínicas foram distribuídas em vários sub-grupos, devido a sua heterogeneidade. A cultura tipo de *E. cloacae* aparece não relacionada com a maioria das linhagens, o mesmo ocorrendo com *E. nimipressuralis*.

Nos testes de patogenicidade em bulbos de cebola, o grupo das linhagens clínicas também mostrou capacidade fitopatogênica, induzindo colapso interno das escamas, o mesmo ocorrendo com *E. dissolvens* e *E. nimipressuralis*.

Com base nos resultados obtidos, verificou-se que *E. cloacae* isoladas de vegetais, embora oriundas de hospedeiros e regiões geográficas distintas, são estreitamente relacionadas. A hipótese de que vegetais contaminados atuem como “vetores” de *E. cloacae*, introduzindo-a no ambiente hospitalar, deve ser considerada.

COMPARATIVE STUDIES OF *Enterobacter cloacae* STRAINS ISOLATED FROM PLANTS AND CLINICAL ORIGIN.

Author: JÚLIO RODRIGUES NETO

Adviser: Prof. Dr. TOMOMASA YANO

SUMMARY

Twenty strains of *Enterobacter cloacae* isolated from plants and clinical origin including the type strain were studied by serology, electrophoresis and RAPD analysis. A pathogenicity test on onion bulbs were also performed with vegetables and clinical isolates. In addition, the type strains of two related species *Enterobacter dissolvens* and *Enterobacter nimipressuralis* were also included for comparative purposes.

Serologically the strains coming from plants were found to be very similar and could be differentiated from clinical isolates. However *E. cloacae* strains were more homogeneous when compared by cell protein electrophoresis, although the protein patterns revealed some differences.

RAPD was the most discriminatory method employed and three genomic groups were distinguished among cultures. The *E. cloacae* strains isolated from plants were homogeneous and the strains coming from clinical were

distributed in subgroup levels on the two remaining groups. A clear cut differentiation between the plant and clinical strains were evident but it should be noted, however, that clinical strains were also heterogeneous and the type strain of *E. cloacae* appear to be non related to others as well as the strain of *E. nimipressuralis*.

In the pathogenicity tests on onion bulbs, like the plant strains the group comprising clinical origin showed a phytopathogenic capability, inducing a collapse of the inner scales. *E. dissolvens* and *E. nimipressuralis* strains also induced symptoms on onion bulbs.

On the basis of the results obtained in this study, it was verified that *E. cloacae* strains from plants showed close similarity although coming from different hosts and geographical origin and it is suggested that vegetables could act as a “vector” of *E. cloacae* in the hospital environment.

ABREVIACES UTILIZADAS

AP-PCR	=	Arbitrarily Primed - Polymerase Chain Reaction
100BPL	=	100 Base Pair Ladder
API	=	Analytical Profile Index
CPM	=	Complexo Proteico da Membrana
ELISA	=	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
kB	=	KiloBase
NA	=	Nutriente gar
pb	=	Pares de bases
PAGE	=	Poliacrilamide Gel Eletrophoresis
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
PFGE	=	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
PT	=	Proteínas totais
RAPD	=	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	=	Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS	=	Sodio Duodecil Sulfato
SF-REA	=	Small Fragment-Restriction Endonuclease Analysis
TEB	=	Tris-EDTA-Borato
UFC	=	Unidades formadoras de colnias
UV	=	Ultra violeta
V	=	Volts

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A bactéria *Enterobacter cloacae* (Jordan 1890) Hormaeche & Edwards 1960, conhecida há mais de um século, é um microrganismo amplamente distribuído na natureza, ocorrendo nos mais variados ambientes, incluindo entre outros, a superfície de plantas, frutos e legumes, água de fontes e esgotos, solos, insetos, ambiente hospitalar, e como comensal na pele e no trato intestinal do homem e animais.

É importante salientar que sob determinadas condições ambientais, esta bactéria pode se tornar fitopatogênica pois, já foi observada causando doença em várias espécies de plantas como a cebola, mamoeiro, meloeiro e mangueira, entre outras.

Assim, como a maioria das espécies do gênero *Enterobacter*, na medicina humana e veterinária *E. cloacae* é considerada um patógeno oportunista e, devido ao seu potencial de resistência a antibióticos, a sua incidência em infecções hospitalares tem sido relatada com frequência. Portanto, é de se esperar nesta espécie bacteriana uma alta capacidade de adaptação a novos ambientes e, em consequência, a permanência após sua introdução em locais anteriormente indenes, por exemplo, em unidades hospitalares ou em plantios comerciais de determinada espécie vegetal. Esta característica faz supor uma grande diversidade nesta espécie bacteriana.

Várias fitobactérias tem sido associadas a casos clínicos e, além do pessoal e instrumental, os alimentos vegetais contaminados estão entre os fatores que podem elevar o potencial de inóculo no ambiente hospitalar, uma vez que a presença de *E. cloacae* tem sido continuamente detectada em vegetais. Portanto, procurou-se no presente estudo analisar e comparar linhagens isoladas de vegetais e oriundas de casos clínicos.

Foram estudadas vinte linhagens de *E. cloacae*, sendo dez provenientes de vegetais, nove de origem clínica e uma linhagem de água de fonte contaminada objetivando analisar o relacionamento serológico entre as linhagens, verificar a existência de similaridades ou diferenças em padrões de proteínas totais, analisar sequências de DNA amplificadas arbitrariamente para tentar reconhecer variações entre as linhagens e avaliar a capacidade das linhagens clínicas em infectar vegetais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A bactéria *Enterobacter cloacae* (Jordan 1890) Hormaeche & Edwards 1960 pertencente a família *Enterobacteriaceae*, é encontrada em muitos ambientes naturais, incluindo a superfície de plantas, água, esgotos, solo e alimentos, bem como em ambiente hospitalar, onde é considerada um patógeno emergencial, principalmente devido a sua capacidade de resistência a várias substâncias antimicrobianas (MURRAY *et al.*, 1983; SANDERS & SANDERS, 1985; MODI *et al.*, 1987; ANDERSEN *et al.*, 1989; LINDH *et al.*, 1990; ANDRESEN *et al.*, 1994).

Na agricultura, *E. cloacae* é encontrada normalmente como integrante da flora microbiana de muitos vegetais e no trato intestinal de insetos. Por outro lado, esta espécie bacteriana tem sido utilizada em vários experimentos para o controle biológico de fitopatógenos, como é o caso do fungo *Pythium ultimum* Trow., agente causal do tombamento (“damping-off”) das cucurbitáceas e de outras plantas (HADAR *et al.*, 1983; HOWEL *et al.*, 1988; LYNCH *et al.*, 1991; NELSON & MALONEY, 1992). Em alguns casos, verificou-se redução do crescimento do fungo em até 41% (NELSON *et al.*, 1986). O processo de inibição pela bactéria está relacionado a adesão das células bacterianas às hifas do fungo, alterando o seu crescimento normal. Em outro experimento, NELSON & CRAFT (1991) obtiveram redução de infecção pelo fungo *Sclerotinia homoeocarpa* Bennett em gramíneas da ordem de até 63% por meio de aplicações

de *E. cloacae* (linhagens EcCT-501 e E1). Segundo aqueles autores, o biocontrole daquele fungo foi tão efetivo na redução da doença (“dollar spot”) quanto a aplicação dos fungicidas iprodione ou propiconazole, normalmente aplicados para tal fim.

Outro exemplo é o emprego de *E. cloacae* para o biocontrole do fungo *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Unill, fitoparasita que causa podridão em pós-colheita de frutos de pessegueiro (*Prunus persica* Sieb. & Zucc.), onde WILSON *et al.* (1987) conseguiram inibir a infecção por *Rhizopus* em até 70%, durante mais de cinco dias. Posteriormente, WISNIEWSKI *et al.* (1989) verificaram que a inibição da germinação dos esporos de *Rhizopus stolonifer* era dependente da concentração de *E. cloacae*, e que a competição por nutrientes poderia estar envolvida no processo de adesão às hifas do fungo. LORITO *et al.* (1993) realizando testes “in vitro” com enzimas quitinolíticas produzidas pelo fungo *Trichoderma harzianum* Rifai em associação com *E. cloacae* para o biocontrole de fungos fitopatógenos, verificou efeito sinérgico naquela combinação para inibição da formação de esporos e emissão do tubo germinativo dos fungos *Botrytis cinerea* Person, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. e *Uncinula necator* (Schw.) Burril, aumentando aparentemente, a habilidade de adesão às hifas e parede celular diminuindo, portanto, a capacidade de produção de enzimas degradadoras pelos fungos.

A literatura cita inúmeros exemplos do emprego de *E. cloacae* em testes visando o biocontrole de agentes fitopatogênicos, bem como da sua aquisição e persistência em insetos, inclusive com produção de substâncias antibacterianas por parte destes.

Entretanto, *E. cloacae* é particularmente importante na patologia vegetal, em que vários trabalhos de pesquisa relatam suas propriedades fitopatogênicas. As primeiras evidências da ação patogênica de *E. cloacae* às

plantas foram notadas por GEORGE *et al.* (1976), onde aqueles autores relataram uma *Enterobacteriaceae* (estritamente relacionada a *E. cloacae*) causando podridão em coqueiros (*Cocus nucifera* L.) na Índia. Anteriormente, TANII *et al.* (1974) já haviam isolado *E. cloacae* de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) em associação com *Erwinia*, *Brevibacterium* e *Pseudomonas*, entretanto sem confirmar o seu envolvimento no processo da doença. Posteriormente, COTHER & DOWLING (1986) isolaram *E. cloacae* de bulbos de cebola (*Allium cepa* L.) armazenados, apresentando sintomas de colapso interno das escamas, associando a bactéria aos sintomas observados. Um ano após, WICK *et al.* (1987) e NISHIJIMA *et al.* (1987) relatam *E. cloacae* causando doença em brotações de feijão Mung (*Phaseolus vulgaris* L.) e descoloração (amarelecimento) da polpa de mamão (*Carica papaya* L.), respectivamente. No último caso, merece destaque o fato de que *E. cloacae* foi também isolada de flores do mamoeiro e de moscas (*Bactrocera dorsalis* Hendell) visitadoras da inflorescência, sugerindo que estas e outros insetos presentes no plantio, poderiam estar atuando como agentes de dispersão da bactéria. NISHIJIMA *et al.* (1987) isolaram *E. cloacae* também de água de tanques de lavagem dos frutos após colheita e, em testes de patogenicidade efetuados em mamão, nos quais foram empregados isolados de frutos, flores, insetos e da água, aqueles autores não observaram diferenças significativas entre os isolados. BISHOP & DAVIS (1990) estudando uma doença em plantio de cebola, ocorrida na região de “San Joaquim Valley”, na Califórnia, Estados Unidos, e cujos sintomas se assemelhavam aos descritos por COTHER & DOWLING (1986), concluíram ser também *E. cloacae* o agente causal. Entretanto, ao contrário do relato de COTHER & DOWLING (1986), no caso estudado por BISHOP & DAVIS (1990), a doença ocorreu no campo de produção causando perdas de aproximadamente 1,5 % da produção e,

aparentemente, estava relacionada à condições de temperatura elevadas, frequentes na região mencionada.

No Brasil, *E. cloacae* causando doença em plantas foi primeiramente observada por ROBBS *et al.* (1995) que isolaram a bactéria de frutos de melão (*Cucumis melo* L.) originários da região norte do país, com sintomas de descoloração da polpa. Aquela espécie bacteriana foi também isolada de frutos de mamão, manga (*Mangifera indica* L.) e alface (*Lactuca sativa* L.) (C.F. Robbs, comunicação pessoal).

Com relação à infecções hospitalares, este microrganismo tem sido frequentemente isolado de indivíduos imunologicamente comprometidos, como é o caso de pacientes em pós-operatório, traumatizados por ferimentos ou queimaduras, ou ainda, de crianças nascidas prematuras em unidades neonatais, sendo também isolado da urina, sangue e do trato respiratório, podendo se tornar invasivo em procedimentos médicos, tais como cateterização e entubação, resultando muitas vezes em septicemia.

Assim, casos de infecção por *E. cloacae* foram observados por FLYNN *et al.* (1987) e ANDERSEN *et al.* (1989) em pacientes que sofreram cirurgias cardíacas, e, aqueles autores concluíram que as infecções se originaram tanto da flora microbiana normal dos pacientes como de infecção cruzada.

JOHNSON & RAMPHAL (1990) e McCONKEY *et al.* (1989) relatam, por sua vez, que pacientes submetidos à terapia antimicrobiana por meio de antibióticos também contraíram infecção por *E. cloacae*, possivelmente através dos materiais utilizados na administração das soluções antimicrobianas. FLYNN *et al.* (1987) indicam que a frequência de infecções por *E. cloacae* em pacientes pós-operatório é maior quando originada pela própria flora microbiana do paciente através do fluxo sanguíneo.

Uma característica notável em *E. cloacae* é a sua variabilidade. Diferenças bioquímicas, serológicas e genômicas foram observadas ao longo dos anos em isolados de diferentes origens. KUHN *et al.* (1991) pesquisando 64 linhagens de *E. cloacae* isoladas em 22 unidades neonatais em hospitais da Suécia determinaram 49 fenótipos bioquímicos, concluindo que a alta ocorrência de *E. cloacae* naquelas unidades, aliada a grande heterogeneidade bacteriana, pode ser devida ao fato daquele microrganismo ser continuamente introduzido no ambiente hospitalar. LAMBERT-ZECHOVSKY *et al.* (1992) analisaram por meio de RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) do DNA genômico e DNA ribossômico (ribotipagem) um caso de meningite e bacteremia sistêmica em recém-nascido, e a análise genética obtida mostrou semelhança nas linhagens isoladas do sangue, urina e fluido espinal e, diversidade nas linhagens utilizadas comparativamente, concluindo ser de natureza endógena tanto a bacteremia como a meningite observadas no mesmo paciente. Concluíram também que a ribotipagem é um método que oferece vantagem sobre os convencionais. Anteriormente, GARAIZAR *et al.* (1991) comparando a ribotipagem com outros métodos para a identificação de *E. cloacae*, observaram que esta técnica oferece poucas vantagens sobre uma combinação de métodos, mas que a ribotipagem possibilita a obtenção de discriminação entre linhagens, de grande utilidade em estudos epidemiológicos. Aqueles autores verificaram também, naquele estudo, a alta percentagem de infecções cruzadas entre pacientes, confirmando as observações de GASTON & WARNER (1989).

Esta diversidade observada em *E. cloacae* tem induzido pesquisas no sentido da tipagem desta espécie bacteriana, indispensáveis para o conhecimento da epidemiologia das doenças causadas por aquele organismo. Deste modo, GASTON *et al.* (1983) já utilizavam a serotipagem para antígeno O e, em 28 antígenos produzidos para cerca de 300 isolados clínicos, conseguiram a

tipagem de 78% dos isolados, obtendo 8 tipos serológicos mais frequentes. GASTON (1987) desenvolveu também um esquema de fagotipagem, em que utilizou 25 fagos para *E. cloacae*, discriminando cerca de 79% dos isolados, correlacionando-os aos grupos antigênicos O mais comuns. Posteriormente, GASTON & WARNER (1989) estudando aspectos epidemiológicos de *E. cloacae* por meio de eletroforese, para avaliar o polimorfismo enzimático daquela bactéria, demonstraram que em 62 linhagens pesquisadas para 13 enzimas discriminatórias, 3 enzimas (lactato dehidrogenase, 6-fosfato dehidrogenase e glutamato dehidrogenase) poderiam ser utilizadas para a tipagem de isolados clínicos.

LIND & URSING (1991) estudando uma coleção de 123 isolados de *E. cloacae*, oriundos de hospital em Malmö na Suécia, por meio de hibridização DNA-DNA, estabeleceram 5 grupos genômicos, sendo que um dos grupos foi constituído por 98 isolados, predominantes. No mesmo estudo aqueles autores encontram 9 padrões fenotípicos utilizando o sistema API 20E.

Com a finalidade de identificar grupos e determinar a rota de transmissão de *E. cloacae* em hospital na localidade de Osnabrück, Alemanha, HAERTL & BANDLOW (1993) pesquisaram 62 linhagens daquela espécie bacteriana, sendo 12 linhagens oriundas de unidade neonatal e as restantes de casos clínicos e ambiente hospitalar. Utilizando técnicas de SF-REA ("Small Fragment - Restriction Endonuclease Analysis") e PFGE ("Pulsed Field Gel Electrophoresis"), aqueles autores observaram que dentre os 12 isolados em unidade de terapia intensiva neonatal, 11 foram considerados do mesmo grupo genômico, evidenciando que as infecções foram causadas pela mesma linhagem. Os demais isolados representaram grande diversidade. HAERTL & BANDLOW (1993) concluíram também que a combinação de SF-REA e PFGE são de grande utilidade para pesquisas epidemiológicas de *E. cloacae*.

Em estudo semelhante, POILANE *et al.* (1993) empregando a tipagem por antibiograma, biotipagem por API 20E e ribotipagem de DNA tratados pelas enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*, concluíram não ser possível estabelecer padrão por biotipos, porém a ribotipagem permitiu discriminar as linhagens e identificar infecções cruzadas nas unidades pesquisadas. GRATTARD *et al.* (1994) empregando a técnica de AP-PCR (“Arbitrarily Primed - PCR = também conhecida por RAPD-PCR”) em combinação com a ribotipagem e análise de plasmídeos, discriminaram linhagens de *E. cloacae*. Estes autores, no entanto, não obtiveram resultados satisfatórios com plasmídeos, em conformidade com relato de HAERTL & BANDLOW (1993).

A diversidade presente em linhagens de *E. cloacae* foi bem estabelecida por HARTSTEIN *et al.* (1995), que através de estudo comparativo de agentes de infecções bacterianas múltiplas, causadas por *Staphylococcus aureus* Rosenbach, *Enterococcus faecalis* (Andrewes & Horder) Schleifer & Kilpper-Balz, *Escherichia coli* (Migula) Castellani & Chambers, *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula, *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter) Trevisan e *E. cloacae*, utilizando PFGE verificaram que, enquanto *E. cloacae* mostrava ser heterogênea indicando que os pacientes foram colonizados por diferentes linhagens, as demais espécies pesquisadas apresentavam tipo estável de DNA em vários isolamentos realizados em diferentes períodos.

Em nosso meio, a bactéria *E. cloacae* foi detectada causando óbitos em neonatais em unidade do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) e Hospital da Clínicas da Unicamp, por duas ocasiões. A primeira ocorrência em 1995 e a segunda em 1997, possivelmente, devido à nutrição parenteral contaminada. Relatos destes casos ainda não estão disponíveis na literatura.

A ocorrência de espécies bacterianas de origem clínica em vegetais e vice-versa é um fato conhecido. Além de *E. cloacae*, outras espécies clínicas foram detectadas causando patologia em vegetais, como é o caso de *Pantoea agglomerans* (Beijerinck) Gavini *et al*, estudada por MERGAERT *et al*. (1983) e por LIND & URSING (1991), e de *Pseudomonas aeruginosa*, conforme relato de LEBEDA *et al*. (1984). No caso de *Burkholderia cepacia* (ex *Burkholder*) Yabuuchi *et al*., trata-se de importante fitopatógeno frequentemente isolado de casos clínicos, conforme observado por BRADBURY (1986). Outras espécies de fitobactérias também são citadas na literatura como agentes de infecção hospitalar, como *Agrobacterium* sp. (FRENEY *et al*., 1985) e *Herbaspirillum* “species 3” (BALDANI *et al*., 1996).

Mesmo com um número razoável de esquemas para a tipificação de *E. cloacae*, as relações entre as linhagens oriundas de diferentes ambientes, incluindo isolados clínicos e de vegetais ainda é pouco conhecida (ROBBS, 1997). Estudos neste sentido poderiam prover informações para o melhor conhecimento da epidemiologia de *E. cloacae*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Culturas bacterianas.

Um total de vinte linhagens de *E. cloacae* foi empregado neste estudo, sendo dez isoladas de vegetais, nove de origem clínica, incluindo a cultura tipo ATCC 13047 (= IBSBF 1238^T), e uma linhagem isolada de água de fonte contaminada procedente de Uberlândia (MG). Além das linhagens de *E. cloacae*, também foram incluídas neste estudo, as culturas tipo de *Enterobacter dissolvens* ICMP 1570 (= IBSBF 1289) e *Enterobacter nimipressuralis* ICMP 1577 (= IBSBF 841), em virtude de serem consideradas estreitamente relacionadas à *E. cloacae* (STEIGERWALT *et al.*, 1976; BRENNER *et al.*, 1986; RICHARD, 1984). A TABELA 1 mostra a origem e/ou procedência das culturas utilizadas.

Para a realização dos testes as linhagens foram cultivadas em meio Nutriente Ágar (NA) e incubadas a 28° C / 24 h.

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Md, EUA.

IBSBF =. Coleção de Culturas da Seção de Bacteriologia Fitopatológica, Instituto Biológico, Estação Experimental de Campinas

ICMP = International Collection of Micro-organisms from Plants, Auckland, Nova Zelândia

TABELA 1. Origem e código das linhagens de *Enterobacter cloacae* utilizadas neste estudo.

ORIGEM	PROCEDÊNCIA	CÓDIGO IBSBF	OBSERVAÇÕES
Água de fonte	Uberlândia, MG	1187	CTAA 49-1
<i>Cucumis melo</i> (melão)	Açú, RN	1140	CTAA 35-L4
		1141	CTAA 35-L1
		1142	CTAA 35-L2
		1143	CTAA 35-L3
		1189	CTAA 53-1
<i>Carica papaya</i> (mamão)	Linhares, ES	1186	CTAA 51-1
		1188	CTAA 51-2
<i>Lactuca sativa</i> (alface)	Rio de Janeiro, RJ	1291	CTAA 3430
<i>Mangifera indica</i> (manga)	Rio de Janeiro, RJ	1184	CTAA 50-1
		1185	CTAA 50-2
Clínica (neonatal)	CAISM	1176	FCM/UNICAMP
		1177	FCM/UNICAMP
		1178	FCM/UNICAMP
Clínica (fezes)	Vitória, ES	1231	-
		1233	-
Clínica (fluido espinal)	CCT 0546	1238 ^T	ATCC 13047
Clínica (provavelmente humano)	IAL 24	1249	CDC 3430
	131	1250	CDC 3054
	133	1251	CDC 351

CCT = Coleção de Culturas Tropical, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", Campinas.

CDC = Centers for Diseases Control, Atlanta, Ga, EUA.

CTAA = Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ

FCM = Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, SP

IAL = Instituto Adolfo Lutz, São Paulo

CAISM = Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (UNICAMP)

3.2 - Preparo de antissoros.

Cinco antissoros foram preparados por meio da imunização de coelhos com as linhagens 1142 (melão) [AS-1142], 1177 (CAISM) [AS-1177], 1185 (manga) [AS-1185], 1186 (mamão) [AS-1186] e 1238^T (linhagem tipo) [AS-1238].

A imunização dos coelhos foi realizada com células inteiras das linhagens de *E. cloacae* cultivadas em NA durante 24 h, a 28° C, através de três injeções, sendo duas emulsionadas em adjuvante Freund incompleto, e aplicadas na região dos linfonódulos das patas traseiras (0.5 ml/injeção), segundo técnica descrita por OLIVEIRA (1975), e a intervalo de dez dias. A última injeção do antígeno foi feita via endovenosa, com as células suspensas em salina 0.85%, após sete dias da segunda imunização. A concentração aproximada do antígeno imunizante foi de 10⁹ UFC/ml.

A coleta do soro foi efetuada a partir do 22° dia da primeira imunização, seguindo-se até o 25° dia, coletando-se cerca de 20 ml de sangue diariamente. O antissoro produzido foi separado por meio de centrifugação e estocado a -20° C.

3.3 - Testes serológicos.

Os testes serológicos efetuados foram do tipo precipitação antígeno-anticorpo em lâminas de dupla difusão em ágar, utilizado-se como antígenos proteínas extraídas das membranas das células (CPM), extraídas mediante tratamento com cloreto de lítio 0,2 M e aquecimento a 45° C / 2 h, segundo técnica descrita por TAVEECHAI & SCHAAD (1986) [Apêndice 1]. A concentração ótima antígeno-anticorpo foi determinada segundo PIAZZI (1959).

3.4 - Preparo de proteínas totais.

Proteínas totais (PT) das células bacterianas foram obtidas das linhagens cultivadas em NA, incubadas a 28° C / 24 h. Cerca de 20-30 mg de células bacterianas foram ressuspensas em tubos contendo 200 µl de solução Tampão de Amostra (7,5 g Tris HCl; 2,0 g SDS; 50 ml β-mercaptoetanol; 100 ml glicerol, em 1000 ml de água destilada). A seguir, os tubos contendo as linhagens foram aquecidos a 95° C durante 10 min, resfriados em gelo e centrifugados a 12,000 x g / 3 min. O sobrenadante contendo o extrato de proteínas totais foi separado e armazenado a -20° C.

3.5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).

As proteínas totais obtidas foram analisadas pelo sistema descontínuo em gel de poliacrilamida duodecil sulfato de sódio (PAGE / SDS) [Apêndice 2], segundo técnica descrita por LAEMMLI (1970) em cuba vertical, com o gel na concentração de 10 %, sob corrente contínua de 30 mA, durante 5-6 horas. Após a corrida, os géis foram submetidos à coloração por prata, de acordo com metodologia descrita por BLUM *et al.* (1987) [Apêndice 3].

3.6 - Extração e padronização do DNA genômico das linhagens.

A metodologia descrita por PITCHER *et al.* (1989) foi utilizada para a extração do DNA genômico das linhagens de *E. cloacae*, previamente cultivadas em meio NA a 28° C/ 24 h, onde as células bacterianas foram suspensas em 100 µl do tampão de lise contendo 2 mg/ml de lisozima e incubadas a 37° C/ 30min. Posteriormente, as amostras foram tratadas com solução de tiocianato de guanidina 5 M por 10 min e tratadas a seguir com 250 µl de acetato

tiocianato de guanidina 5 M por 10 min e tratadas a seguir com 250 µl de acetato de amônio. Em seguida, os DNA foram purificados com 500 µl de clorofórmio-álcool-isoamílico, lavados a seguir com etanol 70% e recuperados por centrifugação, sendo ressuspensos em água Milli-Q estéril e estocados a 4°C [Apêndice 4]. Após a extração, a pureza e quantificação do DNA foram feitas em espectrofotômetro UV, absorvâncias de 230, 260 e 280 nm.

O DNA obtido foi padronizado quanto à sua concentração, aplicando-se 2 µl de cada amostra, adicionados de 2 µl do tampão de amostra [Apêndice 5] em gel de agarose a 0,7% (acrescidos de 2 µl de brometo de etídio/ 100 ml gel) e, comparando-se visualmente a intensidade das bandas com DNA do Fago Lâmbda aplicado no mesmo gel, a concentrações variando de 4,6 a 46,0 ng [Apêndice 6].

3.7 - “Screening” de primers.

Dezoito primers UBC (“The University of British Columbia” - Nucleic Acid-Protein Service Unit, Biotechnology Laboratory, Vancouver, B.C., Canadá) foram testados para se avaliar a amplificação dos DNA (10 ng) obtidos de duas linhagens escolhidas ao acaso (1140 e 1249) em RAPD, testando-se seis primers de cada vez. Inicialmente foi preparada a Master Mix [Apêndice 7], sendo distribuídas a seguir as amostras de DNA e alíquotas dos primers nos tubos de PCR, adicionando-se, posteriormente, a solução Master Mix na proporção calculada para o número de reações, tendo o volume final de 25 µl/ tubo de PCR. A seguir, os tubos de PCR foram colocados em ciclizador térmico ajustando-se o volume e programa desejado [Apêndice 8].

A amplificação foi procedida em aparelho termociclizador

Perkin-Ellmer 9600 - GeneAmpPCR System, durante 3 horas e volume de 25 μ l em cada reação. O programa selecionado consiste de: 1 x (2 min a 94°C); 30 x (30 seg a 94°C, 30 seg a 36, 60 seg a 72°C); 1 x (3 min a 72°C).

3.8 - Visualização eletroforética dos perfis e análise dos produtos de RAPD.

Os perfis obtidos no processo de RAPD foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,2 % (4 mm espessura) em tampão TEB [Apêndice 5] acrescido de brometo de etídeo na concentração de 10 μ g/100 ml, aplicando-se os padrões de peso molecular na primeira e última canaleta do gel, sendo “KiloBase DNA Marker” (Pharmacia Biotech 27-4004-01) 0,5 μ g/ μ l, e “100 Base-Pair Ladder” (Pharmacia Biotech 27-4001-01) 1 μ g/ μ l, e, 5 μ l dos produtos de cada reação de amplificação em RAPD, acrescidos de 2 μ l de tampão de amostra [Apêndice 5]. A eletroforese foi corrida em tampão TEB a 50 V nos primeiros 15 min e, posteriormente, a 80 V, fotografando-se o gel em transiluminador UV após a corrida.

As misturas de fragmentos de DNA produzidas pela amplificação de cada primer em cada linhagem apresentaram um padrão de bandas de diferentes pesos moleculares. De acordo com a migração relativa das bandas foi estimado o número de pares de bases (pb) utilizando-se o Programa Eletroforese/CBMEG (elaborado por Adilson Leite, 1989), que calcula o pb. [Apêndices 9 a 14].

Os valores obtidos foram comparados entre si para avaliar-se as similaridades, computando-se a presença/ausência das bandas no gel, assumindo-se que bandas na mesma posição são equivalentes.

Para a análise da similaridade entre as linhagens, utilizou-se o Pacote de Programas “RAPDistance”, versão 1.03 para Análise de Padrões de Fragmentos de RAPD, oferecido por J.S.Armstrong e outros em 1994. O programa bem como as informações sobre o formato dos arquivos e utilização de RAPDistance estão disponíveis na Internet no seguinte endereço: <ftp://life.anu.edu.au/pub/software/RAPDistance>.

Uma vez obtidas as similaridades, os dados foram utilizados para a construção dos dendrogramas, por meio do Programa “Neighbor-Joining” (NJTREE), em que se calcula a distância patrística entre diferentes pares de UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais).

3.9 -Testes de patogenicidade em bulbos de cebola.

Os testes de patogenicidade foram feitos em bulbos de cebola inteiramente formados (maduros) empregando-se as linhagens bacterianas previamente cultivadas em NA durante 24 h à 28° C e suspendidas em água destilada estéril, aproximadamente a 10^8 UFC/ml.

Os bulbos de cebola foram inoculados na parte superior (pescoço), infiltrando-se com seringa hipodérmica, cerca de 0,5 ml da suspensão bacteriana. Após as inoculações, os bulbos foram mantidos em câmara úmida a 37° C. Bulbos testemunhas sofreram o mesmo tratamento com água estéril.

A patogenicidade das linhagens foi avaliada sete dias após a inoculação, adotando-se a seguinte escala:

0 = tecidos inalterados, sem descoloração;

1 = ligeira descoloração, cerca de 1-2 cm ao redor do ponto inoculado;

2 = escamas internas com descoloração ou flácidas;

3 = escamas internas flácidas e descoloridas do topo até a base;

4 = tecidos descoloridos e flácidos em metade ou bulbo inteiro.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Testes serológicos

Pode ser observado na TABELA 2 que as linhagens 1142 e 1185, isoladas de melão e manga respectivamente, mostraram padrão antigênico semelhante, apresentando reações de identidade com todas as linhagens oriundas de vegetais, com pequenas variações nos padrões das linhas de precipitação. A linhagem 1185 (melão) também mostrou reação com duas linhagens clínicas (1231 e 1251), embora com menor número de linhas de precipitação do que o observado com antígenos das linhagens de origem vegetal. Por outro lado, o antissoro obtido a partir da linhagem 1186 (mamão) induziu reação apenas com o antígeno homólogo e com a linhagem 1187 (água de fonte), demonstrando ser relacionado serologicamente com esta linhagem.

Com relação às linhagens de origem clínica, o AS-1177 produziu linhas de precipitação com o antígeno homólogo e linhagens oriundas do CAISM (1176, 1178) e, uma reação cruzada com a linhagem 1186 (mamão), entretanto, com padrão de linhas de precipitação diferente. O AS-1238 (produzido contra a tipo) reagiu apenas contra o antígeno homólogo, não sendo detectada nenhuma outra reação, indicando que esta linhagem não é relacionada serologicamente com as demais linhagens estudadas. Não foram observadas reações contra antígenos das espécies *E. dissolvens* e *nimipressuralis*.

TABELA 2. Resultados dos testes imunológicos de dupla difusão em ágar obtidos com linhagens de *E. cloacae*, *E. dissolvens* e *E. nimipressuralis*.

ANTIGENOS (CPM)		ANTI S S Ó R O S				
ORIGEM	CÓDIGO IBSBF	AS-1142 (melão)	AS-1185 (manga)	AS-1186 (mamão)	AS-1177 (CAISM)	AS-1238 ^T (L.tipo)
Água de fonte	1187	-	+++	-	-	-
<i>Cucumis melo</i> (melão)	1140	+++	-	-	+++	-
	1141	++	-	-	+++	-
	1142	+++	-	-	+	-
	1143	+++	-	-	+++	-
	1189	+++	-	-	+++	-
<i>Carica papaya</i> (mamão)	1186	-	+++	+	-	-
	1188	+++	-	-	+++	-
<i>Lactuca sativa</i> (alface)	1291	-	-	-	-	-
<i>Mangifera indica</i> (manga)	1184	+++	-	-	+++	-
	1185	+++	-	-	+++	-
Clínica (neonatal)	1176	-	-	+++	-	-
	1177	+	-	+++	-	-
	1178	-	-	++	-	-
Clínica (fezes)	1231	-	-	-	+	-
	1233	-	-	-	-	-
Clínica (fluido espinal)	1238 ^T	+	-	-	-	++
Clínica (provavelmente humano)	1249	-	-	-	-	-
	1250	-	-	-	-	-
	1251	-	-	-	+	-
<i>E. nimipressuralis</i>	841	-	-	-	-	-
<i>E. dissolvens</i>	1289	-	-	-	-	-

+++ = formação de 2 linhas, com identidade;

++ = formação de 1 linha de identidade;

+ = presença de fraca linha de precipitação

- = ausência de reação

Verificou-se por meio da serologia que as linhagens de origem vegetal empregadas são mais homogêneas, e com exceção da linhagem 1186 isolada de mamão procedente de Linhares, ES, que reagiu apenas com o antígeno homólogo e com a linhagem 1187 (de água de fonte), e também da linhagem 1291 (isolada de alface), que não mostrou reação com nenhum dos antissoros, as demais linhagens reagiram entre si. De modo geral, os antissoros produzidos com células inteiras e utilizados em reações de dupla difusão, possibilitaram diferenciar 2 grupos básicos: as linhagens oriundas do CAISM e as isoladas de vegetais.

Outras técnicas serológicas poderiam ter sido pesquisadas, como é o caso da serotipagem pelo antígeno O, preconizada por GASTON *et al.* (1983), ou ainda pela produção de anticorpos monoclonais utilizados em testes ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), que possibilitariam, inclusive, a construção de matriz para análise dos resultados e serotipagem, por exemplo, como foi estabelecido por BOUZAR *et al.* (1994) para uma espécie de *Xanthomonas*. Entretanto, no presente estudo, no qual se procurou avaliar o relacionamento entre linhagens com a utilização de proteínas da membrana como antígeno, a técnica de dupla difusão foi satisfatória, pois permitiu a observação de diferenças nos padrões de bandas de imunodifusão, não detectáveis em testes ELISA.

4.2 - Eletroforese de proteínas totais.

Os perfis eletroforéticos de proteínas totais das 22 linhagens de *E. cloacae* foram comparados visualmente. Dentre as linhagens, verificou-se um grande número de bandas discretas, variando de 10 a 120 kDa. O padrão das linhagens de *E. cloacae* mostra duas bandas características, uma de peso molecular ao redor de 55 kDa, e outra a 70 kDa, aparentemente marcadora da espécie. Verificou-se também a presença de bandas diferenciadoras entre linhagens, principalmente entre as de origem clínica. A FIGURA 1 mostra algumas das diferenças observadas entre 12 linhagens de *E. cloacae*. Por outro lado, o padrão obtido com a linhagem 841 (*E. nimipressuralis*) apresenta diferenças significativas quando comparado com as demais linhagens. Este fato pode ser indicador de que *E. nimipressuralis* é uma espécie não relacionada à *E. cloacae*. Em contraste, grande número de bandas são comuns entre as linhagens de *E. cloacae* e a linhagem de *E. dissolvens*.

4.3 - RAPD

4.3.1 - Quantificação dos DNA.

Os DNA extraídos de *E. cloacae*, *E. dissolvens* e *E. nimipressuralis* apresentaram os valores (ng/μl) expressos na TABELA 3. Por meio destes valores foi possível efetuar as diluições apropriadas para a padronização dos DNA e posterior amplificação em PCR. A FIGURA 2 ilustra uma das padronizações efetuadas, comparando-se com Fago Lâmbda aplicado a diluições conhecidas.

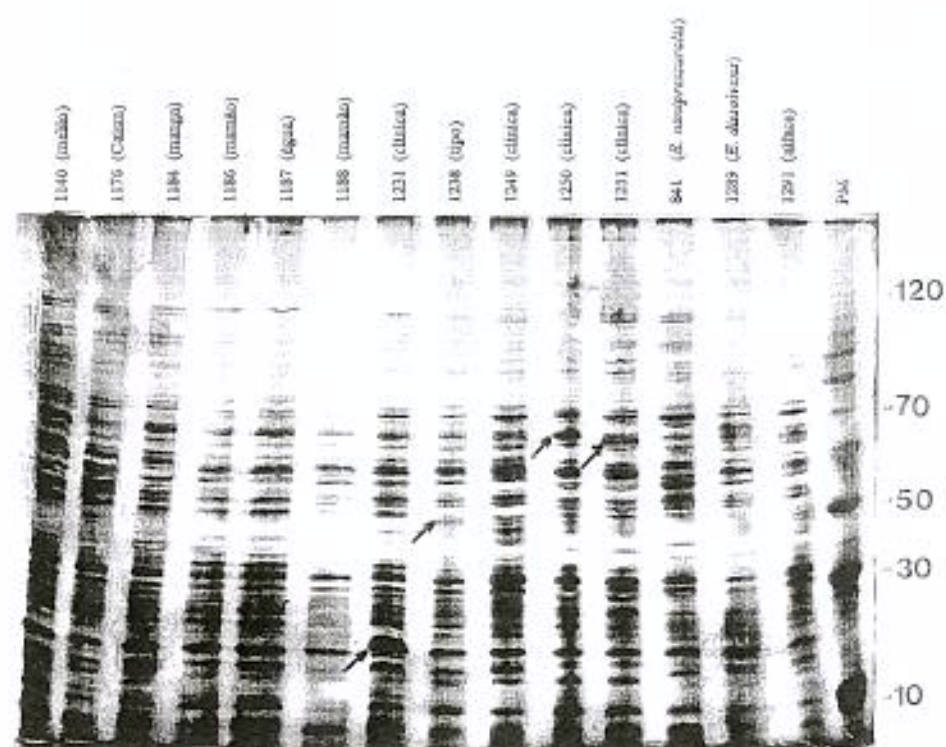


FIGURA 1. Eletroforese de proteínas totais de 12 linhagens de *E. cloacae*, e linhagens de *E. nimipressuralis* (841) e *E. dissolvens* (1289)

TABELA 3. Quantificação dos DNA obtidos pela técnica de extração com Tiocianato de guanidina.

LINHAGEM		DNA (ng/μl)	PROTEÍNAS (mg/μl)	PUREZA (%)
ORIGEM	CÓDIGO IBSBF			
Água de fonte	1187	100	0.0	57
<i>Cucumis melo</i> (melão)	1140	500	0.0	76
	1141	210	0.0	92
	1142	210	0.0	79
	1143	200	0.0	71
	1189	550	0.0	93
<i>Carica papaya</i> (mamão)	1186	310	0.0	90
	1188	970	0.0	95
<i>Lactuca sativa</i> (alface)	1291	380	0.0	96
<i>Mangifera indica</i> (manga)	1184	640	0.0	82
	1185	300	0.0	59
Clínica (neonatal)		740	0.1	77
	1176	220	0.0	85
	1177	310	0.0	96
Clínica (fezes)	1178	108	0.1	73
	1231	200	0.0	80
Clínica (fluido espinal)	1233	156	0.0	95
	1238 ^T	520	0.0	86
Clínica (provavelmente humano)	1249			
	1250	440	0.0	99
	1251	380	0.0	96
<i>E. nimipressuralis</i>	841	400	0.0	84
<i>E. dissolvens</i>	1289	600	0.0	77

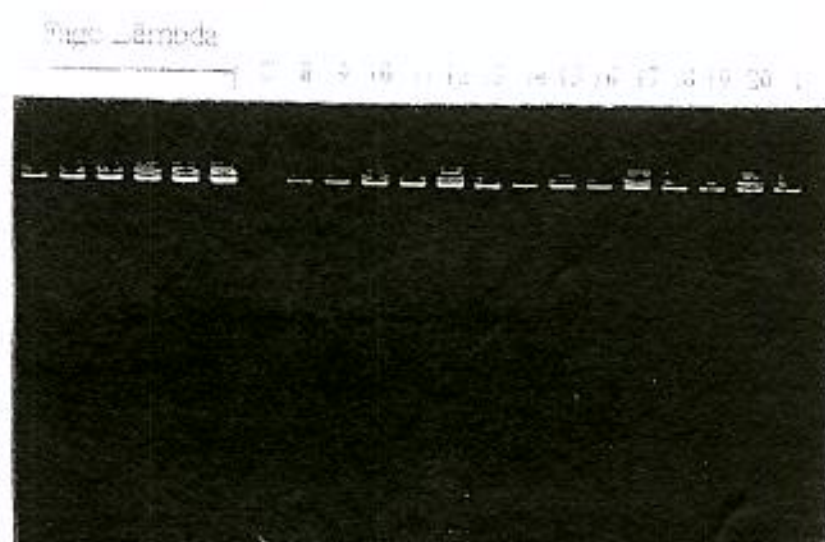


FIGURA 2. Padronização da concentração de DNA de linhagens de *E. cloacae*, canaletas 8 a 21; Fago Lâmbda a 9,2; 13,8; 18,4; 23,0; 32,2 e 46,0 ng/ μ l; C, controle água Milli-Q.

4.3.2 - Seleção de primers e amplificação em PCR.

Dentre os 18 primers UBC testados com as linhagens 1140 e 1249 (FIGURA 3) foram selecionados 4 primers, que apresentaram amplificação característica e reproduzível das bandas, com as seguintes sequências de oligonucleotídeos: # 2, 5'-CCTGGGCTTG-3'; # 4, 5'-CCTGGGCTGG-3'; # 6, 5'-CCTGGGCCTA-3'; # 8, 5'-CCTGGCGGTA-3'.

Estes primers foram utilizados nas amplificações dos DNA em PCR ("Polymerase Chain Reaction").

A técnica de RAPD produz uma mistura de fragmentos de DNA de cada amostra, que são separados por eletroforese, de acordo com seu tamanho, resultando em perfis característicos de bandas para cada linhagem.

Cada linhagem de *E. cloacae* foi amplificada em PCR a duas concentrações (10 e 20 ng), de modo a garantir a reprodutibilidade do método. As FIGURAS 4, 5, 6 e 7 mostram os padrões obtidos em RAPD. De modo geral, as linhagens oriundas de vegetais apresentam um padrão similar, com pequenas variações, dependendo do primer empregado. Exceção feita à linhagem 1291, as demais linhagens podem ser consideradas epidemiologicamente relacionadas, embora de procedência distintas. Outra característica observada é a diversidade entre as linhagens clínicas. Embora as linhagens provenientes do CAISM (FIGURAS 4 a 7) sejam relacionadas genotipicamente, as demais são heterogêneas. Isto pode significar a presença de uma única linhagem no surto epidêmico ocorrido no CAISM em 1995, onde foram verificados inúmeros óbitos em neonatais, possivelmente devido à contaminação de materiais utilizados para a administração de soro aos pacientes, conforme amplamente divulgado pela imprensa na época.

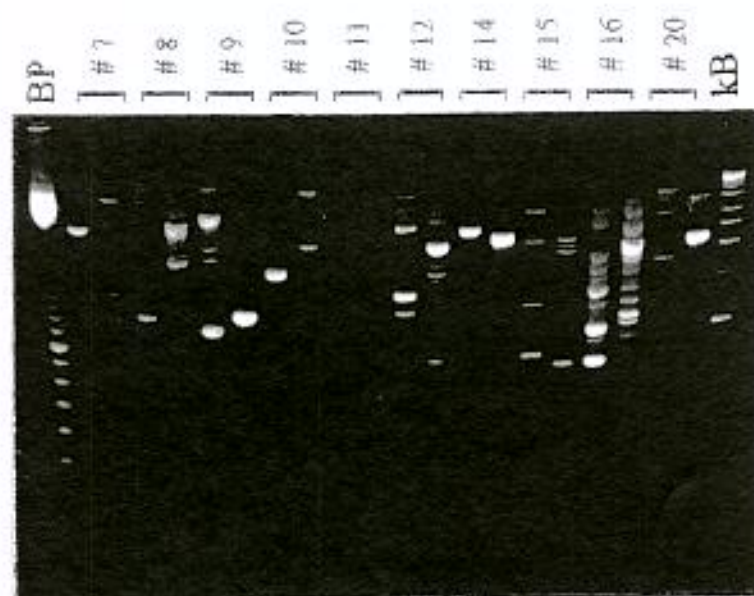


FIGURA 3. "Screening" de primers para *E. cloacae*. Linhagens 1140 (melão) e 1249 (clínica).

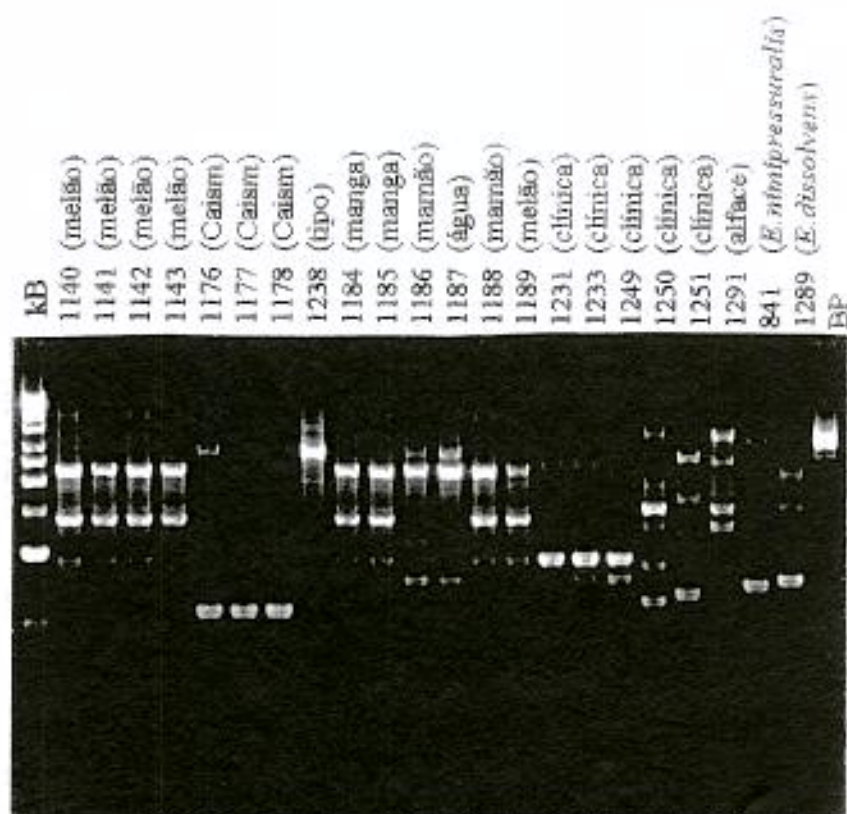


FIGURA 4. Padrão de bandas obtidos por amplificação em RAPD primer UBC # 2, em linhagens de *E. cloacae* isoladas de plantas, casos clínico-hospitalares e água de fonte contaminada.

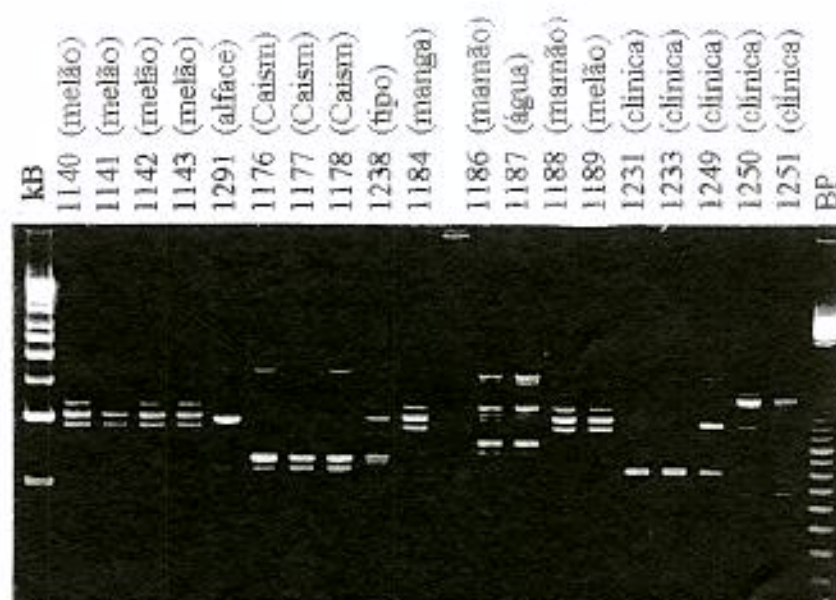


FIGURA 5. Padrão de bandas obtidos por amplificação em RAPD, primer UBC # 4, em linhagens de *E. cloacae* isoladas de plantas, casos clínico-hospitalares e água de fonte contaminada.

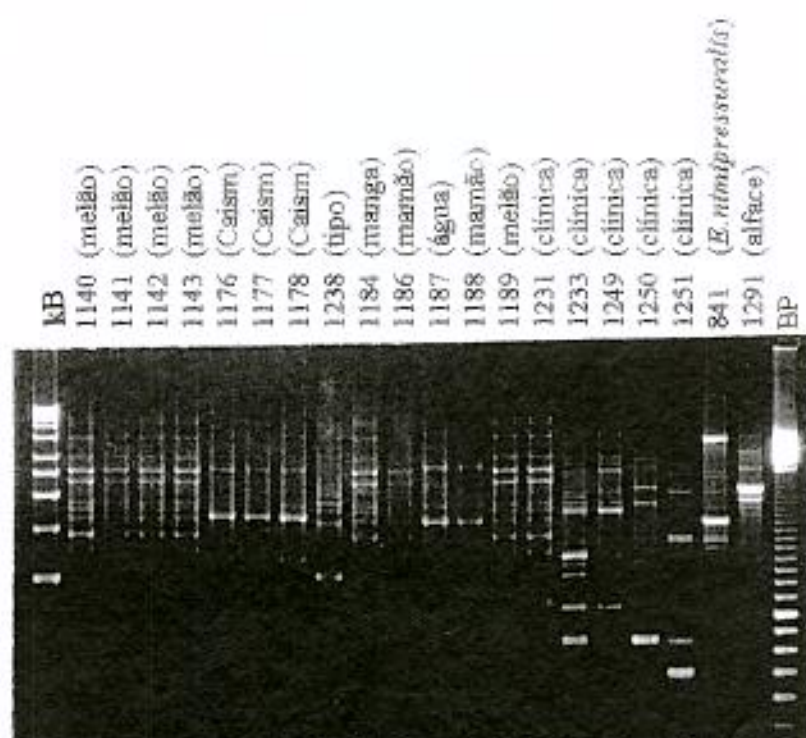


FIGURA 6. Padrão de bandas obtidos por amplificação em RAPD, primer UBC # 6, em linhagens de *E. cloacae* isoladas de plantas, casos clínico-hospitalares e água de fonte contaminada.

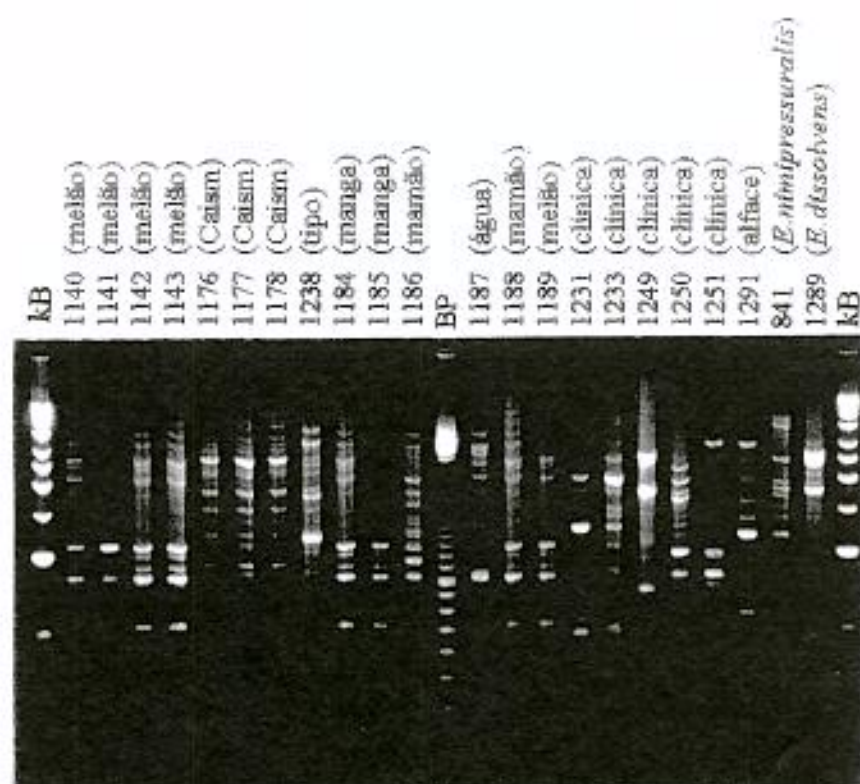


FIGURA 7. Padrão de bandas obtidos por amplificação em RAPD, primer UBC # 8, em linhagens de *E. cloacae* isoladas de plantas, casos clínico-hospitalares e água de fonte contaminada.

Dos quatro primers selecionados, três foram analisados e as bandas transformadas em pb (pares de bases), empregadas para a produção de dendrogramas que avaliaram as distâncias entre as linhagens. Nestes dendrogramas (FIGURAS 8, 9 e 10) é possível discriminar três grupos principais de *E. cloacae*. Pelo menos 8 linhagens isoladas de vegetais são relacionadas (1140, 1141, 1142, 1143, 1184, 1185, 1188 e 1189). A linhagem 1291 (isolada de alface cultivada em estufa) apresenta um padrão diferenciado, aparentemente não se relacionando com nenhuma outra linhagem pesquisada. Entretanto, quando utilizados os primers # 2 e # 8 esta linhagem aparece próxima de *E. nimipressuralis* (841). É possível que a origem desta linhagem esteja relacionada com o substrato empregado no cultivo, uma vez que informações obtidas junto aos produtores revelam que o mesmo é produzido a partir de lixo orgânico (C.F. Robbs, comunicação pessoal).

Variações genômicas são verificadas nas linhagens clínicas, onde aparece uma ampla gama de diversidade, porém, nos três dendrogramas as linhagens 1176, 1177 e 1178 (CAISM) aparecem próximas, demonstrando sua similaridade. Quanto a linhagem 1231 (clínica), aparece próxima de 1185 (manga) num dos subgrupos produzidos pelo primer # 8. Outro aspecto interessante, é a não similaridade da linhagem tipo 1238^T com as demais, o que vem confirmar as observações de LIND & URSING (1991), que encontraram por meio de hibridização DNA-DNA cinco grupos genômicos, em que as linhagens tipo de *E. cloacae* e de *E. dissolvens* aparecem incluídas no mesmo grupo.

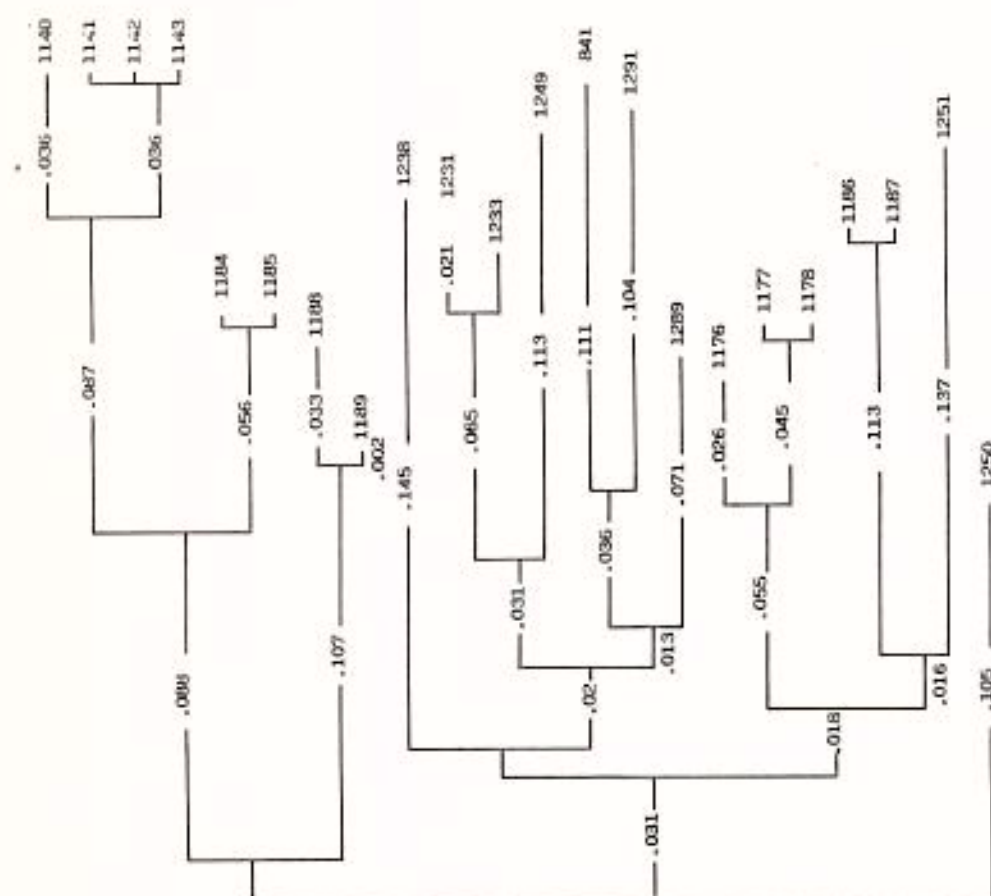


FIGURA 8. Dendrograma das linhagens de *E. cloacae* isoladas de plantas, casos clínico-hospitalares e água de fonte, obtido a partir do método de "Neighbor-Joining". As distâncias foram baseadas nas diferenças dos perfis após amplificação em RAPD com primer UBC # 2, concentração 20 ng/ μ l DNA.

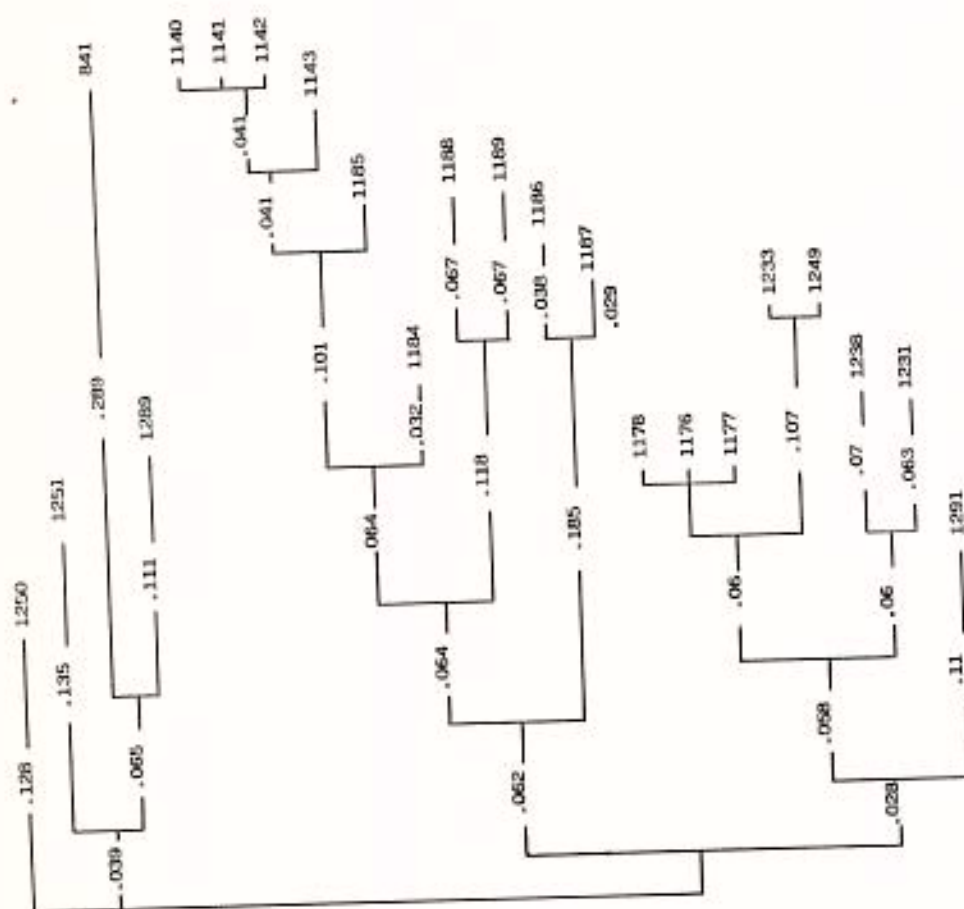


FIGURA 9. Dendrograma das linhagens de *E. cloacae* isoladas de plantas, casos clínico-hospitalares e água de fonte, obtido a partir do método de "Neighbor-Joining". As distâncias foram baseadas nas diferenças dos perfis após amplificação em RAPD com primer UBC # 4, concentração 20 ng/μl DNA.

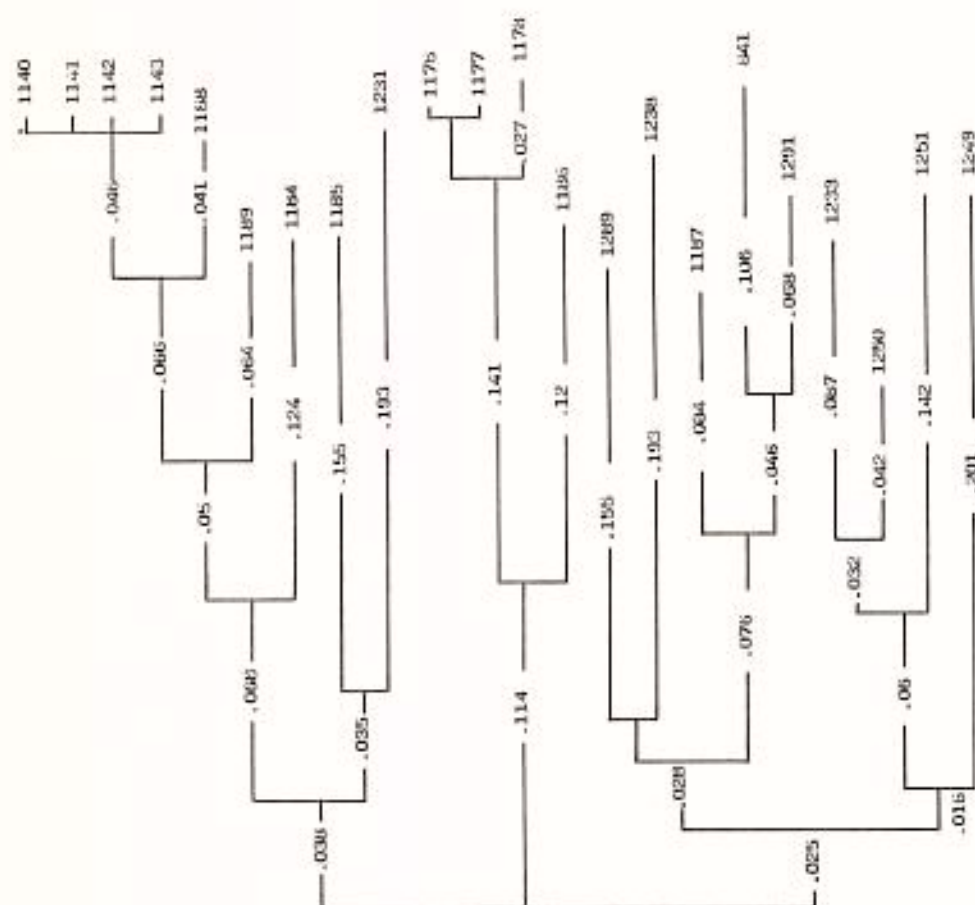


FIGURA 10. Dendrograma das linhagens de *E. cloacae* isoladas de plantas, casos clínico-hospitalares e água de fonte, obtido a partir do método de "Neighbor-Joining". As distâncias foram baseadas nas diferenças dos perfis após amplificação em RAPD com primer UBC # 8, concentração 20 ng/μl DNA.

4.4 Testes de patogenicidade.

As linhagens de *E. cloacae* pertencentes aos diferentes grupos e origem, produziram sintomas em bulbos de cebola, variando desde ligeira descoloração (nível 1 de infecção) até colapso total das escamas internas (nível 4) nas condições testadas (FIGURA 11). Apenas a linhagem 1231 (clínica - Vitória) não induziu a formação de sintomas.

A avaliação dos testes de acordo com a escala proposta, possibilitou a separação das linhagens nos quatro grupos, ou seja, nível 4: linhagens 1140 (melão), 1143 (melão) e 1185 (manga); nível 3: linhagens 1184 (manga), 1187 (água de fonte), 1188 (mamão) e 1250 (clínica - IAL); nível 2: linhagens 1142 (melão), 1176 (clínica - CAISM), 1233 (clínica - Vitória), 1238^T (clínica - Tipo) e 1291 (alface); nível 1: linhagens 1141 (melão), 1177 (clínica - CAISM), 1178 (clínica - CAISM), 1186 (mamão), 1189 (melão), 1249 (clínica - IAL) e 1251 (clínica - IAL). As linhagens 1289 (*E. dissolvens*) e 841 (*E. nimipressuralis*) se comportaram de modo similar, sendo enquadradas no nível 2 de patogenicidade.

Considerando-se apenas as linhagens clínicas, verificamos que a maioria foi capaz de induzir sintomas nos bulbos, inclusive com a linhagem 1250 induzindo sintoma considerado severo (nível 3), e as demais mantendo-se em níveis intermediários.

A exemplo de outras espécies de Enterobactérias relacionadas, como é o caso do complexo *Pantoea agglomerans/herbicola*, que são reconhecidamente patógenos de plantas (GAVINI *et al.*, 1989), é provável que a patogenicidade de *E. cloacae* a vegetais seja devida à sua capacidade em produzir enzimas capazes de alterar a parede celular nos hospedeiros, ou ainda, pela produção de toxinas, que são fatores de virulência comuns às espécies de *Erwinia*.

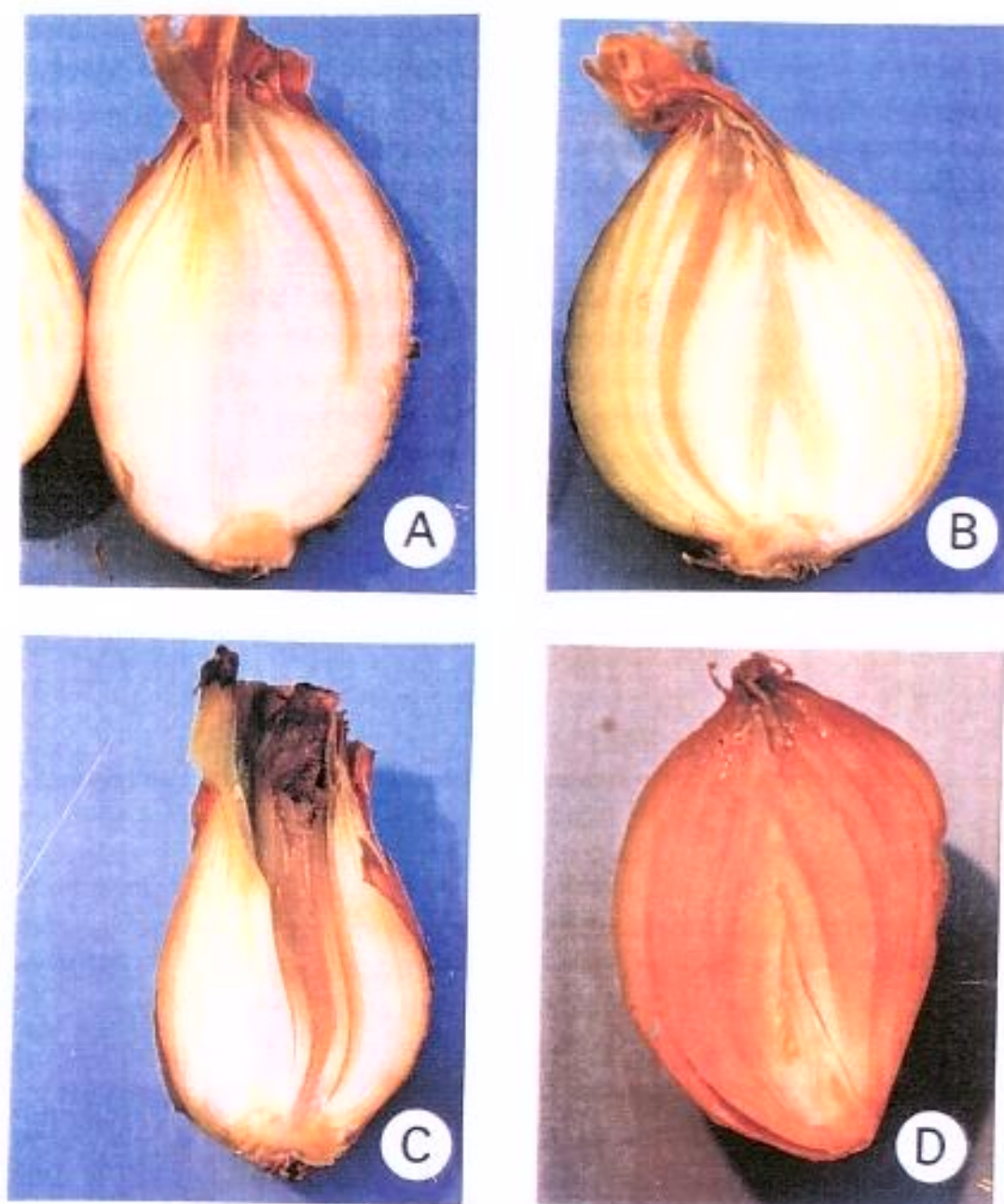


FIGURA 11. Patogenicidade de *E. cloacae* em bulbos de cebola.

- A: nível 1 de infecção - linhagem 1251 (clínica);
B: nível 2 de infecção - linhagem 1184 (manga);
C: nível 3 de infecção - linhagem 1250 (clínica);
D: nível 4 de infecção - linhagem 1140 (melão).

Entretanto, a capacidade fitopatogênica de *E. cloacae* aparentemente é instensificada sob condições de altas temperatura e umidade do ar.

LIVRELLI *et al.* (1996) estudando as propriedades de adesão à células epiteliais em isolados clínicos de *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia*, revelaram que em 14% dos isolados de *E. cloacae* (2 em 14) ocorreu a produção de fimbriae do tipo 3, que também é expresso por vários membros da família *Enterobacteriaceae* e relacionado com a colonização do hospedeiro. Resta saber entretanto, as propriedades de adesão das linhagens isoladas de vegetais utilizadas neste estudo, uma vez que a ligação de bactérias em materiais inertes, por exemplo em catéter, pode representar um importante fator em infecções hospitalares. RATTRAY *et al.* (1995) por meio da bioluminescência conseguiram caracterizar a colonização da ecto e endorizosfera de trigo por *E. cloacae*, entretanto sem correlacionar com as propriedades de adesão, que também poderiam estar relacionadas com a produção de polissacarídeos extracelulares, indispensáveis na adsorção das superfícies.

Os surtos epidêmicos de *E. cloacae* em hospitais não são muito frequentes quando comparados com outras espécies bacterianas, entretanto, sabe-se que as principais vias de contaminação hospitalar incluem a transmissão paciente-paciente e a falta de higiene entre o pessoal. Por outro lado, a hipótese da introdução de *E. cloacae* via alimentos ou insetos não deve ser descartada. A contaminação de alimentos por *E. cloacae* já foi observada há algum tempo (BARTOLONI *et al.*, 1989) e, de acordo com ROBBS (1997) *E. cloacae* além de outras espécies clínicas, tem sido comumente isolada de hortifrutícolas. ARMSTRONG *et al.* (1989) verificaram também a persistência de *E. cloacae* no intestino de *Peridroma saucia* Hubn. em pelo menos três dias, tempo suficiente para a contaminação de ambientes onde se armazenam alimentos. Estes fatores podem dar suporte às conclusões de KUHN *et al.* (1991), onde a alta ocorrência

de *E. cloacae* em ambiente hospitalar é devida à introdução contínua daquele microrganismo no local.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos experimentos efetuados no presente estudo, permitiram concluir o seguinte:

(1) Todas as linhagens de *E. cloacae* isoladas de plantas, casos clínicos-hospitalares e água de fonte contaminada induziram sintomas de colapso interno das escamas dos bulbos de cebola. Houve apenas uma única exceção - *E. cloacae* IBSBF 1231 (clínico-fezes). Estes resultados podem permitir o desenvolvimento de pesquisas que possibilitem a utilização de plantas teste no estudo comparativo de isolados bacterianos provenientes de casos clínico-hospitalares. Além disso, os resultados chamam nossa atenção para a provável introdução daquela espécie bacteriana em ambientes hospitalares através de hortifrutícolas;

(2) A eletroforese de proteínas totais (PT) permitiu visualizar uma grande diversidade entre os isolados, porém, os testes serológicos de dupla difusão em ágar utilizando como antígeno o complexo proteico da membrana (CMP) distinguiu claramente o grupo de isolados de *E. cloacae* provenientes de vegetais e de casos clínico-hospitalares;

(3) A técnica de biologia molecular denominada RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") com a utilização de diferentes primers foi considerada a mais sensível, pois permitiu discriminar as linhagens de *E. cloacae* de acordo com a origem, muito importante sob o ponto de vista

cloacae de acordo com a origem, muito importante sob o ponto de vista epidemiológico. Por meio desta técnica, os perfis obtidos para a linhagem 1291 (alface) colocaram-na próxima das linhagens clínico-hospitalares;

(4) A linhagem tipo de *E. cloacae* (1238^T) embora tenha induzido sintomas em bulbos de cebola, não foi relacionada com as demais, independente da técnica utilizada;

(5) A espécie *E. dissolvens* mostrou similaridade com linhagens de *E. cloacae*. Assim, a hipótese de sinonímia entre estas espécies deve ser considerada;

(6) Finalmente, a partir do presente trabalho foi possível evidenciar a heterogeneidade de *E. cloacae*, apesar de ter sido avaliado um número reduzido de linhagens. A espécie *E. nimipressuralis* que é considerada por alguns autores como sendo relacionada a *E. cloacae*, exibiu nos testes comparativos características que permitem diferenciá-las.

6. BIBLIOGRAFIA

- ANDERSEN, B.M.; D. SORLIE; R. HOTVEDT. Multiply beta-lactam resistant *Enterobacter cloacae* infections linked to the environmental flora in a unit of cardiothoracic and vascular surgery. **Scand. J. Infect. Dis.**, **21** : 181-191, 1989.
- ANDRESEN, J.; B.I. ASMAR; A.S. DAJANI. Increasing *Enterobacter* bacteremia in pediatric patients. **Pediatr. Infect. Dis.**, **3** : 787-792, 1994.
- ARMSTRONG, J.L.; L. A. PORTEOUS; N. D. WOOD. The cutworm *Peridroma saucia* (Lepidoptera: Noctuidae) supports growth and transport of pBR322-bearing bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, **55** : 2200-2205, 1989.
- BALDANI, J.I.; B. POT; G. KIRCHHOF; E. FALSEN; V.L.D. BALDANI; F.L. OLIVARES; B. HOSTE; K. KERSTERS; A. HARTMANN; M. GILLIS; J. DÖBEREINER. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **40** : 802-810, 1996.
- BARTOLONI, A.; D. AQUILINI; F. PARADISI. *Enterobacteriaceae* recovered from vegetables in Florence. **Igiene-Moderna**, **91** : 164-168, 1989.

- BISHOP, A.L.; R. M. DAVIS. Internal decay of onions caused by *Enterobacter cloacae*. **Pl. Dis.**, **74** : 692-694, 1990.
- BLUM, H.; H. BEIER; H.J.L. GRÖSS. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, **8** : 93-99, 1987.
- BOUZAR, H.; J. B. JONES; R.E. STALL, N.C. HODGE; G.V. MINSAVAGE; A.A. BENEDICT; A.M. ALVAREZ. Physiological, chemical, serological, and pathogenic analyses of a worldwide collection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains. **Phytopathology**, **84** : 663-671, 1994.
- BRADBURY, J.F. Guide to plant pathogenic bacteria. CAB Int. Micol. Institute, Ferry Lane, Surrey, U.K., pp.332, 1986.
- BRENNER, D.J.; A.C. McWHORTER; A. KAI; A.G. STEIGERWALT; J.J. FARMER III. *Enterobacter asburiae* sp. nov., a new species found in clinical specimens, and reassignment of *Erwinia dissolvens* and *Erwinia nimipressuralis* to the genus *Enterobacter* as *Enterobacter dissolvens* comb. nov. and *Enterobacter nimipressuralis* comb. nov. **J. Clin. Microbiol.**, **23** : 1114-1120, 1986.
- COTHER, E.J.; V. DOWLING. Bacteria associated with internal breakdown of onion bulbs and their possible role in disease expression. **Plant Pathol.**, **35** : 329-336, 1986.
- FLYNN, D. M.; R. A. WEINTEIN; C. NATHAN; M. A. GASTON; S. A. KABINS. Patients' endogenous flora as the source of "nosocomial" *Enterobacter* in cardiac surgery. **J. Infect. Dis.**, **156** : 363-368, 1987.

FRENEY, J.; L.D. GRUER; N. BORNSTEIN; M KIREDJIAN; I. GUILVOUT; M.N. LETOUZEY; C. COMBE; J. FLEURETTE. Septicemia caused by *Agrobacterium* sp. **J. Clin. Microbiol.**, **22** : 683-685, 1985.

GARAIJAR, J.; M.E. KAUFMANN; T.L. PITT. Comparison of ribotyping with conventional methods for the type identification of *Enterobacter cloacae*. **J. Clin. Microbiol.**, **29** : 1303-1307, 1991.

GASTON, M.A. Isolation and selection of a bacteriophage typing set for *Enterobacter cloacae*. **J. Med. Microbiol.**, **24** : 285-290, 1987.

GASTON, M.A.; C. BUCHER; T.L.PITT. O serotyping scheme for *Enterobacter cloacae*. **J. Clin. Microbiol.**, **18** : 1079-1083, 1983.

GASTON, M.A.; M. WARNER. Electrophoretic typing of *Enterobacter cloacae* with a limited set of enzyme stains. **Epidem. Inf.**, **103** : 255-264, 1989.

GAVINI, F.; J. MERGAERT; A. BEJI; C. MIELCAREK; D. IZARD. K. KERSTERS; J. DE LEY. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **30** : 337-345, 1989.

GEORGE, M.; V.P.POTTY; N.P. JAYASANKAR. Association of *Enterobacter* with coconut root (wilt) disease. **Curr. Science**, **45** : 677-678, 1976.

GRATTARD, F.; B. POZZETTO; P. BERTHELOT; I. RAYET; A. ROS; B. LAURAS; O. G. GAUDIN. Arbitrarily primed PCR, ribotyping, and plasmid pattern analysis applied to investigation of a nosocomial outbreak

- due to *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit. **J. Clin. Microbiol.**, **32** : 596-602, 1994.
- HADAR, Y.; G.E. HARMAN; A.G. TAYLOR; J.M. NORTON. Effects of pregermination of pea and cucumber seeds and of seed treatment with *Enterobacter cloacae* on rots caused by *Pythium* spp. **Phytopathology**, **73** : 1322-1325, 1983.
- HAERTL, R.; G. BANDLOW. Epidemiological fingerprint of *Enterobacter cloacae* by Small-Fragment Restriction Endonuclease Analysis and Pulsed-Field Gel Electrophoresis of genomic restriction fragments. **J. Clin. Microbiol.**, **31** : 128-133, 1993.
- HARTSTEIN, A.I.; P. CHETCHOTISAKD; C.L. PHELPS; A.M. LeMONTE. Typing of sequential bacterial isolates by pulsed-field gel electrophoresis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, **22** : 390-3214, 1995.
- HOWELL, C. R.; R.C . BEIER; R. D. STIPANOVIC. Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping-off by the bacterium. **Phytopathology**, **78** : 1075-1078, 1988.
- JOHNSON, M. P.; R. RAMPHAL. Beta-lactam- resistant *Enterobacter* bacteremia in febrile neutropenic patients receiving monotherapy. **J. Infect. Dis.**, **162** : 981-983, 1990.
- KÜHN, I.; K. TULLUS; L.G. BURMAN. The use of the PhP-KE biochemical fingerprint system in epidemiological studies of faecal *Enterobacter cloacae* strains from infants in Swedish neonatal wards. **Epidemiol. Infect.**, **107**: 311-319, 1991.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227** : 680-685, 1970.
- LAMBERT-ZECHOVSKY, N.; E. BINGEN; E. DENAMUR; N. BRAHIMI; P. BRUN; H. MATHIEU; J. ELION. Molecular analysis provides evidence for the endogenous origin of bacteremia and meningitis due to *Enterobacter cloacae* in an infant. **Clin. Infect. Dis.**, **15** : 30-32, 1992.
- LEBEDA, A.; V. KÜDELA; Z. JEDLICKOVÁ. Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* for plants and animals. **Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.**, **19** : 271-284, 1984.
- LIND, E.; J. URSING. Clinical strains of *Enterobacter agglomerans* (synonyms: *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae*) identified by DNA-DNA hybridization. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand., Sect.B**, **94** : 209-213, 1991.
- LINDH, E.; K. DORNBUSCH; K. JALAKAS; A. FORSGREN. Antibiotic susceptibility and β -lactamase production in clinical isolates of *Enterobacter* spp. **APMIS**, **98** : 462-470, 1990.
- LIVRELLI, V.; C. DE CHAMPS; P. DI MARTINO; A. DARFEUILLE-MICHAUD; C. FORESTIER; B. JOLY. Adhesive properties and antibiotic resistance of *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Serratia* clinical isolates involved in nosocomial infections. **J. Clin. Microbiol.**, **34** : 1963-1969, 1996.

- LORITO, M.; A. di PIETRO; C.K. HAYES; S.L. WOO; G.E. HARMAN; A. di PIETRO. Antifungal synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. **Phytopathology**, **83** : 721-728, 1993.
- LYNCH, J. M.; R. D. LUMSDEN; P. T. ATKEY; M. A. OUSLEY. Propects for control of *Pythium* damping-off of lettuce with *Trichoderma*, *Gliocladium*, and *Enterobacter* spp. **Biol. Fert. Soils**, **12** : 95-99, 1991.
- McCONKEY, S.J.; D.C. COLEMAN; F.R. FALKINER; J.R. McCANN; P.A. DALY. *Enterobacter cloacae* in a haematology/ oncology ward - first impressions. **J. Hosp. Infect.**, **14** : 277-284, 1989.
- MERGAERT, J.; F. GAVINI; K. KERSTERS; H. LECLERC; J. DE LEY. Phenotypic and protein similarities between strains of *Enterobacter agglomerans*, *Erwinia herbicola*, and *Erwinia milletiae* from clinical or plant origin. **Curr. Microbiol.**, **8** : 327-331, 1983.
- MODI, N.; V. DAMJANIVC; R.W.I. COOKE. Outbreak of cephalosporin resistant *Enterobacter cloacae* infection in a neonatal intensive care unit. **Arch. Dis. Child.**, **62** : 148-151, 1987.
- MURRAY, M. P. R.; G.G. GRANICH; D.J. KROGSTAD; A.C. NILES. *In vivo* selection of resistance to multiple cephalosporins by *Enterobacter cloacae*. **J. Infect. Dis.**, **147** : 590, 1983.
- NELSON, E.B.; W.L. CHAO; J.M. NORTON; G.T. NASH; G.E. HARMAN. Attachment of *Enterobacter cloacae* to hyphae of *Pythium ultimum*: possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping off. **Phytopathology**, **76** : 327-335, 1986.

- NELSON, E.B.; C.M. CRAFT. Introduction and establishment of strains of *Enterobacter cloacae* in golf course turf for the biological control of dollar spot. **Pl. Dis.**, **75** : 510-514, 1991.
- NELSON, E.B.; A.P. MALONEY. Molecular approaches for understanding biological control mechanisms of the interaction of *Enterobacter cloacae* with *Pythium ultimum*. **Can. J. Pl. Pathol.**, **14** : 106-114, 1992.
- NISHIJIMA, K.A.; H. M. COUEY; A.M. ALVAREZ. Internal yellowing, a bacterial disease of papaya fruits caused by *Enterobacter cloacae*. **Pl. Dis.**, **71** : 1029- 1034, 1987.
- OLIVEIRA, A.R. Considerações sobre anti-soros obtidos pela técnica de injeção de antígeno no linfonódulo. **Summa Phytopathol.**, **1** : 61-64, 1975.
- PIAZZI, S.E. A simple method for preliminary immunodiffusion tests of antigen-antibody systems having unknow ratios of reaction. **Ann. Biochem.**, **227** : 281-284, 1959.
- PITCHER, D.G.; SANDERS, N.A.; R.J. OWEN. Rapid extraction of bacteial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters Appl. Microbiol.**, **8** : 151-156, 1989.
- POILANE, I.; P. CRUAUD; E. LACHASSINNE; F. GRIMONT; P.A.D GRIMONT; M. COLLIN; J. GAUDELUS; J.C. TORLOTIN; R. COLLIGNON. *Enterobacter cloacae* cross-colonization in neonates demonstrated by ribotyping. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **12** : 820-826, 1993.

- RATTRAY, E.A.; J.I. PROSSER; L.A. GLOVER; K.KILLHAM.
Characterization of rhizosphere colonization by luminescent *Enterobacter cloacae* at the population and single-cell levels. **Appl. Environ. Microbiol.**, **61**: 2950-2957, 1995.
- RICHARD, C. Genus VI: *Enterobacter*. *IN*: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol I. The Williams & Wilkins Co., Baltimore 1984, p. 465-471, 1984.
- ROBBS, C.F. Bactérias de importância em clínica hospitalar patogênicas a hortifrutícolas pós-colheita. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 20, 1997, São Paulo. Palestra. **Summa Phytopathol.**, **23** : 95, 1997.
- ROBBS, C.F.; J. RODRIGUES NETO; O.F. SILVA; L.O.S. BERIAM.
Deterioração de polpa em frutos de melão causada por *Enterobacter cloacae*. **Fitopatol. Bras.**, **20** : 281, 1995.
- SANDERS, C.C.; W.E. SANDERS Jr. Microbial resistance to newer generation β -lactam antibiotics: clinical and laboratory implications. **J. Infect. Dis.**, **151** : 399-406, 1985.
- STEIGERWALT, A.G.; G.R. FANNIGN; M.A. ASBURY; D.J. BRENNER.
DNA relatedness among species of *Enterobacter* and *Serratia*. **Can. J. Microbiol.**, **22** : 121-137, 1976.
- TANII, A.; T. BABA; T. HARUKI. Bacteria isolated from black rot of rice grains. **Ann. Phytopath. Soc. Japan**, **40** : 309-318, 1974.

- TAVEECHAI, N.; N.W. SCHAAD. Immunochemical characterization of a subspecific antigenic determinant of a membrane protein extract of *Xanthomonas campestris* pv. *cassavae* and *X. campestris* pv. *manihotis*. **Phytopathology**, **75** : 581-587, 1986.
- WICK, R.L.; K.K. RANE; D.K. SUTTON. Mung bean sprout disease caused by *Enterobacter cloacae*. **Phytopathology**, **77** : 123 (Abstr.), 1987.
- WILSON, C.L.; J.D. FRANKLIN; P.L. PUSEY. Biological control of *Rhizopus* rot of peach with *Enterobacter cloacae*. **Phytopathology**, **77** : 303-305, 1987.
- WISNIEWSKI, M.; C. WILSON; W. HERSHBERGER. Characterization of inhibition of *Rhizopus stolonifer* germination and growth by *Enterobacter cloacae*. **Can. J. Botany**, **67** : 2317-2323, 1989.

7. APÊNDICES

Apêndice 1. Extração de proteínas de membrana, de acordo com TAVEECHAI SCHAAD (1986).

- 1) cultivar as bactérias em placas contendo meio NA (10 placas / linhagem) a 28° C, durante 24 h;
- 2) raspar a superfície das placas com espátula e ressuspender as células em 25 ml de solução salina (0,85%), centrifugando a seguir a 10,000 x g / 15 min (4° C);
- 3) descartar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 100 ml de solução de Cloreto de Lítio 0,2 M, aquecendo a 45° C por 2 horas, centrifugando a seguir a 12,000 x g / 15 min (4° C);
- 4) recolher o sobrenadante e centrifugar a 30,000 x g / 40 min (4° C);
- 5) centrifugar o sobrenadante 2 vezes a 100,000 x g / 2 h (4 ° C);
- 6) descartar o sobrenadante e ressuspender o precipitado (CPM) em Na₃N a 0,02% e armazenar a 4° C.

Apêndice 2. Eletroforese de proteínas totais. Materiais utilizados.

1.1 - Gel de Resolução:

Acrilamida + bisacrilamida (30:8)	5,0 ml
Tris-HCl 1,0 M, pH 8.8	5,9 ml
SDS 10 %	0,15 ml
Água destilada	3,6 ml
Persulfato de amônio 30 %	0,75 ml *
Temed	0,0020 ml

* adicionar Persulfato de amônio por último.

1.2 - Gel de Empacotamento:

Acrilamida + bisacrilamida (30:8)	0.9 ml
Tris-HCl 1,0 M, pH 6.8	0.9 ml
SDS 10 %	0.07 ml
Água destilada	4.8 ml
Persulfato de amônio 30 %	0.35 ml
Temed	0.015 ml

Obs: desaerar a mistura antes de adicionar o Temed e Persulfato de amônio.

1.3 - Líquido revelador:

Carbonato de sódio	6,0 g
Tiosulfato de sódio	4,0 mg
Formaldeído	50,0 µl

Apêndice 3. Coloração dos geis de proteínas por prata, segundo BLUM *et al.* (1987)

- 1) colocar o gel em solução fixadora (etanol 50% + ácido acético 12% + 75 µl de formaldeído) durante 1 h;
- 2)
- 3) lavar 3 vezes em etanol 50 %, sendo 20 minutos para cada lavagem;
- 4) tratar com solução de tiosulfato de sódio a 0.02 % (20 mg/100 ml H₂O), sob agitação constante, durante 1 min;
- 5) lavar 3 vezes com água destilada, sendo 20 seg para cada lavagem;
- 6) tratar com solução de nitrato de prata a 0.2 %, contendo 75 µl de formaldeído, sob agitação constante, durante 20 min;
- 7) lavar como descrito em (4);
- 8) colocar o gel na solução reveladora [Apêndice 1], até visualizar as bandas;

Apêndice 4. Protocolo para extração do DNA genômico, de acordo com metodologia de PITCHER *et al.* (1989).

- 1) recolher cerca de 50 mg de células (uma alça) da superfície de placas com NA contendo o cultivo bacteriano;
- 2) ressuspender as células em tubos Eppendorf contendo 100 µl de solução TE pH 8,0 [Apêndice 3], contendo 2 mg/ml de lisozima dissolvida, e incubar a 37° C / 30 min;
- 3) adicionar 500 µl de solução de Tiocianato de guanidina 5 M [Apêndice3] para promover a lise, e agitar em Vortex brevemente e incubar à temperatura ambiente por 5-10 min;
- 4) esfriar as células lisadas no gelo e adicionar 250 µl de Acetato de amônio 7,5 M [Apêndice 3] misturar invertendo os tubos várias vezes e esfriar no gelo por 10 min;
- 5) adicionar 500 µl de Clorofórmio-álcool isoamílico (24 : 1, v/v), agitar manualmente e centrifugar a 14,000 x g / 10 min;
- 6) transferir a fase aquosa para um novo tubo e adicionar 0,54 vol. (aproximadamente 430 µl) de isopropanol gelado para precipitar o DNA. Inverter os tubos várias vezes para misturar as soluções até visualizar um precipitado fibroso branco, e centrifugar a 6,500 x g / 20 seg;
- 7) lavar cinco vezes os "pellets" de DNA com 500 µl de etanol 70 % (v/v) por tubo e secar a vácuo para evaporar o álcool;
- 8) dissolver o "pellet" em 200 µl de TE pH 8,0 e adicionar 10 µl de RNase e incubar durante 1 h a 37° C;

- 9) adicionar 240 μ l de Fenol-cloroformio-álcool isoamílico, após a adição de 40 μ l de Cloreto de Lítio 4 M, para remover as proteínas. Misturar as fases manualmente;
- 10) centrifugar a 14,000 x g / 10 min e transferir a fase aquosa para novo tubo. Precipitar o DNA com 400 μ l de etanol absoluto gelado, misturar as fases manualmente e centrifugar a 6,500 x g / 20 seg;
- 11) lavar os "pellets" 2 vezes com etanol 70 % e secar a vácuo. Ressuspender o DNA em 20 a 50 μ l de água Milli-Q e estocar a 4° C.

Apêndice 5. Soluções empregadas nas extrações e padronizações da concentração dos DNA.**a) Tiocianato de guanidina 5M**

Tiocianato de guanidina	60 g
Água Milli-Q estéril	20 ml
EDTA 0,5M -pH 8,0	20 ml

- dissolver a guanidina com agitação constante a 65° C, esfriar a solução à temperatura ambiente e adicionar

N-lauril sarcosina 10 % (estéril)

- completar o volume para 100 ml com água Milli-Q e filtrar a solução em membrana 0,45 µl e estocar a solução em frasco escuro, à temperatura ambiente.

b) Acetato de amônio 7,5M

Acetato de amônio	57,81 g
Água Milli-Q	q.s.p. 100 ml

- filtrar e estocar a 4° C.

c) TE pH 8,0

EDTA 0,5M - pH 8,0	2 ml
Tris 1M - pH 8,0	10 ml
Água Milli-Q	q.s.p. 1000 ml

d) Tampão TEB 5X (Tris-EDTA-Borato)

Trizma Base	54 g
Ácido bórico	27,5 g
EDTA 0,5M - pH 8,0	20 ml
Água destilada	q.s.p. 1000 ml

e) Tampão de Amostra (Sol. de Azul de bromofenol)

Glicerol	50 %
Azul de bromofenol	0,25 %

Apêndice 6. Protocolo prático para padronização da concentração de DNA.

- 1) preparar gel de agarose a 0,7%, com cerca de 4 mm de espessura em tampão TEB 1 X [Apêndice 2], acrescentar brometo de etídio (2 μ l de solução estoque 10 mg/ml para 100 ml de gel) e deixar polimerizar por 20 min;
- 2) diluir DNA do Fago Lâmbda (460 ng/ μ l) 1:10 e aplicar 1, 2, 4, 7 e 11 μ l da diluição (o que corresponde a 46, 92, 184, 322 e 506 ng DNA, respectivamente), adicionando-se 2 μ l de tampão de amostra [Apêndice 2] nas cinco primeiras canaletas do gel;
- 3) aplicar 2 μ l de cada amostra de DNA extraído das linhagens, também adicionados de 2 μ l de tampão de amostra;
- 4) correr a eletroforese em tampão TEB 1 X, a 50 V nos primeiros 15 min, e, posteriormente, a 80 V;
- 5) estimar a concentração das amostras de DNA em transiluminador, por meio de comparação da intensidade das bandas com as de concentração conhecida, do Fago Lâmbda;
- 6) diluir adequadamente as amostras em tampão TE e repetir o procedimento acima, aplicando 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 10 μ l do Fago Lâmbda diluído 1:100 (correspondente a 4,6; 9,2; 13,8; 18,4; 23,0; 32,2 e 46,0 ng, respectivamente), como padrão de comparação;
- 7) se necessário, realizar novas diluições até padronizar a concentração das amostras.

Apêndice 7 . Preparo da Master Mix para reações de PCR:

Valores calculados para 12 reações de PCR (3 linhagens, [duas concentrações] x 2 primers).

Componentes da reação	Concentração da solução estoque	Concentração na solução de reação	Volume a ser utilizado (μl)
Tampão da enzima	10X	1X	35
Primer	25 μM	1 μM	14
dNTP	25 mM	0,2 mM	2,8
Enzima (<i>Taq</i> RS)	5 U/μl	2 U/μl	5,6
DNA		10 ou 20 ng	14
MgCl ₂	50 mM	2 mM	14
Água Milli-Q (q.s.p. *)			264,6

* água deve ser calculado para completar o volume total da reação. No caso, foram realizadas 12 reações + 2 controles com água, perfazendo 14 reações x 25 μl, portanto, volume total de 350 μl.

Obs:- A *Taq* RS deve ser adicionada à Master Mix pouco antes desta ser distribuída nas reações de amplificação.

Apêndice 8. Protocolo para “screening” dos primers.

- 1) preparar a reação (Master Mix) [Apêndice 5], mantendo-a no gelo;
- 2) separar as amostras de DNA e o primer UBC # em tubos de PCR;
- 3) distribuir 1 μ l da solução de DNA (10 e 20 ng) de cada amostra em 12 tubos de PCR (2 primers com duplicata);
- 4) adicionar 1 μ l de cada um dos 2 primers nos 12 tubos de PCR contendo DNA de cada linhagem de *E. cloacae*, de acordo com o resultado obtido no cálculo da reação (Master Mix);
- 5) adicionar 23 μ l da Master Mix para cada reação de amplificação, perfazendo o volume total de 25 μ l/ tubo;
- 6) misturar suavemente utilizando a ponta dos dedos e colocar os tubos de PCR no ciclizador térmico, ajustando o volume (25 μ l) e o programa desejado (Programa # 110);
- 7) após a amplificação, manter os produtos de PCR a 4° C até que sejam submetidos à eletroforese.

Apêndice 9. Transformação da migração relativa das bandas em pares de bases. Primer # 2, 10 ng

BANDA	MIGRAÇÃO	MIGRAÇÃO	TAMANHO	TAMANHO (pb)	ERRO	ERRO
Nº	(mm)	RELATIVA	(pb)	CALCULADO	RESIDUAL	%
1.	7.00	1.00	6000	6000	+0	0.01
2.	8.00	3.63	5000	4998	-2	0.03
3.	9.00	6.26	4000	4254	+254	6.35
4.	11.00	11.53	3000	3210	+210	6.99
5.	13.00	16.79	2500	2508	+8	0.32
6.	15.00	22.05	2000	2003	+3	0.14
7.	19.00	32.58	1500	1322	-178	11.88
8.	20.00	35.21	1200	1195	-5	0.39
9.	21.00	37.84	1100	1081	-19	1.72
10.	22.00	40.47	1000	978	-22	2.25
11.	23.00	43.11	900	883	-17	1.88
12.	24.00	45.74	800	797	-3	0.41
13.	25.00	48.37	700	717	+17	2.48
14.	26.00	51.00	600	644	+44	7.36
15.	28.00	56.26	500	514	+14	2.73
16.	30.00	61.53	400	401	+1	0.19
17.	32.00	66.79	300	302	+2	0.69
18.	34.00	72.05	200	215	+15	7.54
19.	38.00	82.58	100	69	-31	31.29

Apêndice 10. Transformação da migração relativa das bandas em pares de bases. Primer # 2, 20 ng

BANDA	MIGRAÇÃO	MIGRAÇÃO	TAMANHO	TAMANHO (pb)	ERRO	ERRO
Nº	(mm)	RELATIVA	(pb)	CALCULADO	RESIDUAL	%
1.	7.00	1.00	6000	6052	+52	0.87
2.	8.00	3.63	5000	4739	-261	5.22
3.	9.00	6.26	4000	4022	+22	0.54
4.	11.00	11.53	3000	3127	+127	4.23
5.	13.00	16.79	2500	2543	+43	1.73
6.	15.00	22.05	2000	2113	+113	5.65
7.	19.00	32.58	1500	1497	-3	0.18
8.	22.00	40.47	1200	1160	-40	3.34
9.	24.00	45.74	1100	972	-128	11.60
10.	25.00	48.37	1000	887	-113	11.26
11.	26.00	51.00	900	807	-93	10.29
12.	27.00	53.63	800	732	-68	8.51
13.	28.00	56.26	700	661	-39	5.64
14.	29.00	58.89	600	593	-7	1.20
15.	30.00	61.53	500	528	+28	5.69
16.	31.00	64.16	400	467	+67	16.80
17.	32.00	66.79	300	409	+109	36.27
18.	34.00	72.05	200	300	+100	49.82
19.	38.00	82.58	100	107	+7	6.98

Apêndice 11. Transformação da migração relativa das bandas em pares de bases. Primer # 4, 10 ng

BANDA	MIGRAÇÃO	MIGRAÇÃO	TAMANHO	TAMANHO (pb)	ERRO	ERRO
Nº	(mm)	RELATIVA	(pb)	CALCULADO	RESIDUAL	%
1.	7.00	1.00	6000	5999	-1	0.01
2.	8.00	3.50	5000	4778	-222	4.43
3.	9.00	6.00	4000	4001	+1	0.03
4.	11.00	11.00	3000	3002	+2	0.06
5.	13.00	16.00	2500	2364	-136	5.46
6.	14.00	18.50	2000	2120	+120	6.02
7.	19.00	31.00	1500	1305	-195	12.99
8.	20.00	33.50	1200	1192	-8	0.68
9.	21.00	36.00	1100	1089	-11	0.98
10.	22.00	38.50	1000	996	-4	0.41
11.	23.00	41.00	900	910	+10	1.16
12.	25.00	46.00	800	760	-40	5.06
13.	26.00	48.50	700	693	-7	1.07
14.	27.00	51.00	600	630	+30	5.04
15.	28.00	53.50	500	572	+72	14.45
16.	31.00	61.00	400	420	+20	4.92
17.	34.00	68.50	300	293	-7	2.43
18.	37.00	76.00	200	185	-15	7.40
19.	40.00	83.50	100	93	-7	7.18

Apêndice 12. Transformação da migração relativa das bandas em pares de bases. Primer # 4, 20 ng

BANDA	MIGRAÇÃO	MIGRAÇÃO	TAMANHO	TAMANHO (pb)	ERRO	ERRC
Nº	(mm)	RELATIVA	(pb)	CALCULADO	RESIDUAL	%
1.	7.00	1.00	6000	5999	-1	0.01
2.	8.00	3.50	5000	4778	-222	4.43
3.	9.00	6.00	4000	4001	+1	0.03
4.	11.00	11.00	3000	3002	+2	0.06
5.	13.00	16.00	2500	2364	-136	5.46
6.	14.00	18.50	2000	2120	+120	6.02
7.	19.00	31.00	1500	1305	-195	12.99
8.	20.00	33.50	1200	1192	-8	0.68
9.	21.00	36.00	1100	1089	-11	0.98
10.	22.00	38.50	1000	996	-4	0.41
11.	23.00	41.00	900	910	+10	1.16
12.	25.00	46.00	800	760	-40	5.06
13.	26.00	48.50	700	693	-7	1.07
14.	27.00	51.00	600	630	+30	5.04
15.	28.00	53.50	500	572	+72	14.45
16.	31.00	61.00	400	420	+20	4.92
17.	34.00	68.50	300	293	-7	2.43
18.	37.00	76.00	200	185	-15	7.40
19.	40.00	83,50	100	93	-7	7.18

Apêndice 13. Transformação da migração relativa das bandas em pares de bases. Primer # 8, 10 ng

BANDA	MIGRAÇÃO	MIGRAÇÃO	TAMANHO	TAMANHO (pb)	ERRO	ERRC
Nº	(mm)	RELATIVA	(pb)	CALCULADO	RESIDUAL	%
1.	7.00	1.00	6000	6015	+15	0.25
2.	8.00	3.50	5000	4904	-96	1.91
3.	9.00	6.00	4000	4094	+94	2.34
4.	11.00	11.00	3000	3000	-0	0.00
5.	13.00	16.00	2500	2299	-201	8.03
6.	14.00	18.50	2000	2036	+36	1.81
7.	17.00	26.00	1500	1457	-43	2.87
8.	19.00	31.00	1200	1185	-15	1.27
9.	20.00	33.50	1100	1071	-29	2.60
10.	21.00	36.00	1000	970	-30	3.00
11.	22.00	38.50	900	879	-21	2.35
12.	23.00	41.00	800	796	-4	0.44
13.	24.00	43.50	700	722	+22	3.08
14.	25.00	46.00	600	653	+53	8.88
15.	27.00	51.00	500	533	+33	6.63
16.	29.00	56.00	400	431	+31	7.74
17.	32.00	63.50	300	303	+3	1.154
18.	35.00	71.00	200	199	-1	0.34
19.	40.00	83,50	100	63	-37	37.39

Apêndice 14. Transformação da migração relativa das bandas em pares de bases. Primer # 8, 20 ng

BANDA	MIGRAÇÃO	MIGRAÇÃO	TAMANHO	TAMANHO (pb)	ERRO	ERRC
Nº	(mm)	RELATIVA	(pb)	CALCULADO	RESIDUAL	%
1.	6.00	1.00	6000	6003	+3	0.06
2.	7.00	3.38	5000	4770	-230	4.60
3.	8.00	5.76	4000	3984	-16	0.41
4.	9.00	8.14	3000	3416	+416	13.87
5.	10.00	10.52	2500	2981	+841	19.24
6.	13.00	17.67	2000	2111	+111	5.57
7.	17.00	27.19	1500	1444	-56	3.73
8.	18.00	29.57	1300	1323	+23	1.81
9.	19.00	31.95	1200	1215	+15	1.29
10.	20.00	34.33	1100	1118	+18	1.63
11.	21.00	36.71	1000	1029	+29	2.95
12.	23.00	41.48	900	875	-25	2.79
13.	25.00	46.24	800	744	-56	6.99
14.	26.00	48.62	700	686	-14	2.02
15.	28.00	53.38	600	581	-19	3.11
16.	30.00	58.14	500	490	-10	1.98
17.	32.00	62.90	400	410	+10	2.41
18.	35.00	70.05	300	305	+5	1.74
19.	38.00	77.19	200	216	+16	8.17
20.	42.00	86.71	100	116	+16	16.41