

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Eliana Guedes Stehling

**ESTUDO COMPARATIVO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE
Pseudomonas aeruginosa ISOLADAS DE FIBROSE CÍSTICA E
OUTRAS INFECÇÕES**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) <i>Eliana Guedes Stehling</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.

16/3/99

Orientador: Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do título de
mestre em Ciências Biológicas na
área de Microbiologia

1999

3915985



UNIVERSIDADE	BC
N.º de matrícula	
V.º de matrícula	
V.º de matrícula	
V.º de matrícula	
TCMSO BC/	38.441
PROG.	229.99
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	24/08/99
N.º CPD	

CM-00125608-2

**FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

St32e **Stehling, Eliana Guedes**
 Estudo comparativo dos fatores de virulência de
Pseudomonas aeruginosa isoladas de fibrose cística e
 outras infecções/Eliana Guedes Stehling . - - Campinas,
 SP: [s.n.], 1999.
 65f.:ilus.

Orientador: Domingos da Silva Leite
 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia.

1. Fibrose cística. 2. Virulência. 3. Infecção. I. Leite, Domingos da Silva. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

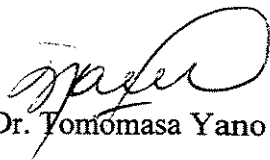
Data da Defesa: 16/07/99

Banca Examinadora

Titulates:



Prof. Dr. Domingos da Silva Leite (Orientador)



Prof. Dr. Tomomasa Yano



Prof. Dra. Antonia Teresinha Tresoldi

Suplente:

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

em memória da minha mãe Josefa

Agradecimentos

À Deus que permitiu e me deu forças para que esse trabalho fosse realizado.

Ao meu marido Renato e ao meu filho Matheus, pelo carinho, compreensão e incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, por sua prontidão e pela forma como conduziu o trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia pelos serviços prestados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo nº 97/04814-8) pelo apoio financeiro.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 FIBROSE CÍSTICA	1
1.2 <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	3
1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA DA <i>P. AERUGINOSA</i>	4
1.3.1 <i>Enzimas Proteolíticas</i>	4
1.3.2 <i>Hemolisinas</i>	5
1.3.3 <i>Leucocidina</i>	6
1.3.4 <i>Pili</i>	6
1.3.5 <i>Exotoxina A</i>	8
1.3.6 <i>Exoenzima S</i>	8
1.3.7 <i>Alginato</i>	9
1.4 PRESENÇA DE <i>P. AERUGINOSA</i> EM PACIENTES COM F. C.....	14
2. OBJETIVOS.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 LINHAGENS BACTERIANAS	19
3.2 HEMOLISINA	19
3.3 GELATINASE	19
3.4 ELASTASE	20
3.5 PILI	20
3.5.1 <i>Preparo das amostras</i>	20
3.5.2 <i>Preparo do sangue</i>	20
3.5.3 <i>Prova de Microhemaglutinação</i>	21
3.6 DETECÇÃO DO GENE PARA ALGINATO ATRAVÉS DA REAÇÃO DE PCR (“POLYMERASE CHAIN REACTION”).....	21
3.6.1 <i>Extração e Purificação do DNA Genômico</i>	21
3.6.2 <i>Reação de PCR</i>	22
3.6.3 <i>Eletroforese de DNA em gel de agarose</i>	24

4. RESULTADOS	25
4.1 PRODUÇÃO DE HEMOLISINA	25
4.2 PRODUÇÃO DE GELATINASE	25
4.3 PRODUÇÃO DE ELASTASE	26
4.4 HEMAGLUTINAÇÃO.....	26
4.5 DETECÇÃO DO GENE <i>ALGD</i>	27
4.6 DETECÇÃO DO GENE <i>ALGU</i>	27
4.7 DESCRIÇÃO DOS GRUPOS BACTERIANOS E SUAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS	33
4.7.1 Amostras não mucóides de <i>P. aeruginosa</i>	33
4.7.2 Amostras mucóides de <i>P. aeruginosa</i>	33
4.7.3 Amostras isoladas de pacientes não portadores de FC	34
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA ATRAVÉS DO TESTE DE χ^2	36
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÕES.....	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

Lista de Tabelas

TABELA 1: CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE PCR PARA OS GENES <i>ALGD</i> E <i>ALGU</i> .	23
TABELA 2: PRIMERS UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES <i>ALGD</i> E <i>ALGU</i> .	24
TABELA 3: PERCENTAGEM E FREQUÊNCIA DAS EXOENZIMAS (HEMOLISINA, GELATINASE E ELASTASE) PRODUZIDAS POR LINHAGENS DE <i>P. AERUGINOSA</i> ISOLADAS DE PACIENTES COM FC E OUTRAS INFECÇÕES.	31
TABELA 4: PERCENTAGEM E FREQUÊNCIA DOS GENES <i>ALGD</i> E <i>ALGU</i> ENCONTRADA EM LINHAGENS DE <i>P. AERUGINOSA</i> ISOLADAS DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA E DE OUTRAS INFECÇÕES.	32
TABELA 5: FREQUÊNCIA E PERCENTAGEM DAS CEPAS DE <i>P. AERUGINOSA</i> ISOLADAS DE PACIENTES COM FC E OUTROS CASOS CLÍNICOS QUE APRESENTARAM REAÇÃO POSITIVA OU NEGATIVA PARA UMA OU MAIS EXOENZIMAS.	36
TABELA 6: FATORES DE VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS DE <i>P. AERUGINOSA</i> NÃO MUCÓIDES (NM) ISOLADAS DE FIBROSE CÍSTICA.	37
TABELA 7: FATORES DE VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS DE <i>P. AERUGINOSA</i> MUCÓIDES (M) ISOLADAS DE FIBROSE CÍSTICA.	39
TABELA 8: FATORES DE VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS DE <i>P. AERUGINOSA</i> ISOLADAS DE DIFERENTES QUADROS CLÍNICOS.	41

Lista de Figuras

FIGURA 1: PCR DE LINHAGENS DE <i>P. AERUGINOSA</i> AMPLIFICADAS COM O PRIMER PARA ALGD.	29
FIGURA 2: PCR DE LINHAGENS DE <i>P. AERUGINOSA</i> AMPLIFICADAS COM O PRIMER PARA ALGU.	30

Lista de Gráficos

GRÁFICO 1: FREQUÊNCIA DAS EXOENZIMAS HEMOLISINA, GELATINASE E ELASTASE EM AMOSTRAS DE <i>P. AERUGINOSA</i> ISOLADAS DE FC COM MORFOTIPO MUCÓIDE, NÃO MUCÓIDE E OUTROS CASOS.....	31
GRÁFICO 2: FREQUÊNCIA DOS GENES <i>ALGD</i> E <i>ALGU</i> ENCONTRADA EM LINHAGENS DE <i>P. AERUGINOSA</i> ISOLADAS DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA E HOSPITALARES (OUTROS CASOS CLÍNICOS).....	32

Resumo

Fibrose Cística (FC) é uma doença genética, autossômica recessiva, caracterizada por anormalidade no transporte eletrolítico. *Pseudomonas aeruginosa* é um importante patógeno oportunista, freqüentemente encontrado em pacientes com FC. Nesses pacientes, a colonização inicial é feita com a bactéria na forma não mucóide que, posteriormente, converte-se à forma mucóide. O objetivo desse trabalho foi verificar comparativamente a produção de alguns fatores de virulência por *P. aeruginosa* em amostras mucóides e não mucóides isoladas de pacientes com FC e em amostras isoladas de pacientes não portadores de FC. O método para detectar hemolisina utilizou placas de ágar sangue contendo 5% de sangue de carneiro. A hidrólise da gelatina foi utilizada para detectar a produção de gelatinase e a produção de elastase foi observada em placas contendo 1% de elastina. A presença de pili foi analisada pelo método de microhemaglutinação e a cápsula de alginato, pelo método de PCR para identificar os genes *algD* e *algU*. As linhagens não mucóides isoladas de pacientes com FC e aquelas isoladas de outros casos clínicos produziram as exoenzimas gelatinase e elastase em maior freqüência que as linhagens mucóides. A produção de hemolisina e a presença dos genes *algD* e *algU* foi semelhante nos três grupos bacterianos. O gene *algD* foi encontrado em todas as linhagens estudadas e o ensaio de microhemaglutinação não foi satisfatório para detectar a presença de pili em *P. aeruginosa*.

1. Introdução

A primeira descrição da Fibrose Cística (FC) foi feita em 1938 por Anderson [citado por Gilligan (43)]. Ele descreveu esta síndrome em crianças que não cresciam normalmente e que tinham a região abdominal distendida, diarreia e palidez. A denominação “fibrose cística do pâncreas” foi derivada do fato de que crianças que morriam no período neonatal tinham lesões histopatológicas características do pâncreas. Posteriormente, alguns pacientes morreram em decorrência de infecção pulmonar ocasionada por *Staphylococcus aureus*. Esses pacientes, primariamente, tinham infecção na via respiratória e depois no parênquima pulmonar. Desta forma, Anderson descreveu os dois principais problemas fisiopatológicos encontrados na fibrose cística: insuficiência pancreática e infecção respiratória. Em ambos, ocorre produção de uma secreção extremamente viscosa. No pâncreas, essa secreção provoca bloqueio dos ductos pancreáticos e incapacidade de secretar enzimas digestivas. Na via respiratória, a produção dessa secreção está associada a infecção crônica com a presença de vários microrganismos.

1.1 Fibrose Cística

A FC é uma doença de caráter genético, autossômica recessiva e geralmente letal. É caracterizada por anormalidade no transporte eletrolítico, e encontrada em aproximadamente 1 entre 2000 crianças caucasianas (15).

Em 1985, o gene responsável pela FC foi localizado no braço longo do cromossomo 7. O gene defeituoso possui 250 kb, 27 exons e codifica uma proteína de transmembrana com 1.480 aminoácidos, denominada regulador de condutância de FC (CFTR) (47). Essa proteína possui dois domínios transmembrana (TM), dois domínios de ligação a nucleotídeos (NBF) e um domínio central (R) (25). A CFTR funciona como um canal para o íon cloro e pertence à família de proteínas de transmembrana, que também inclui a

glicoproteína P e o produto do gene de resistência a multidrogas, o qual reduz a eficácia da quimioterapia para o câncer por excreção anormal de agentes quimioterápicos (121).

Govan & Deretic (47) afirmam que em muitas populações com FC, 70% dos pacientes possuem uma mutação onde um resíduo de fenilalanina é deletado na posição 508 da proteína de transmembrana de FC (25). Essa deleção ocorre em uma região importante da proteína e pode afetar a regulação do transporte iônico para a superfície das células epiteliais (63). A mutação é chamada ΔF -508 e é encontrada primariamente em pacientes com doença severa e está relacionada à insuficiência pancreática. Outras mutações nesse gene já foram caracterizadas (47).

Em pacientes com FC, ocorre redução da permeabilidade ao íon cloro nas células epiteliais da via respiratória, glândulas sudoríparas, pâncreas e outros tecidos. Esses pacientes têm um suor tipicamente salgado. A habilidade dessas células em secretar cloro em resposta ao agonista AMPc é perdida ou severamente reduzida, contudo, outros canais com propriedades de condutância podem ser ativados por outros meios, incluindo agonistas, os quais têm efeito mediado pelo nível de cálcio celular (32).

No pulmão desses pacientes, devido ao defeito na regulação do íon cloro, ocorre uma desidratação da secreção respiratória, o que dificulta o batimento ciliar. Há também aumento da sulfatação dos proteoglicanos do muco. Essas moléculas modificadas podem interagir com a bactéria ou seus exoprodutos, contribuindo para a viscosidade da secreção respiratória (59). A desidratação da superfície e o aumento da sulfatação do glicocálix da via respiratória podem explicar o desenvolvimento de uma secreção persistente observada na via respiratória de pacientes com FC. Essa secreção proporciona um meio favorável para o crescimento de micróbios pois, nessas condições, a função mucociliar não é eficiente em remover bactérias e outros patógenos (25). As principais bactérias que colonizam o pulmão, nesses pacientes, são *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*.

A morte de pacientes com FC, em aproximadamente 90% dos casos, é causada por insuficiência respiratória (5, 14, 43, 98). Há episódios recorrentes de infecção pulmonar que

causam danos teciduais irreversíveis devido ao excesso de liberação de elastase por neutrófilos e por *P. aeruginosa* (5, 14).

Após a descoberta da CFTR, houve progresso nas pesquisas e melhor entendimento da microbiologia do pulmão do paciente com FC (133). Em 1992 camundongos mutantes para FC foram desenvolvidos através de mutação insercional (30, 33). O gene mutante foi corrigido no camundongo e o primeiro processo de terapia gênica foi formado utilizando adenovírus e lipossomo (16, 23, 124).

1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa são bactérias gram-negativas, de 0,5µm de largura por 1,5 a 3 µm de comprimento, contém de 1 a 3 flagelos polares, são móveis e não apresentam esporos (105). São aeróbicas, mas podem crescer em condições anaeróbicas na presença de nitrato como acceptor de elétrons (103). Crescem bem em meios simples, sem exigir muitos nutrientes (85, 103). São encontradas no solo, na água e nos alimentos. Também são capazes de colonizar a pele e o intestino humano e animal (103).

Essas bactérias produzem vários pigmentos, entretanto, a maioria das cepas são produtoras de piocianina e pioverdina. A piocianina é uma fenazina derivada que pode catalizar a conversão de O₂ à superóxido e peróxido de hidrogênio, mais tóxicos que o oxigênio (103). Esse pigmento é solúvel na água e no clorofórmio enquanto a pioverdina ou fluoresceína é insolúvel no clorofórmio (105). A piocianina é considerada um fator de virulência devido à sua capacidade de danificar tecidos endoteliais e também tem sido usada no diagnóstico de *P. aeruginosa* (103).

P. aeruginosa possui resistência intrínseca a vários antibióticos. Os mais efetivos são os aminoglicosídeos amicacina, gentamicina e tobramicina, o imipenem (β-lactâmico) e a aftazidina (cefalosporina de 3^a geração). Esses antibióticos não são efetivos contra todas as linhagens, já existindo cepas resistentes (103).

P. aeruginosa é considerada um importante patógeno oportunista (126), sendo encontrada em dois grupos de pacientes: os imunocomprometidos por doenças de base ou

pelo tratamento (FC e neoplasias) e nos pacientes submetidos a procedimentos invasivos (respiradores, sondas de via urinária, etc) (70).

1.3 Fatores de Virulência da *P. aeruginosa*

1.3.1 Enzimas Proteolíticas

As enzimas proteolíticas produzidas por *P. aeruginosa* exercem um papel importante na virulência durante a colonização. Essas enzimas são classificadas em protease alcalina e protease neutra. Elas contribuem para o desmoronamento das barreiras físicas do hospedeiro e aumentam a proliferação bacteriana, fornecendo aminoácidos e peptídeos das proteínas teciduais às bactérias. Em estágios mais avançados, podem interferir com o mecanismo de defesa imune por degradar imunoglobulinas. A protease alcalina tem sua atividade máxima em pH entre 7 e 9, sendo inibida por compostos quelantes como EDTA, bem como por metais pesados (70).

A protease neutra (elastase) é capaz de degradar a elastina, um dos principais componentes dos tecidos. Essa enzima é muito encontrada no pulmão, e é considerada um importante fator de virulência, responsável pelos danos teciduais pulmonares em pacientes com FC (5, 70). A elastina corresponde a quase 30% do total de proteínas do tecido pulmonar. Seu nome surge do fato que ela permite propriedades elásticas a órgãos como o pulmão, onde a entrada e a saída de ar requerem a contração dos alvéolos. A elastina também é um importante componente da parede dos vasos sanguíneos, sendo responsável pelo poder de recuperação da parede desses vasos (103).

Além da ação sobre a elastina, a elastase pode degradar ou inativar importantes tecidos e componentes do sistema imune como, por exemplo, imunoglobulinas, fatores do complemento, o inibidor da proteinase α_1 , colágeno e fibrina. A elastase também atua sinergicamente com a protease alcalina para inativar as citocinas humanas γ -interferon e o fator de necrose tumoral- α (100).

P. aeruginosa tem atividade elastolítica que parece ser devido à atividade combinada de 2 enzimas: LasA e LasB (103). A elastase ou Las B é uma metaloprotease de zinco neutra, com ação para um grande número de substratos (81). Sua sequência e estrutura cristalográfica mostram semelhança com a termolisina do *Bacillus cereus* (13). A eficiente produção e o processamento de elastase requerem a presença dos íons zinco e cálcio (87). Codificada por *las B*, a elastase é sintetizada como uma pré-proenzima de 53,6 kDa. Um peptídeo de 2,4 kDa é removido durante a translocação através da membrana. No periplasma, a proelastase é rapidamente processada por clivagem autoproteolítica. O propeptídeo (18,1 kDa) permanece associado com o domínio maduro (33,1kDa), e é translocado através da membrana externa (13, 81). Devido à ligação do propeptídeo à elastase madura, ocorre a inibição da atividade enzimática, portanto, o propeptídeo parece impedir que a enzima torne-se ativa antes de sua secreção (13).

A protease Las A, codificada por *lasA*, foi primeiro identificada quando uma mutação (*las A1*) em linhagens PAO1 resultou em deficiência na habilidade para degradar elastina. A Las A secretada, aumenta a atividade da elastase, bem como de outras proteases (termolisina e proteinase K). Essa protease tem atividade proteolítica que é aumentada na presença de outras proteases, especialmente a elastase codificada pelo gene *Las B* (103).

1.3.2 Hemolisinas

Duas hemolisinas podem ser excretadas por *P. aeruginosa* (48), diferindo quanto à composição e ao modo de agir. Uma delas é um glicolípídeo de baixo peso molecular, estável ao calor e que atua solubilizando lipídeos. A outra é uma proteína com atividade de fosfolipase C, lábil ao calor, e que cataliza a hidrólise de fosfatidilcolina a fosforilcolina e diacilglicerol (7). Ambas são excretadas na fase estacionária sob condições de crescimento limitadas por fosfato (70). Essas hemolisinas atuam em cooperação com a fosfatase alcalina, liberando fosfato inorgânico de fosfolipídeos (64). A fosfolipase C atua como determinante de virulência na patogênese da infecção pulmonar (7). Liu et al., 1979 (68), verificaram que a combinação de glicolípídeo hemolítico e de fosfolipase C pode produzir considerável lesão no tecido pulmonar durante a infecção no pulmão. Posteriormente,

Southern et al., 1970 (116), postularam que fosfolipase C pode aumentar a colonização do tecido pulmonar por *P. aeruginosa*, como também exercer um importante papel na formação de lesões da pele. A produção de fosfolipase C é controlada por dois loci gênicos localizados entre 22 e 23 min do cromossomo bacteriano (8).

1.3.3 Leucocidina

A leucocidina é uma proteína tóxica capaz de destruir e mudar a aparência dos leucócitos, tornando-os aumentados e seus segmentos nucleares fundidos. Essa proteína é um polipeptídeo de 27 000 Da excretada por *P. aeruginosa* por autólise. Ela atua na membrana celular do leucócito alterando a composição de fosfolipídeos e causando influxo de cálcio, o que resulta em fosforilação da membrana lisossômica e fuga do conteúdo lisossômico para o citoplasma (70).

1.3.4 Pili

Pili (ou fimbria) é uma estrutura flexível, semelhante a pêlos de 6 a 8 mm de diâmetro, de diferentes tamanhos (1000 a 2500 nm) e presente na superfície de muitas *P. aeruginosa* (70). Essa estrutura aumenta a virulência do microrganismo por permitir sua aderência em superfícies sólidas (117), além de aumentar sua resistência em relação às células fagocitárias (70).

P. aeruginosa produz dois tipos de adesinas protéicas: pili e adesinas não piliadas (103). O pili é similar ao da *Neisseria gonorrhoeae*, conhecido como pili tipo IV (117).

O pili tipo IV contém aproximadamente 500-1000 subunidades, com base em seu comprimento. É composto por um polímero de polipeptídeos de cadeia única. A subunidade pilina de *P. aeruginosa* está arranjada em hélice, com aproximadamente 5 subunidades por giro circundando um longo filamento. O pili pode fazer adesão através da interação direta da pilina com o tecido receptor ou pode utilizar subunidades menores, que são responsáveis pelo reconhecimento do receptor e pela adesão (117).

Alguns trabalhos (52, 97, 101) demonstraram o envolvimento de pili na adesão bacteriana. Os anticorpos monoclonais específicos para regiões definidas do monômero da pilina e para peptídeos sintéticos (correspondendo à peptídeos específicos dentro da subunidade de pilina) inibiram a adesão bacteriana em células epiteliais e também em células da traquéia. As células respiratórias de pacientes com FC têm mais GM1 que as células normais e os organismos piliados mostraram-se 10 vezes mais virulentos que as células não piliadas em modelos de camundongos queimados (117).

A perda de pili reduz a aderência às culturas de células epiteliais e células traqueais bovinas, mas não elimina a adesão à mucina ou a componentes da mucina. Entretanto, mutações no gene estrutural da pilina e algumas mutações regulatórias que eliminam a expressão de pili resultam na perda completa de aderência bacteriana em muitas células e também na mucina, sugerindo que a expressão de várias adesinas de *P. aeruginosa* é regulada por um ou vários elementos regulatórios comuns. Além da função de mediar aderência para células epiteliais, o pili pode ser reconhecido por células fagocitárias (117).

A presença de glicoconjugados alterados na superfície de células epiteliais pode atuar como receptores para a *P. aeruginosa*. A mutação em CFTR diminui a presença de ácido siálico nos glicolipídeos e nas glicoproteínas da membrana apical dessas células (103).

Existem evidências que sugerem que a anormalidade funcional do regulador de condutância de transmembrana de FC (CFTR) resulta em alterações na glicosilação de componentes epiteliais (31, 93, 101). Os lipídeos e as proteínas de células epiteliais de pacientes com FC apresentam redução de ácido siálico como consequência da limitação do íon cloro e por remoção do ácido siálico por neuraminidase produzida por *P. aeruginosa* (103), tornando-se melhores receptores para o pili. Assim, células epiteliais de pacientes com FC diferem daquelas de indivíduos normais, pois possuem um número menor de glicolipídeos com ácido siálico, o que favorece o ataque de *P. aeruginosa*, por aumentar o número de receptores que reconhecem a sequência GalNAcB1-4Gal, presente nos aminoglicosídeos (GM1 asialo, GM2 asialo) e Cad asialo (61, 101). O pili adere às células epiteliais e as adesinas não piliadas à mucina (103).

1.3.5 Exotoxina A

A exotoxina A (ETA) é conhecida como o componente mais tóxico produzido por *P. aeruginosa*, sendo encontrada em aproximadamente 90% dos isolados clínicos (70). O mecanismo de ação da toxina A é idêntico ao da toxina diftérica: ambas são nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) glicosilases e ambas transferem a porção adenina difosfato (ADP) - ribose do NAD para um resíduo de histidina do fator de alongamento 2, inibindo a fase de alongamento da síntese protéica no ribossomo (119, 120). A toxina é excretada como uma proenzima de 71.500 Da e expressa sua atividade enzimática após clivagem, denaturação e redução proteolítica. A síntese de ETA é regulada por íons, e a sua expressão máxima é observada quando há baixos níveis ou limitação de íons (70).

A exotoxina A é capaz de se ligar à superfície celular através de uma glicoproteína de 300 kDa (103). O papel da toxina A na patogênese de infecções por *Pseudomonas* é sugerido por: (i) letalidade da toxina purificada em várias espécies de animais; (ii) a habilidade da antitoxina de proteger animais contra subsequentes ataques com linhagens toxigênicas de *Pseudomonas*; (iii) a habilidade de inibir a síntese de proteínas *in vitro* e *in vivo*; (iv) o decréscimo na função do fator de alongamento 2 no fígado de camundongos queimados e infectados com linhagens toxigênicas; (v) diminuição da virulência em camundongos queimados que foram infectados por mutantes de *P. aeruginosa* que perderam a capacidade de produzir toxina A, mas permanecendo similares às suas linhagens parentais em todos os outros parâmetros (22).

Em humanos, os anticorpos para a toxina A têm sido encontrados em adultos normais. O título de anticorpos aumenta quando há bacteremia por *Pseudomonas*. A manutenção da bacteremia tem sido relacionada ao aumento do título de antitoxina (70).

1.3.6 Exoenzima S

A exoenzima S é uma mono ADP-ribosiltransferase secretada por algumas linhagens de *P. aeruginosa* (35, 39). Duas formas de Exo S podem ser encontradas, uma com 53 kDa (Exo53) e outra com 49 kDa (ExoS). Essa última é, aparentemente, resultante

da remoção de um segmento de 4 kDa da forma que possui 53 kDa (69, 103). Essa exoenzima tem sido associada ao estabelecimento da infecção, embora o seu papel na patogênese da infecção ainda não esteja bem esclarecido (39). *In vitro*, a exoenzima S cataliza a transferência de ADP-ribose de NAD⁺ para muitas proteínas celulares de eucariotos. Seu principal substrato são pequenas proteínas de ligação ao GTP, de 21-25 KDa (18, 19). Essas proteínas funcionam como componentes centrais da regulação do transporte de vesículas intracelulares, da proliferação e da diferenciação celular (12). A ADP-ribosilação dessas proteínas por exo S não parece alterar suas interações nucleotídicas, mas pode afetar sua interação com outras proteínas celulares (18). A atividade ADP-ribosiltransferase de exoenzima S foi detectada no fluido pleural de coelhos infectados com *P. aeruginosa*.

A exo-S faz, preferencialmente, ADP-ribosilação de duas proteínas extracelulares do soro com massa molecular de 150 kDa e 27 kDa. A análise bioquímica mostra que a proteína com 150 kDa é uma imunoglobulina (IgG) e a proteína com 27 kDa é uma apolipoproteína A1 (58). Essa exoenzima pode ser ativada por uma proteína celular do hospedeiro (103). Essa proteína é denominada FAS (fator de ativação da ExoS), um fator necessário para a ADP-ribosilação (20). Essa molécula possui aproximadamente 29 kDa, um ponto isoelétrico de 4.3 a 4.5, e é encontrada em grande quantidade nas células eucarióticas (39).

1.3.7 Alginato

O alginato é um exopolissacarídeo linear, o-acetilado e formado de ácido L-glicurônico e de ácido D-manurônico, unidos através de ligação β -1,4 (34, 86, 107). É viscoso e característico da forma mucóide de *P. aeruginosa*, sendo atribuída a essa cápsula a patogenidade dessas bactérias no pulmão de pacientes com FC (98).

A síntese de alginato é uma propriedade característica de *P. aeruginosa* isolada de FC. Tem-se observado que as características especiais do pulmão desses pacientes podem exercer um papel importante na expressão dos genes responsáveis pela síntese do alginato (98). Um desses fatores é a alta osmolaridade, causada por concentração anormal dos íons

Na^+ , Cl^- , Ca^{++} e K^+ no pulmão, além de um ambiente desidratado. Essas condições podem ser reproduzidas pela adição de NaCl , KCl e sacarose “in vitro”, bem como por etanol a 1%, que levam ao aumento da expressão do alginato. Esse processo pode ser revertido pela utilização de concentrações subinibitórias de ácido nalidíxico, inibidor da DNA girase (9).

Um grande aumento na produção do muco traqueobronquial, excessivamente viscoso, é uma das primeiras manifestações da FC. Esse muco dificulta o tratamento da infecção na FC pulmonar e tem como consequência um resultado fatal (10). Ele não causa apenas a obstrução dos brônquios, mas também fornece um meio ideal para a colonização bacteriana no pulmão de pacientes com FC. Durante a terapia com antimicrobianos, grande parte das bactérias adquirem a forma mucóide, a qual é resistente à grande maioria dos antibióticos (98).

Várias características do alginato são necessárias para exercer um papel na patogênese das lesões do pulmão de pacientes com FC: (i) propriedade anti-fagocitária associada, mas não limitada a ineficiente opsonização (91); (ii) adesão (97); (iii) resistência ao tratamento com antibióticos (3); (iv) possível supressão na função dos leucócitos (73) e (v) proteção aos intermediários da oxidação (66, 114).

Os anticorpos para alginato podem ser detectados em todos os pacientes portadores de FC com infecção crônica causada por *P. aeruginosa*, independentemente se a forma mucóide é isolada do pulmão desses pacientes (88).

O alginato suprime a função dos linfócitos (73). Quando utilizado em altas doses para imunização em camundongos, reduz células T citotóxicas (CD3^+ , CD8^+) (92). Também estimula a liberação de IL-8 por células epiteliais, contribuindo para o recrutamento de neutrófilos, os quais dominam a inflamação da via respiratória em FC (53).

Alguns trabalhos (25, 128, 129) demonstraram que um conjunto de genes localizados no cromossomo de *P. aeruginosa*, organizados num “operon”, são responsáveis pelos passos iniciais da síntese do alginato. A expressão desses genes é regulada por genes regulatórios: (i) *algR*, (ii) *algP* e (iii) *algB*. Mutações neste grupo de genes leva à perda da habilidade para produzir o alginato (43).

Esses genes estão localizados próximo à 9 min do cromossomo de *P. aeruginosa*, e são utilizados para a transcrição do gene *algD* e a máxima produção de alginato. O produto do gene *algR* (também chamado de R1) é um regulador de resposta ambiental. Pertence a classe de proteínas regulatórias de dois componentes comumente encontrados em espécies bacterianas e está localizado a montante a *algD* (129). O *algR* une-se a três sítios dentro do promotor *algD* e é ativado por *algQ*, através de fosforilação (103). O *algB* é essencial para a síntese de altos níveis de alginato e, assim como o *algR*, é um regulador de resposta. A transcrição do *algB* requer os produtos dos genes *algT* e *IHF* (fator de integração do hospedeiro). *AlgP* (também denominado de R3) assemelha-se a histona H1 eucariótica e também está envolvido na síntese de alginato (128).

Os genes desse “operon” estão localizados em duas áreas distantes do cromossomo, com exceção do gene biossintético *algC*, o qual codifica fosfomanomutase, e está localizado dentro de um conjunto de genes regulatórios, mas é corregulado com os genes biossintéticos (103).

Flynn e Ohman (36) identificaram uma outra região do cromossomo que parece estar envolvida na regulação e conversão de linhagens não mucóides à mucóides, designando-a de região *algST* (36). O gene *algS* controla a expressão do gene *algT* (ou *algU*) e o produto deste gene regula a síntese do alginato. O primeiro gene deste “operon”, o *algD*, codifica a GDP-manose desidrogenase, o primeiro passo na biossíntese do alginato (95). A expressão do *algD* é freqüentemente usada como indicador da expressão dos demais genes responsáveis pela biossíntese do alginato (103, 110).

O *algU* é uma fator sigma alternativo necessário para o início da transcrição do *algD*. Quando o *algU* é inativado, a transcrição do *algD* é, geralmente, impedida (75). Isso indica uma similaridade com o fator sigma SpoOH, o qual controla a esporulação no *Bacillus* spp (33), com o *CarQ* de *Myxococcus xanthus* (80) e com o *HrpL* de *P. syringae* pv. *Syringae* (130). Estudos recentes demonstraram a presença de sequências homólogas ao gene *algU* em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (25, 77). Alguns trabalhos indicam que o homólogo do *algU* em *E. coli* é o fator sigma alternativo σ^E , o qual tem sido previamente caracterizado a nível bioquímico (122). Os genes que codificam σ^E , em *E. coli*

e *S. typhimurium*, são chamados de *rpoE*. O fator sigma σ^E está envolvido na expressão do gene *rpoR* (o gene de alta temperatura) (25, 131).

A transcrição de *algU* é induzida por estresse ambiental tal como o choque térmico (109). Essas observações sugerem que *algU* pode exercer um papel fisiológico similar ao do *rpoE* em bactérias entéricas e que a produção de alginato é apenas um dos sistemas regulados por *algU* em *P. aeruginosa* (132).

Estudos realizados por Deretic et al., 1994 (25) identificaram um conjunto de genes (*algU*, *mucA* e *mucB*), que controlam a conversão ao fenótipo mucóide em *P. aeruginosa* (25). A ativação do promotor *algD*, pelo gene *algU*, leva à síntese do alginato, pré-requisito para o fenótipo mucóide. A análise dos genes *algU*, *mucA* e *mucB* indica que a ativação do *algD* é dependente da mutação nos genes *muc*. O *algU* ativa o promotor, entretanto, se o *mucA* e o *mucB* cointeragirem com *algU*, possivelmente irá haver supressão da função desse gene (78). Assim, as mutações que inativam os genes *muc* liberam o gene *algU* da regulação negativa, com formação do fenótipo mucóide (108).

A produção de alginato varia de linhagem para linhagem (24). A análise do mecanismo de reversão à forma não mucóide indica que esse processo não é uma reversão verdadeira da mutação inicial, isto é, em *mucA*, mas atribuída a uma mutação supressora em segundo sítio (26, 108). Muitas dessas mutações compensatórias são no *algU* e inativam ou causam alteração nesse gene (26). Como existem caminhos adicionais para supressão da forma mucóide (11, 75), uma variedade de mutações compensatórias, em conjunto com a pressão seletiva sobre as células contendo *algU*, podem explicar a alta frequência de pseudoreversão para o fenótipo mucóide (75).

A presença do alginato sugere um papel na patologia da lesão pulmonar da FC tais como: indução do aumento da resposta imune humoral, associada com deficiente função pulmonar, sendo os danos alveolares ocasionados pela formação e deposição de complexos imunes (89).

1.3.7.1 Genética da biossíntese do alginato

Muitas enzimas envolvidas na biossíntese do alginato têm sido caracterizadas (47). A maioria delas é codificada por um conjunto de genes localizados a 34 min do cromossomo (123). Entretanto, devido à recente demonstração de que muitas das enzimas envolvidas na síntese do alginato também participam da biossíntese do LPS, esta região cromossômica não pode ser considerada inteiramente específica para o alginato (47). Esse *cluster* contém vários genes essenciais para a síntese do alginato. Em ordem de transcrição, encontramos: *algD*, codifica GDP manose desidrogenase, a qual cataliza o primeiro passo na biossíntese (92), *algG*, codifica a epimerase, a qual converte resíduos manurônicos em glicuronato (17); *algX*, codifica um polipeptídeo de 53 kDa cuja função é desconhecida, mas parece ser necessária para produção de alginato (82), *algL*, codifica uma enzima chamada liase, com habilidade para despolimerizar o alginato, podendo também ser necessária para a polimerização do alginato (82), *algI* e *algJ*, são requeridos para acetilação do alginato (38), *algF*, codifica uma acetilase (37) e *algA* codifica uma fosfomanose isomerase, a qual converte frutose-6-fosfato em manose-6-fosfato (42), e também possui uma atividade fosforilase, implicando na síntese de GDP manose (113). Apenas o *algC*, que codifica uma enzima com atividade fosfomanomutase capaz de converter manose-6-fosfato em manose-1-fosfato, não pertence a esse *cluster* a 34 min do cromossomo (134). Vários outros genes foram identificados e sequenciados no mesmo *cluster*, mas suas funções não estão completamente determinadas. Como exemplo, podemos citar o produto do gene *algE*, que é uma proteína de membrana externa. Maharaj et al., 1993 (71), sugerem que os genes correspondentes à mutação *alg-8* e *alg-44* podem estar envolvidos na polimerização de resíduos do ácido manurônico (71).

1.3.7.2 Alginato e biogênese do LPS

As enzimas fosfomanose isomerase/GDP manose pirofosforilase (produto do gene *alg A*) e fosfomanomutase (produto do gene *alg C*, a qual tem uma atividade fosfoglucomutase) possuem dupla função e participam na síntese do LPS e do alginato (21). Por exemplo, quando ocorre uma mutação no gene C, há uma interrupção na incorporação

da glicose no LPS (21, 131). As linhagens de *P. aeruginosa* que não possuem o *algC* são menos virulentas nos modelos de infecção que utilizam ratos queimados, devido ao efeito no LPS (44). Com a inserção do *algC*, ocorre novamente a síntese das bandas A e B do LPS (131).

Posteriormente, outras enzimas foram associadas à formação do LPS. A enzima GDP manose, intermediária na síntese do alginato, é provavelmente a precursora para incorporação de D-ramanose na banda A do LPS (67). Quando ocorre oxidação e formação do ácido GDP-manurônico, essa enzima torna-se precursora direta para a polimerização do alginato. Assim, com exceção do passo catalizado pela GDP-manose desidrogenase, as vias de formação do alginato e do LPS parecem ser semelhantes (47). Hancock et al. 1983, (49) sugerem que a conversão para o fenótipo mucóide pode causar perda da cadeia O do LPS, uma característica freqüentemente encontrada em isolados de FC, a qual torna essas linhagens menos resistentes ao soro, devido ao aumento da deposição de C₃b nas amostras isoladas de FC com deficiência na cadeia O (49).

1.4 Presença de *P. aeruginosa* em pacientes com F. C.

P. aeruginosa é a bactéria mais freqüentemente associada à infecção pulmonar em pacientes com FC (72). A primeira descrição da associação entre linhagens de *P. aeruginosa* e colonização pulmonar crônica em pacientes com FC apareceu em 1960 (27, 28, 51). Doggett e cols. (27) reportaram que tais linhagens podem ser isoladas em 90% dos pacientes colonizados com *P. aeruginosa*. Em contraste, essas linhagens são encontradas em menor freqüência em outras infecções em humanos, plantas ou animais (47). A colonização inicial da via respiratória é feita com a bactéria na forma não-mucóide (76). Após o período de colonização, a bactéria se converte em linhagem mucóide, sendo este fato dependente das condições ambientais (43, 89, 108).

Embora formas mucóides de *P. aeruginosa* sejam caracteristicamente associadas à FC já diagnosticada, o mecanismo que gera o estabelecimento de linhagens mucóides não são específicos para FC. Esses mecanismos refletem regulação molecular e propriedades

biológicas do alginato e adaptação microbiana para uma forma parasita associada com infecção crônica (47). *P. aeruginosa* mucóide pode ser isolada em mais de 40% dos escarros positivos para *Pseudomonas* de pacientes não portadores de FC, mas com bronquite crônica e outras doenças pulmonares não obstrutivas, ocasionalmente de pacientes com infecção crônica do trato urinário (79) e mais raramente de outras infecções nesses pacientes (2, 27). A análise química tem confirmado que linhagens mucóides de pacientes não portadores de FC produzem alginato com estrutura similar às produzidas por pacientes com FC (99, 118).

O mecanismo de como *P. aeruginosa* não mucóide coloniza o pulmão de pacientes fibrocísticos ainda não está completamente esclarecido. Algumas observações foram feitas por Woods et al., 1980 (126). Eles sugerem que: (i) esses microrganismos aderem significativamente melhor às células da mucosa bucal de pacientes com FC; (ii) o aumento da aderência bacteriana se relaciona diretamente com a perda de fibronectina da superfície celular, assim como o aumento do nível de protease salivar em pacientes com FC; (iii) a aderência de *P. aeruginosa* não mucóide às células bucais de indivíduos não portadores de FC pode ser promovida por exposição à tripsina. Esses resultados sugerem que pacientes com FC podem ser comprometidos por fatores dietéticos.

Além dos fatores de colonização, outros fatores relacionados aos pacientes com FC podem estar associados à preferência de *P. aeruginosa* pelo pulmão do fibrocístico. Algumas evidências decorrentes do estudo das mutações em CFTR e também da observação da fase inicial da colonização crônica com esta bactéria sugerem que o risco de colonização bacteriana é maior em pacientes com FC e onde a mutação $\Delta F-508$ está presente (63). Uma variedade de mecanismos para colonização inicial podem ser considerados, entre eles: adesão para mucina traqueobronquial (96), inativação do batimento ciliar por piocianina (55) e o papel do ácido siálico na agregação da *P. aeruginosa* mediada pela saliva (60).

A consequência da biossíntese do alginato por *P. aeruginosa* mucóide no pulmão de pacientes com FC tem sido estudada por Pedersen, 1992 (90), que observou o estabelecimento e a intratabilidade da colonização bacteriana e a progressiva infecção

pulmonar. O alginato permite a formação de microcolônias que podem ser observadas no trato respiratório de pessoas com FC e *in vitro* (45). A formação de microcolônias mucóides pode ter profundo efeito na habilidade do hospedeiro de eliminar o patógeno, resultando em fagocitose ineficiente (45, 115). Devido ao dano tecidual causado, indiretamente, pela deposição de complexos imunes e diretamente pela excessiva atividade da elastase de neutrófilos, um grande número de polimorfonucleares são atraídos por quimiotaxia (15, 29, 46, 50). O biofilme de alginato pode também representar uma barreira para agentes antimicrobianos (3), além de aumentar o ataque de linhagens mucóides aos cílios do epitélio respiratório e às glicoproteínas da superfície mucociliar (4, 97). Entretanto, algumas evidências demonstram que o alginato não é o principal ligante (94) e que apenas a adesão não pode explicar a persistência de *P. aeruginosa* mucóide no pulmão de pacientes com FC. Alguns indivíduos com FC parecem ser protegidos contra a colonização de *P. aeruginosa* pelos anticorpos para o alginato (91).

Alguns estudos têm demonstrado que certos fenômenos são de particular importância para a colonização microbiana e para a prevalência de *P. aeruginosa* em FC, dentre eles: (i) o efeito da mutação em CFTR, no movimento eletrolítico e de água através da superfície epitelial, na via respiratória e glândulas submucosas (59); (ii) anormalidades colaterais devido ao efeito do CFTR, os quais podem afetar a glicosilação de receptores de superfície (glicolídeos e glicoproteínas que não possuem ácido siálico) na membrana apical de células epiteliais (1, 6,); (iii) a habilidade de *P. aeruginosa* para aderir a receptores com pouco ácido siálico (52, 62, 102), e (iv) a capacidade genética desse organismo converter-se à forma mucóide, produtora de alginato (40).

O estabelecimento da infecção crônica com *P. aeruginosa* indica pouca perspectiva para os pacientes, sendo esse o estágio no qual a conversão para mucóide tem particular importância (89). Alguns pesquisadores observam duas fases na colonização com *P. aeruginosa* (59). O primeiro estágio é uma insidiosa infecção com a intermitente presença de *P. aeruginosa*. Johansen e Hoiby, 1992 (54) afirmam que nem todo episódio inicial com *P. aeruginosa* resulta no estabelecimento da infecção crônica. Esses autores definem a fase inicial da colonização como um período caracterizado por isolamento esporádico da

bactéria e detecção de anticorpos no soro. Essa fase não causa declínio significativo na função pulmonar (56) e pode continuar por períodos variáveis (0 a 5 anos e meio). O segundo estágio na progressão natural da doença é o estabelecimento da infecção crônica por *P. aeruginosa*. Johansen e Hoiby, 1992 (54), observaram que, nessa fase, as bactérias cultivadas continuam por no mínimo 6 meses; observaram também o aumento do número de anticorpos para *P. aeruginosa* (54). O estabelecimento da infecção crônica coincide com a conversão para o fenótipo mucóide (59, 90).

Vários fatores contribuem para a maior susceptibilidade de pacientes com FC para a colonização e a infecção crônica do trato respiratório. Em indivíduos normais, as bactérias inaladas são imediatamente envolvidas pelo muco da via respiratória. Em seguida são carreadas pelo movimento ciliar e, então, são deglutidas e destruídas pelo ácido estomacal. Dessa forma, ocorre eliminação dos microrganismos adquiridos, o que protege o trato respiratório da infecção. Entretanto, quando a função ciliar está diminuída, a bactéria pode se multiplicar e infectar as células epiteliais (93).

A forma mucóide de *P. aeruginosa* está presente na maioria dos pacientes na fase crônica da doença. Ela cresce como microcolônias (5, 65) e produz proteases que causam liberação de mucinas pelo epitélio respiratório, o que aumenta a aderência da bactéria ao epitélio. A colonização crônica leva à exacerbação da infecção pulmonar, que é considerada a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes com FC (47).

A presença de enzimas extracelulares como protease alcalina e elastase, além de exotoxina A e alginato, induzem a formação de complexos imunes, mediando hipersensibilidade que resulta em inflamação (43). Dessa forma, há uma correlação entre a severidade da doença pulmonar e os altos títulos de anticorpos (5), responsáveis pelos danos pulmonares em pacientes com FC (89). Como consequência, uma grande quantidade de neutrófilos é atraída para o local da infecção. Esses neutrófilos também liberam produtos como elastase, o que contribui para maiores danos teciduais (5).

2. Objetivos

O objetivo do presente estudo foi verificar comparativamente a expressão dos fatores de virulência abaixo relacionados, além de realizar um estudo genético para avaliar a presença de alguns genes envolvidos na expressão da cápsula de alginato em *Pseudomonas aeruginosa*. As cepas de *P. aeruginosa* estudadas nesse trabalho foram isoladas de pacientes com fibrose cística, com morfotipos mucóide e não mucóide e de pacientes não portadores de fibrose cística (sangue, urina, secreção de traquéia e de orofaringe), isoladas no HC/UNICAMP.

Fatores de virulência estudados:

- Protease
- Elastase
- Hemolisinas
- Pili;
- Alginato (*AlgD* e *AlgU*)

3. Material e Métodos

3.1 Linhagens Bacterianas

As linhagens bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* estudadas no presente trabalho foram cedidas pelo Prof. Dr. Ulisses M. de Oliveira, do Departamento de Patologia Clínica da FCM da Universidade Estadual de Campinas (SP). Um total de 120 cepas foram estudadas, entre elas, 80 foram isoladas de pacientes com FC (40 com morfotipo mucóide e 40 com morfotipo não mucóide), e 40 foram obtidas de pacientes não portadores de FC [28 de secreção (traqueal e de orofaringe), 11 de sangue e 1 de urina]. A amostra PA1802 foi utilizada como controle positivo para todos os ensaios e a designação e origem das linhagens analisadas encontram-se listadas nas tabelas 6, 7 e 8.

3.2 Hemolisina

Para a realização deste ensaio utilizamos ágar sangue preparado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Para a detecção da formação de halos de hemólise, as cepas de *P. aeruginosa* foram inoculadas em pontos equidistantes nas placas de Petri, e incubadas a 37°C, por 18-24 horas (83).

3.3 Gelatinase

A atividade proteolítica de *P. aeruginosa* foi testada em solução de gelatina. Inicialmente, as bactérias foram inoculadas em Infusão de Cérebro e Coração (BHI), acrescido de sais inorgânicos. Após incubação a 37°C durante 24 horas, as culturas bacterianas foram inoculadas em tubos de 13x130mm (picada em profundidade) contendo 5mL de uma solução a 12% de gelatina (Difco) diluída em tampão fosfato, pH 7,4 e então,

novamente incubadas a 37°C por 24 horas. A atividade proteolítica é observada quando ocorre liquefação da gelatina (125).

3.4 Elastase

A produção de elastase foi determinada pelo método de ensaio em placa (83, 84, 106). O meio de cultura continha 1% de elastina (Sigma) e 2% de ágar bacteriológico (Difco), diluídos em tampão Tris-HCl (hidroximetil) aminometano 0,03M, pH 8,0. As cepas de *P. aeruginosa* foram inoculadas pontualmente e as placas de Petri incubadas por 72 horas a 37°C.

A atividade de elastase foi determinada pela observação no meio de cultura de zonas claras ao redor do ponto de inoculação, em decorrência da ação da enzima. (83-modificado).

3.5 Pili

3.5.1 Preparo das amostras

As bactérias foram cultivadas em BHI-(Difco) e incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, foram transferidas para placas de ágar simples e novamente incubadas a 37°C, sendo utilizadas 24 horas depois.

3.5.2 Preparo do sangue

Eritrócitos humanos, bovinos, equinos, ovinos, de coelho e de cobaia, foram coletados em citrato de sódio 5,8%. Cada sangue foi centrifugado por 10 min a 2.000 rpm para separar as hemáceas do plasma. As células foram então divididas em 2 partes: uma parte (das hemáceas) foi lavada 3 vezes com PBS e a outra com PBS contendo 0,5% de D-

manose (PBS -M)(DIFCO), após o que, foram utilizadas numa concentração de 1,5% em cada tampão.

3.5.3 Prova de Microhemaglutinação

Para a realização deste ensaio, foram utilizadas placas para microtitulação (Falcon plastics) de base côncava. As suspensões bacterianas obtidas a partir das placas de ágar simples foram diluídas em série, à razão 2, diretamente nas placas de microtítulos em volume de 50µL, utilizando PBS ou PBS-M como diluente. Sobre essas diluições foi adicionado o mesmo volume das suspensões dos diferentes eritrócitos a 1,5%. Durante a realização do ensaio, os componentes foram mantidos em banho de gelo. As placas foram incubadas por pelo menos 1 hora a 4°C, para então realizar-se a leitura. Consideramos 1 unidade de hemaglutinação (1UH) a maior diluição da suspensão bacteriana que ainda é capaz de causar hemaglutinação total dos eritrócitos ensaiados (10, 41).

3.6 Detecção do gene para alginato através da Reação de PCR (“Polymerase Chain Reaction”)

3.6.1 Extração e Purificação do DNA Genômico

As linhagens bacterianas foram inoculadas em 8 mL de meio BHI (Brain Heart Infusion), a 37°C, por um período de 24 horas, e a seguir foram centrifugadas a 12.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 500 µL de Tampão T.E. 1x (Tris/HCl/EDTA) 50mM, pH 8,0. A amostra foi novamente centrifugada (12.000 rpm por 2 min) e 400 µL de Tampão T.E. (1x) e 50µL de lisozima (10 mg/mL) foram adicionados. A mistura foi agitada em vortex e incubada a 37°C *overnight*. Transcorrido o tempo indicado, foram adicionados 75 µL de SDS (Sodium Duodecyl Sulfate) a 10 % com proteinase K (10 mg/mL) e a mistura foi homogeneizada com o auxílio de um vortex e em seguida, foi incubada a 65 °C por 10 minutos. Um volume de 100 µL de NaCl 5M e 100 µL de solução de CTAB (Hexadecyltrimethyl-Ammonium

Bromide)/NaCl (0,27 M) (pré-aquecidas a 65 °C) foi adicionado, a mistura foi novamente agitada em vortex até que o líquido tornou-se branco (aspecto leitoso) e depois foi incubada a 65°C por 10 minutos. A adição de 750 µL de uma mistura de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foi seguida de agitação em vortex por pelo menos 10 segundos e uma nova centrifugação foi feita à temperatura ambiente (12.000 rpm por 5 minutos). O sobrenadante aquoso foi transferido para um tubo limpo onde foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol para precipitar o ácido nucléico. O tubo foi mantido a -10°C por 30 minutos. O material foi centrifugado à temperatura ambiente (12.000 rpm por 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e ao sedimento foi adicionado 1 mL de etanol 70 %. Após 30 minutos a -20°C, o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Após a total evaporação do etanol, o sedimento foi redissolvido em 100µL de tampão (T.E.) e o DNA foi estocado a - 4°C (104).

A concentração de DNA foi determinada espectofotometricamente a 260nm, onde a concentração de DNA (µg/mL) = DO260 x diluição x 50 e a relação DO260/DO280 foi utilizada para a determinação do grau de pureza do DNA.

3.6.2 Reação de PCR

A reação de PCR foi realizada em termociclador (Gene Amp PCR System 9700). A enzima *Taq* DNA Polimerase, o tampão para PCR (PCR buffer minus Mg-10X) e o cloreto de magnésio foram de procedência Gibco/BRL (Life Technologies). Soluções-estoque dos desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), também de procedência Gibco/BRL, foram misturadas em quantidade equimolares para uma concentração final de 25mM.

Para a amplificação dos genes *algD* e *algU*, os reagentes foram misturados em tubos de microcentrífuga tipo “eppendorf” com capacidade para 0,2 mL, esterilizados, da seguinte forma: 2 µL das preparações de DNA, 45 µl de solução contendo 0,1 mM de cada desoxinucleotídeo, 0,75 mM de MgCl₂, 5µL de tampão para PCR (10X), 0,1 µM de cada “primer” e 1 U de *Taq* DNA-polimerase em tampão; utilizados nas mesmas concentrações para amplificação dos genes *algD* e *algU*.

Os dNTPs, o DNA genômico, o tampão para PCR (10X) e o cloreto de magnésio foram sempre mantidos em banho de gelo. A enzima Taq DNA polimerase foi mantida a -20°C até o uso.

As misturas foram aquecidas a 94°C por 5 min e resfriados a 25°C por 10 min antes da adição da enzima Taq DNA polimerase. Após a adição da enzima, os conteúdos dos tubos foram rapidamente misturados e colocados na máquina de termociclagem. A reação foi realizada como descrito na tabela 1.

Tabela 1: Condições da reação de PCR para os genes *algD* e *algU*.

Gene	Denaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final
Alg D	94°C	55°C	72°C	72°C
	30 seg	30 seg	30 seg	10 min
	30 ciclos			
Alg U	94°C	59°C	72°C	72°C
	30 seg	30 seg	1 min	10 min
	30 ciclos			

Ao final dos ciclos, os tubos de reações foram mantidos a 4°C e os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%. Aproximadamente 10 μL de cada reação de PCR foram adicionados por canaleta e o tamanho dos fragmentos de DNA nas amostras foram comparados com aqueles dos marcadores de peso molecular de 100 pb DNA Ladder - Promega. A reação de PCR foi feita utilizando os primers descritos na tabela 2.

Tabela 2: Primers utilizados na amplificação dos genes *algD* e *algU*.

Genes	Primers (5'→3')		Produto	Ref:
Alg D	AAGGCGGAAATGCCATCTCC	AGGGAAGTTCCGGCCGTTTG	300 pb	129
Alg U	CGCGAACCGCACCATCGCTC	GCCGCACGTCACGAGC	1500 pb	108

3.6.3 Eletroforese de DNA em gel de agarose

O DNA foi visualizado através do sistema de eletroforese horizontal com gel de agarose submerso. A concentração do gel de agarose foi de 1,5%. A agarose foi fundida em tampão TEB 1X (solução estoque TEB 10X – 0,1 M Tris; 0,1 M ácido bórico; 2nM EDTA pH 8,0), sendo o mesmo tampão utilizado para as corridas eletroforéticas.

As reações de PCR foram misturadas com tampão de ressuspensão 6X (ficoll 400 - 15%; azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol FF 0,25%) e aplicadas nas canaletas. As corridas eletroforéticas foram feitas a 100 volts, 400mA, com duração de 1 hora e 30 min (104).

Após o término da corrida, o gel foi transferido para uma cuba contendo solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e a visualização de bandas foi feita em transluminador de luz ultravioleta. Os géis foram fotografados com filme preto e branco ASA 100 Kodak e filme de revelação instantânea ASA 600 Polaroid, com auxílio de filtro vermelho.

4. Resultados

Entre as 120 cepas de *P. aeruginosa* testadas, 62 (51,7%) foram positivas para produção de hemolisina, 60 (50,0%) foram produtoras de gelatinase, e 83 (69,1%) mostraram-se produtoras de elastase. A microhemaglutinação demonstrou que 9 cepas (7,5%) aglutinaram hemáceas humanas, 11 (8,5%) aglutinaram hemáceas de carneiro, 6 (4,7%) aglutinaram hemáceas de cavalo, 8 (6,7%) aglutinaram hemáceas de boi e 8 (6,7%) aglutinaram hemáceas de cobaia. Todas elas (100%) apresentaram, através da técnica de PCR, o gene *algD* e 30 (25,0%) o gene *algU*. Esses resultados estão detalhados a seguir e resumidos nas tabelas 3 e 4.

4.1 Produção de Hemolisina

As amostras bacterianas foram agrupadas em mucóides, não mucóides e de outros casos clínicos. Analisando a tabela 3 é possível observar a frequência de amostras bacterianas produtoras de hemolisina, bem como realizar um estudo comparativo entre os três grupos de bactérias. Observamos que a frequência de amostras produtoras de hemolisina encontrada nesses grupos é semelhante. Entre as cepas não mucóides (40 cepas), 22 foram positivas para expressão de hemolisina (55,0%), enquanto entre as 40 cepas mucóides, 21 mostraram-se produtoras de hemolisina, o que corresponde a 52,5%. Um total de 19 (47,5%) das cepas isoladas de pacientes não portadores de FC produziram hemolisina.

4.2 Produção de Gelatinase

A capacidade das cepas bacterianas de *P. aeruginosa* para produzir proteinase foi verificada através do teste de liquefação da gelatina como descrito no item 3.3.

Na tabela 3 podemos verificar a produção de gelatinase pelos diferentes grupos bacterianos. Entre as cepas não mucóides, 23 delas produziram gelatinase, correspondendo a 57,5%, enquanto entre as 40 cepas mucóides, 15 foram produtoras de gelatinase, o que corresponde a 37,5%. No grupo de amostras isoladas de pacientes não portadores de FC, 22 cepas (55,0%) entre as 40 amostras testadas demonstraram capacidade para produzir gelatinase.

4.3 Produção de Elastase

A capacidade bacteriana para produzir elastase foi analisada nas 120 amostras de *P. aeruginosa*.

Na tabela 3, verificamos que 32 das 40 amostras não mucóides analisadas produziram elastase, o que representa 80% de todas as cepas desse grupo. Nessa tabela estão apresentados os resultados obtidos com as cepas do morfotipo mucóide. Nesse grupo, verificamos que 18 cepas se mostram positivas, correspondendo a 45% do total de amostras. Entre as amostras isoladas de pacientes não fibrocísticos, 82,5% foram produtoras de elastase (33 cepas no total de 40).

4.4 Hemaglutinação

Para detectar amostras de *P. aeruginosa* apresentando pili foram feitos ensaios de microhemaglutinação na presença e ausência de manose. Os resultados obtidos podem ser verificados nas tabelas 6, 7, e 8.

Entre as cepas de *P. aeruginosa* não mucóides isoladas de FC, observamos que 2 hemaglutinaram hemáceas humanas, 4 hemaglutinaram hemáceas de carneiro e outras 4 hemáceas de cavalo, todas na presença de manose. A hemaglutinação de hemáceas bovinas foi verificada em 5 cepas, 2 na ausência de manose, 1 na presença de manose e 2 na presença e ausência de manose. A reação com hemáceas de cobaia também foi observada com 5 amostras, sendo que 3 aglutinaram apenas na presença de manose, 1 na presença e ausência de manose e 1 na ausência desse açúcar.

Entre as cepas de *P. aeruginosa* com morfotipo mucóide observamos que 3 delas aglutinaram hemáceas humanas e 2 cepas aglutinaram hemáceas de carneiro na presença de manose. Um total de 5 cepas aglutinaram hemáceas bovinas, 2 na ausência de manose e 3 na ausência e presença de manose, enquanto outras 5 amostras reagiram com hemáceas de cobaia, 2 quando manose estava presente e 3 apenas com PBS. Não houve aglutinação com hemáceas de cavalo.

Através da tabela 8, podemos verificar que 5 amostras isoladas de pacientes não portadores de FC aglutinaram hemáceas humanas, todas elas na ausência de manose. Apenas 1 amostra aglutinou hemácea de carneiro, tanto na presença como na ausência de manose; enquanto 2 aglutinaram hemácea de cavalo apenas na presença de manose. Um total de 3 amostras aglutinaram hemáceas bovinas, 1 com manose, 1 apenas com PBS e 1 com PBS e manose. O maior número de cepas (8 delas) aglutinou com hemáceas de cobaia, sendo que 2 mostraram-se positivas apenas na presença de manose e 4 apenas na ausência de manose.

4.5 Detecção do gene *algD*

Uma análise genotípica foi realizada para identificar a presença do gene *algD* em todas as amostras estudadas. Na tabela 4 podemos verificar que todas as cepas de *P. aeruginosa* obtidas de pacientes com FC (com morfotipo mucóide e não mucóide) possuem este gene (fragmento de 300 pb), assim com todas as amostras obtidas de outros casos clínicos.

Na figura 1 pode-se observar o perfil eletroforético da amplificação do gene *algD* de algumas amostras escolhidas ao acaso.

4.6 Detecção do gene *algU*

O PCR para o gene *algU* foi realizado como descrito no item 3.6. De 40 amostras não mucóides, 11 (27,5%) apresentaram reação positiva neste ensaio. Entre as cepas com morfotipo mucóide, 10 delas mostraram-se positivas (25,0%). As amostras isoladas de

pacientes não portadores de FC também apresentaram resultado similar, onde apenas 9 cepas (22,5%), entre as 40 estudadas, foram positivas para tal gene.

A figura 2 apresenta o resultado da eletroforese do produto do PCR de amostras positivas quando utilizamos “primers” para o *algU*. Podemos observar que o produto da amplificação apresenta 1,5 kb.

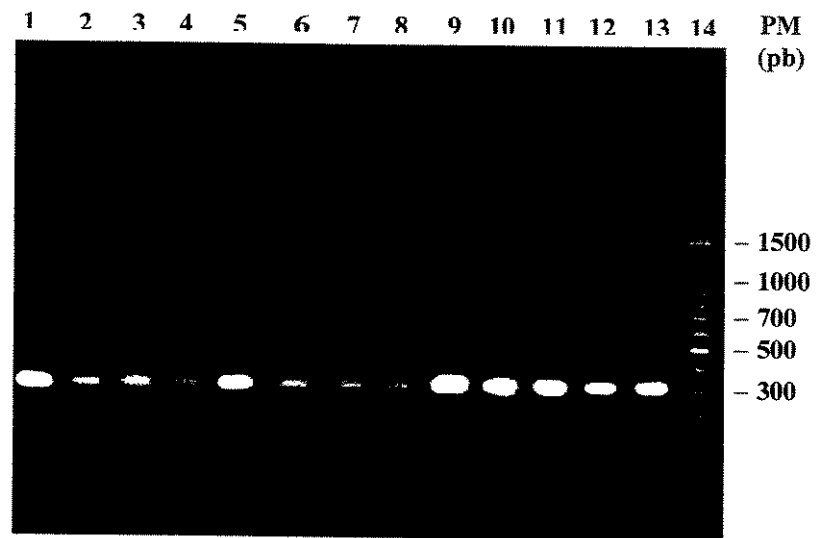


Figura 1 - PCR de linhagens de *P. aeruginosa* amplificadas com o “primer” para algD.

- | | |
|------------|------------------------------------|
| 1. 254e NM | 8. 264 M |
| 2. 255 NM | 9. 193c sec |
| 3. 264e NM | 10. 815a sec |
| 4. 31c NM | 11. 337 sa |
| 5. 254e M | 12. 407 sa |
| 6. 28a M | 13. PA1802 |
| 7. 260 M | 14. Peso molecular (escala 100 pb) |

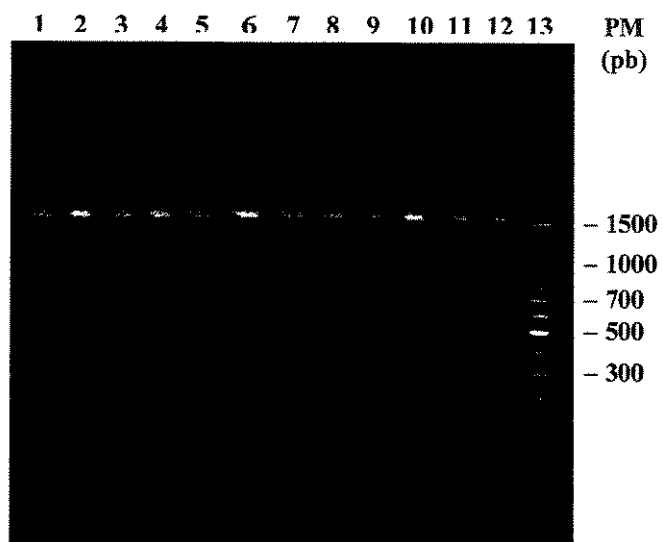


Figura 2 - PCR de linhagens de *P. aeruginosa* amplificadas com o *primer* para algU.

1. 254e NM

7. 264e M

2. 255 NM

8. 1086j sec

3. 257 NM

9. 70a sec

4. 254e M

10. 114c sec

5. 52f M

11. 110a sa

6. 43a M

12. PA1802

13. Peso molecular (escala 100 pb)

Tabela 3: Percentagem e Frequência das exoenzimas (hemolisina, gelatinase e elastase) produzidas por linhagens de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes portadores e não portadores de FC.

Linhagens	Hemolisina	Gelatinase	Elastase
Mucóides	52,5 % (21)	37,5 % (15)	45,0 % (18)
Não-mucóides	55,0 % (22)	57,5 % (23)	80,0 % (32)
Outros	47,5 % (19)	55,0 % (22)	82,5 % (33)

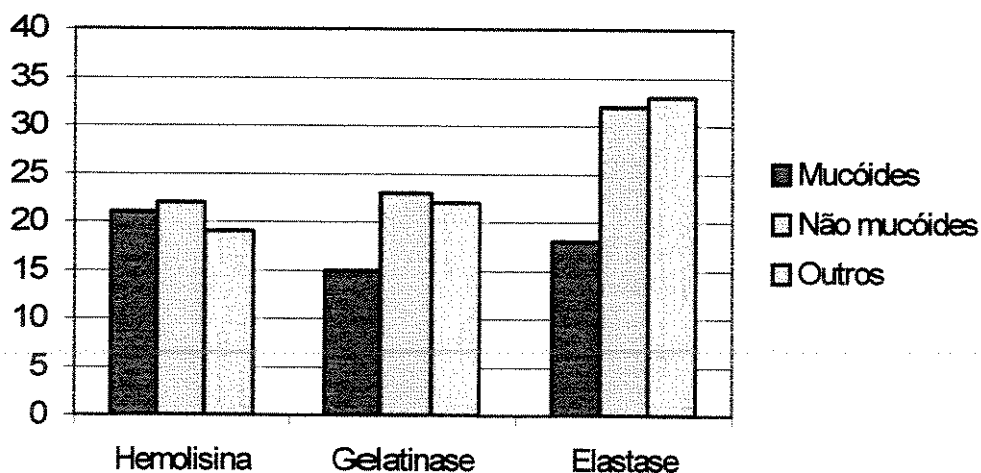


Gráfico 1 - Frequência das exoenzimas (hemolisina, gelatinase e elastase) em amostras de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes portadores e não portadores de FC.

Tabela 4: Percentagem e Frequência dos genes *algD* e *algU* encontrada em linhagens de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes portadores e não portadores de FC.

Linhagens	AlgD	AlgU
Mucóides	100 % (40)	25,0 % (10)
Não-mucóides	100 % (40)	27,5% (11)
Outros	100 % (40)	22,5% (9)

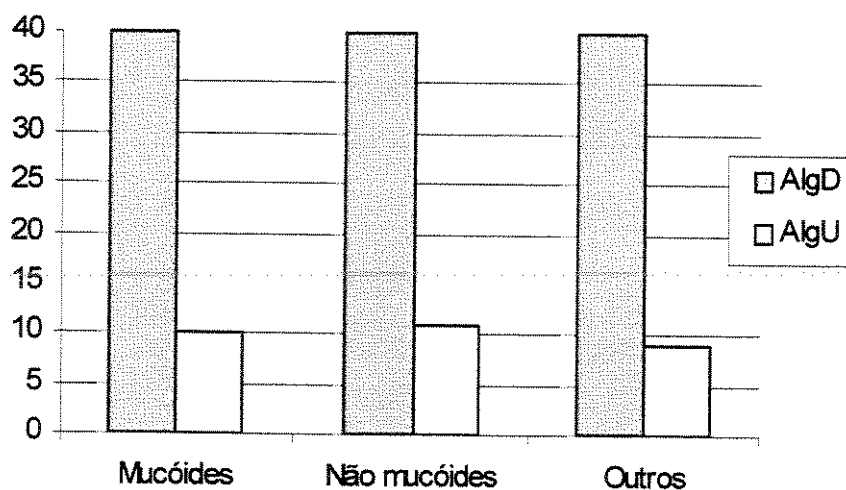


Gráfico 2 - Frequência dos genes *algD* e *algU* encontrada em linhagens de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes portadores e não portadores de FC.

4.7 Descrição dos grupos bacterianos e suas principais características fenotípicas

4.7.1 Amostras não mucóides de *P. aeruginosa*

Entre as 40 amostras não mucóides de FC, observamos que 15 delas (257 NM, 258 NM, 259 NM, 261a NM, 268f NM, 270b NM, 35b NM, 55f NM, 40c NM, 43b NM, 31c NM, 19d NM, 275 NM, 282 NM, 60 NM) mostraram-se produtoras de hemolisina, gelatinase e elastase, enquanto apenas 3 (266a a NM, 09 NM e 58c NM) não se mostraram positivas para produção de nenhuma das enzimas. Observamos também que 9 amostras (252d NM, 255 NM, 262, NM, 263d NM, 264e NM, 21b NM, 58d NM, 42c NM e 272 NM), embora não produtoras de hemolisina e protease, expressaram elastase, contudo apenas 2 (22b NM e 36c NM) inversamente não expressaram elastase, mas são positivas para gelatinase e hemolisina. Quatro cepas (273e NM, 06 NM, 36 NM e 270 NM) produziram elastase e protease, 4 (250e NM, 254e NM, 256 NM e 265d NM) foram negativas para gelatinase, produzindo elastase e hemolisina, 2 (12 NM e 28c NM) foram produtoras apenas de gelatinase e a cepa 63b NM foi produtora apenas de hemolisina.

A tabela 6 mostra que 12 cepas NM (250e NM, 261a NM, 262e NM, 262d NM, 263d NM, 264e NM, 270b NM, 09 NM, 12 NM, 21b NM, 42c NM, 58c NM e 272 NM) hemaglutinaram um ou mais tipos de hemáceas. Podemos também observar que nenhuma dessas cepas hemaglutinaram com todos os tipos de hemáceas testadas.

Nesse grupo de amostras, 11 cepas (255 NM, 257 NM, 263d NM, 264e NM, 43b NM, 21b NM, 36c NM, 31c NM, 270 NM e 42e NM) apresentaram reação positiva no PCR realizado com o gene *algU*.

4.7.2 Amostras mucóides de *P. aeruginosa*

Entre as 40 cepas mucóides de FC, observamos que 9 delas não produziram nenhuma das enzimas (28a M, 255 M, 42d M, 41e M, 42f M, 19c M, 52f M, 268e M e 38 M). Dentre as demais, 8 linhagens (49e M, 62a M, 69d M, 276e M, 40a M, 272 M, 272d M e 54f M), inversamente, produziram hemolisina, gelatinase e elastase. Outras cepas (254e

M, 57f M, 261c M, 263e M, 265c M e 273a M) produziram hemolisina e elastase, e foram negativas para produção de gelatinase, enquanto 4 cepas (61c M, 57h M, 50b M e 55a M) produziram apenas gelatinase. As amostras (253 M, 264 M e 58d M e 266 b M) produziram apenas elastase, enquanto outras 3 cepas (23a M, 15b M e 18b M) produziram hemolisina e gelatinase, e mostraram-se negativas para produção de elastase. Um total de 5 amostras (63c M, 17a M, 42c M, 260 M e 68a M) produziram apenas hemolisina e, apenas a amostra 15a M não foi produtora desta enzima.

Através dos ensaios de microhemaglutinação, observamos que 12 cepas (61c M, 42c M, 28a, 255 M, 41e M, 49e M, 261c M, 265c M, 23a M, 57h M, 50b M e 272d M) hemaglutinaram algum tipo de hemácea (com exceção das hemáceas de cavalo).

Algumas cepas possuem o gene *algU*, visto através do PCR. São as cepas (254e M, 28a M, 255 M, 42d M, 42f M, 260 M, 264 M, 40a M, 18b M e 266b M).

4.7.3 Amostras isoladas de pacientes não portadores de FC

No grupo de amostras isoladas de pacientes não portadores de FC, verificamos que 14 amostras (1085a sec, 1086j sec, 1491a sec, 1563 sec, 126-1 sa, 290-1 sa, 292 sa, 337 sa, 407 sa, 429 sa, 70b sec, 1012e sec, 1290b sec e 253b sec) são produtoras das exoenzimas hemolisina, protease e elastase, e apenas 3 amostras (61a sec, 2625c sec e 110a sa) não expressaram nenhuma das enzimas. Onze cepas foram produtoras apenas de elastase (193c sec, 70a sec, 114c sec, 1027a sec, 1457 sec, 1521c sec, 1543a sec, 1577 sec, 1943a sec, 1422a sec e 124-37 sa), enquanto apenas 1 (1529 sec) mostrou-se negativa para produção de elastase mas, continuam expressando hemolisina e protease. Quatro cepas (164c sec, 1530c sec, 815a sec, 1426d) além da produção de elastase também produziram hemolisina, mas não demonstraram capacidade para hidrolisar gelatina. Três amostras (126-2sa, 464a sec e 1021 uri) só expressaram gelatinase e 4 cepas (1086a sec, 2656a sec, 124-35 sa e 291 sa) não produziram hemolisina.

Entre as 40 cepas isoladas de pacientes não portadores de FC, observamos que 12 cepas (1422a sec, 1426d sec, 253b sec, 464a sec, 126-91 sa, 126-92 sa, 291 sa, 292 sa, 337

sa, 1086a sec, 1577 sec e 1943a sec) hemaglutinaram algum tipo hemácea, com exceção do hemácea de cavalo.

No que tange a presença do gene *algU*, observamos que 9 cepas (193c sec, 70a sec, 114c sec, 1086j sec, 1491a sec, 1521c sec, 815a sec, 2625c sec e 110a sa) foram positivas neste experimento.

Tabela 5: Frequência e Percentagem das cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com FC e outros casos clínicos que apresentaram reação positiva ou negativa para uma ou mais exoenzimas.

Amostras	Não mucóides	Mucóides	Outros	Total
Hemol./Gelatin./Elast.(+)	15 (37,5%)	8 (20%)	14 (35%)	37 (30,8%)
Hemol./Gelatin./Elast.(-)	3 (7,5%)	9 (22,5%)	3 (7,5%)	15 (12,5%)
Hemol (+) Gelatin./Elast. (-)	1 (2,5%)	5 (12,5%)	0 (0%)	6 (5%)
Hemol. (-)Gelatin./Elast. (+)	4 (10%)	1 (2,5%)	4 (10%)	9 (7,5%)
Gelatin. (+) Hemol./Elast.(-)	2 (5%)	4 (10%)	3 (7,5%)	9 (7,5%)
Gelatin. (-) Hemol./Elast.(+)	4 (10%)	6 (15%)	4 (10%)	14 (11,7%)
Elast. (+) Hemol./Gelatin. (-)	9 (22,5%)	4 (10%)	11 (27,5%)	24 (20%)
Elast. (-)Hemol./Gelatin. (+)	2 (5%)	3 (7,5%)	1 (2,5%)	6 (5%)

(+) - produção de uma ou mais exoenzimas

(-) - não houve produção de uma ou mais exoenzimas

4.8 Análise Estatística através do teste de χ^2

A análise estatística, através do teste de χ^2 , foi realizada com os três grupos bacterianos (mucóide, não mucóide e outros casos) com o objetivo de verificar se esses grupos eram semelhantes ou não quanto à presença das exoenzimas hemolisina, gelatinase e elastase. O grau de liberdade foi igual a 2 e os resultados comparados ao nível de significância (α) de 1% ($p = 0,01$).

Tabela 6: Fatores de virulência em amostras de *P. aeruginosa* não mucóides (NM) isoladas de fibrose cística.

Amostras	Hemolisina	Gelatinase	Elastase	AlgD	AlgU	Hemaglutinação				
						humano	carneiro	cavalo	boi	cobaia
63 b NM	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
273 e NM	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
250 e NM	+	-	+	+	-	-	-	-	(1:16) SM	-
252 d NM	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
254 e NM	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
255 NM	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
256 NM	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
257 NM	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
258 NM	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
259 NM	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
261 a NM	+	+	+	+	-	(1:8) M	(1:8) M	(1:8) M	-	-
262 e NM	-	-	+	+	-	(1:4) M	-	(1:8) M	-	-
263 d NM	-	-	+	+	+	-	-	-	-	(1:4) M
264 e NM	-	-	+	+	+	-	-	(1:8) M	-	-
265d NM	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
266 a NM	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
268 f NM	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
55f NM	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
270 b NM	+	+	+	+	+	-	(1:16) M	(1:8) M	-	(1:8) M
06 NM	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-

(1:4), (1:8), (1:16): título da maior diluição que apresentou reação positiva

M: hemaglutinação na presença de manose.

SM: hemaglutinação na ausência de manose, apenas com PBS.

Tabela 6: continuação

Amostras	Hemolisina	Gelatinase	Elastase	AlgD	AlgU	Hemaglutinação				
						humano	carneiro	cavalo	boi	cobaia
09 NM	-	-	-	+	-	-	-	-	(1:8) SM	(1:4) SM
12 NM	-	+	-	+	-	-	(1:8) M	-	-	(1:8) SM (1:4) M
43 b NM	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
21 b NM	-	-	+	+	+	-	(1:4) M	-	-	-
22 b NM	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
28 c NM	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
36 c NM	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
31 c NM	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
19 d NM	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
36 d NM	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
58 d NM	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
270 NM	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
275 NM	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
282 NM	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
60 NM	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
42 e NM	-	-	+	+	+	-	-	-	(1:16) SM (1:4) M	-
58 c NM	-	-	-	+	-	-	-	-	(1:16) SM (1:4) M	-
40 c NM	+	+	+	+	-	-	-	-	(1:16) SM (1:4) M	-
272 NM	-	-	+	+	-	-	-	-	(1:16) M	(1:4) M
35 b NM	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

(1:4), (1:8), (1:16): título da maior diluição que apresentou reação positiva

M: hemaglutinação na presença de manose.

SM: hemaglutinação na ausência de manose, apenas com PBS.

Tabela 7: Fatores de virulência em amostras de *P. aeruginosa* mucóides (M) isoladas de fibrose cística.

Amostras	Hemolisina	Gelatinase	Elastase	AlgD	AlgU	Hemaglutinação				
						humano	carneiro	cavalo	boi	cobala
63 c M	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
61 c M	-	+	-	+	-	-	-	-	(1:16)SM (1:4)M	-
17 a M	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
254 e M	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
42 c M	+	-	-	+	-	-	-	-	(1:16)SM (1:8) M	-
57 f M	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
253 M	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
28 a M	-	-	-	+	+	-	-	-	-	(1:8) M
255 M	-	-	-	+	+	(1:8) M	-	-	-	-
42 d M	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
41 c M	-	-	-	+	-	-	-	-	(1:4) SM	-
49 e M	+	+	+	+	-	-	-	-	(1:4)SM (1:8M)	-
42 f M	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
19 c M	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
260 M	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
62 a M	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
69 d M	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
263 e M	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
261 c M	+	-	+	+	-	(1:8) M	(1:8) M	-	(1:4) SM	-
266 b M	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-

(1:4), (1:8), (1:16): título da maior diluição que apresentou reação positiva

M: hemaglutinação na presença de manose.

SM: hemaglutinação na ausência de manose, apenas com PBS

Tabela 7: continuação

Amostras	Hemolisina	Gelatinase	Elastase	AlgD	AlgU	Hemaglutinação			
						humano	carneiro	cavalo	boi
54f M	-	-	-	+	-	-	-	-	-
264 M	-	-	+	+	+	-	-	-	-
52 f M	-	-	-	+	-	-	-	-	-
265 c M	+	-	+	+	-	(1:4) M	(1:4) M	-	-
276 c M	+	+	+	+	-	-	-	-	-
23 a M	+	+	-	+	-	-	-	-	(1:8) M
40 a M	+	+	+	+	+	-	-	-	-
268 c M	-	-	-	+	-	-	-	-	-
273 a M	+	-	+	+	-	-	-	-	-
272 M	+	+	+	+	-	-	-	-	-
38 M	-	-	-	+	-	-	-	-	-
15 a M	-	+	+	+	-	-	-	-	-
15 b M	+	+	-	+	-	-	-	-	-
18 b M	+	+	-	+	+	-	-	-	-
58 d M	-	-	+	+	-	-	-	-	-
57 h M	-	+	-	+	-	-	-	-	(1:8) SM
50 b M	-	+	-	+	-	-	-	-	(1:4) SM
68 a M	+	-	-	+	-	-	-	-	-
55 a M	-	+	-	+	-	-	-	-	-
272 d M	+	+	+	+	-	-	-	-	(1:4) SM

(1:4), (1:8), (1:16): título da maior diluição que apresentou reação positiva

M: hemaglutinação na presença de manose.

SM: hemaglutinação na ausência de manose, apenas com PBS

Tabela 8: Fatores de virulência em amostras de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes não portadores de FC.

Amostras	Hemolisina	Gelatinase	Elastase	AlgD	AlgU	Hemaglutinação				
						humano	carneiro	cavalo	boi	cobaia
61 a sec	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
193 c sec	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
70 a sec	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
114 c sec	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
164 c sec	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
1027 a sec	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
1085 a sec	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1086 a sec	-	+	+	+	-	(1:8) SM	-	-	-	-
1086 j sec	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
1491 a sec	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
1457 sec	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
1521 c sec	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
1530 c sec	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
1543 a sec	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
1563 sec	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1577 sec	-	-	+	+	-	-	-	-	-	(1:8) SM
815 a sec	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
1943 a sec	-	-	+	+	-	-	-	-	-	(1:4) SM
2625 c sec	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
2656 a sec	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-

(1:4), (1:8), (1:16): título da maior diluição que apresentou reação positiva

M: hemaglutinação na presença de manose.

SM: hemaglutinação na ausência de manose, apenas com PBS

sec: secreção

Tabela 8: continuação

Amostras	Hemolisina	Gelatinase	Elastase	AlgD	AlgU	Hemaglutinação			
						humano	carneiro	cavalo	boi
1422 a sec	-	-	+	+	-	-	(1:8)M	(1:8) M	(1:4) M
1426 d sec	+	-	+	+	-	(1:4)SM	(1:8)SM	(1:8) M	(1:4)M
070 b sec	+	+	+	+	-	-	-	-	(1:4)SM
253 b sec	+	+	+	+	-	-	-	-	-
464 a sec	-	+	-	+	-	-	-	-	(1:4) SM
1012e sec	+	+	+	+	-	(1:8) SM	-	-	-
1290b sec	+	+	+	+	-	-	-	-	-
1529 f sec	+	+	+	+	-	-	-	-	-
1021 uri	-	+	-	+	-	-	-	-	-
110 a sa	-	-	-	+	+	-	-	-	-
124(35)sa	-	+	+	+	+	-	-	-	-
124(37)sa	-	-	+	+	-	-	-	-	-
126(91)sa	+	+	+	+	-	-	-	-	-
126(92)sa	-	+	-	+	-	(1:4) SM	-	-	-
290-1 sa	+	+	+	+	-	-	-	-	(1:4) SM
291 sa	-	+	+	+	-	-	-	-	-
292 sa	+	+	+	+	-	(1:4) SM	-	-	(1:4)M
337 sa	+	+	+	+	-	-	-	-	(1:4)SM
407 sa	+	+	+	+	-	-	-	-	(1:4) M
429 san	+	+	+	+	-	-	-	-	-

(1:4), (1:8), (1:16): título da maior diluição que apresentou reação positiva

M: hemaglutinação na presença de manose.

SM: hemaglutinação na ausência de manose, apenas com PBS.

sa: sangue

sec: secreção

5. Discussão

A virulência de *P. aeruginosa* é um processo multifatorial que envolve bactéria e hospedeiro. A interação entre eles contribui para o largo espectro de doenças causadas por este microrganismo, desde a colonização, podendo ainda se observar infecção aguda em vítimas de queimadura, em pacientes neutropênicos com infecção crônica e no pulmão de pacientes com fibrose cística.

P. aeruginosa elabora um grande número de exoenzimas, incluindo enzimas proteolíticas (elastase e protease alcalina), hemolisina, exotoxina A e exoenzima S, além de fatores de colonização e cápsula de alginato, os quais, são determinantes na infecção causada por este microrganismo.

A produção de hemolisina aparece como importante determinante de virulência entre as cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, nas quais propicia o aumento da capacidade para provocar lesão e colonização do tecido pulmonar (Liu et al., 1979 e Southern et al., 1970).

Berka et al., (1981), realizou um estudo comparativo entre linhagens de *P. aeruginosa* de diferentes origens (10 cepas isoladas de pacientes com fibrose cística, onde 5 amostras possuíam morfotipo mucóides e 5 não mucóides e 18 cepas de outros casos clínicos), analisando a produção de hemolisina. Esses autores verificaram grande frequência de produção dessa enzima entre as linhagens isoladas de *P. aeruginosa* não mucóides (80%). Entre as cepas mucóides obtidas de FC, 20% produziram hemolisina e 45,8% dos outros isolados também foram positivos para esse caráter. Woods et al. (1986), estudando 132 cepas de *P. aeruginosa* de diversas origens (feridas, queimadura, urina, fibrose cística, pneumonia aguda e sangue) observou que cepas de *P. aeruginosa* produziram hemo lisina (Fosfolipase C) em grande frequência. Posteriormente, Majtán et al.

1991, relatou que entre 218 cepas de *P. aeruginosa* isoladas de diferentes quadros clínicos, 56,96% delas apresentaram atividade hemolítica.

Os nossos resultados, demonstram que dentre 120 cepas estudadas, 62 (51,7%) foram produtoras de hemolisina. Entre as cepas mucóides isoladas de FC detectamos 21 cepas (52,5%), entre as cepas não mucóides isoladas de FC observamos 22 (55,0%), e nas cepas isoladas de pacientes não fibrocísticos 19 (47,5%). Quando estes resultados foram tratados estatisticamente verificamos que as diferenças observadas entre os grupos de cepas quanto à produção de hemolisina não foram significativas ($p < 0,01$).

Com relação as cepas não mucóides e mucóides, nossos resultados diferem dos relatados por Berka et al., (1981), contudo, observamos semelhança de resultados para o grupo de amostras originadas de outros casos clínicos. Para este último grupo de cepas, Majtán et al. 1991 descreveu que 56,96% das cepas estudadas produziram hemolisina, resultado este superior ao observado por nós para o mesmo grupo de cepas.

Assim, o estudo da produção de hemolisina como um fator de virulência em potencial para a *P. aeruginosa* deve ser conduzido com cautela, visto que um grande número de cepas e de diferentes origens possuem este fenótipo.

Algumas bactérias são capazes de produzir a enzima gelatinase, a qual hidrolisa a proteína em aminoácidos. Esses aminoácidos podem ser transportados dentro da célula bacteriana favorecendo o seu metabolismo. A hidrólise da gelatina tem sido associada à patogenicidade em alguns microrganismos. Acredita-se que bactérias patogênicas podem quebrar os arranjos celulares, destruindo os tecidos e espalhando-se por tecidos adjacentes.

Sheehan et al. 1982, descreveu que entre 25 cepas de *P. aeruginosa* isoladas de diferentes quadros clínicos, 48% delas apresentaram a característica de liquefazer a gelatina. Mais recentemente, Majtán et al. 1991, relatou que entre 270 cepas de diferentes origens clínicas, 95,16% foram gelatinase positiva.

No nosso estudo, verificamos que dentre 120 cepas estudadas, 50% apresentaram a capacidade de liquefazer a gelatina. Entre as cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com FC, observamos a produção de gelatinase numa frequência maior entre as cepas com morfotipo não mucóide (57,5%) em relação ao morfotipo mucóide (37,5%). O mesmo

aconteceu com as amostras isoladas de pacientes não portadores de FC, onde se observou uma frequência de 55,0% para produção de gelatinase, resultado este, semelhante àquela encontrada no grupo de amostras não mucóides. Entretanto, quando estes resultados foram tratados estatisticamente verificamos que as diferenças observadas entre os grupos de cepas quanto à produção de gelatinase não foram significativas ($p < 0,01$).

As cepas não mucóides, provavelmente, necessitam de um maior arsenal enzimático para degradar tecidos, colonizar o pulmão e estabelecer infecção. Estes resultados eram esperados, já que a capacidade para degradar proteínas é fundamental na fase de colonização e adaptação do microrganismo ao tecido do hospedeiro, apresentando assim, maior capacidade de invadir tecidos e provocar bacteremia (Woods et al. 1986). Entretanto, nossos resultados demonstram que algumas cepas mucóides continuam expressando gelatinase, o que pode ser de grande utilidade para manutenção e sobrevivência da bactéria no pulmão.

A elastina é um dos principais componentes do pulmão, daí a importância de estudarmos a capacidade das cepas bacterianas para expressar a exoenzima elastase. Sheehan et al. 1982 observou que, entre 25 cepas isoladas de espécimes clínicos, 28% foram positivas para essa enzima. Majtán et al. 1991, relatou que entre 259 cepas de *P. aeruginosa* isoladas de diferentes quadro clínicos somente 17,1% apresentaram atividade elastolítica.

Os nossos resultados mais uma vez demonstram a grande frequência de expressão dos fatores de virulência em cepas de *P. aeruginosa* com morfotipo não mucóide. Neste grupo de amostras, a grande maioria foi produtora de elastase (80%). Entre as cepas de outros casos clínicos, também observamos uma grande frequência de amostras produtoras de elastase. Quando estes resultados foram tratados estatisticamente, verificamos que as diferenças observadas entre os grupos de cepas quanto à produção de elastase foram significativas ($p > 0,01$).

Como elastina é encontrada nos tecidos e vasos, as cepas que estão em contato com sangue e tecidos demonstram grande produção dessa enzima. Isto é verificado através dos nossos resultados, onde a maioria das cepas (82,5%) de pacientes não fibrocísticos

mostram-se positivas para elastase. Woods et al. 1986, demonstram que altos níveis de elastase foram produzidos por linhagens de *P. aeruginosa* de origem pulmonar, quando comparados àqueles resultados obtidos de cepas isoladas de outros sítios de infecção.

Através dos resultados, podemos observar que as reações de hemaglutinação ocorreram com diversas cepas, contudo, essas hemaglutinações não foram homogêneas, ou seja, as reações observadas não apresentaram um padrão de hemaglutinação. Esperávamos que as cepas hemaglutinantes para qualquer eritrócito reagissem independentemente da presença ou ausência de D-manose. Isso foi observado para algumas cepas frente a hemáceas bovinas, assim com frente a hemáceas de cobaia. Entretanto, outras cepas reagiram com eritrócitos bovinos e de cobaia somente na ausência da manose. Outras cepas ainda, só aglutinaram diferentes hemáceas na presença de D-manose, sugerindo que este açúcar estaria participando ou permitindo a interação bactéria-hemácea.

Entre as cepas isoladas de diferentes infecções, destacamos que algumas cepas hemaglutinaram somente eritrócitos humanos na ausência da manose. Outras cepas hemaglutinam hemáceas bovinas e um terceiro grupo reagiu com pelo menos 3 eritrócitos diferentes deste grupo, tanto na presença da manose, como na ausência. Isto acontece para todos os grupos bacterianos e para todos os tipos de hemáceas estudadas, sugerindo que o método utilizado não é apropriado para detectar presença de pili em *P. aeruginosa*. No trabalho de Khedhir & Jorany, 1997, 8 cepas de *P. aeruginosa* obtidas de isolados clínicos foram analisadas frente a vários tipos de hemáceas, entre elas, hemáceas humanas, hemáceas de boi, de carneiro e de cobaia, que também foram incluídas no nosso trabalho. Entre as 8 cepas, 2 hemaglutinaram com hemáceas humanas (uma na presença de manose e outra na ausência). A hemaglutinação com hemáceas de cobaia e de carneiro demonstrou que apenas uma cepa aglutinou com os dois tipos de hemácea quando manose estava presente e nenhuma amostra aglutinou com hemáceas de boi. Esses resultados são semelhantes àqueles encontrados em nosso trabalho.

Através da análise do PCR para o *algD*, observamos que todas as cepas possuem este gene. Entretanto, sabemos que um “operon” composto por vários genes estão envolvidos na expressão da cápsula de alginato e, que o primeiro gene biossintético é o

algD, e por isso tem sido o mais estudado. Nesse “*operon*” são conhecidos quatro genes, os quais regulam a transcrição do gene *algD*. Os nossos trabalhos avaliaram a presença de um destes genes, o *algU*, que é de extrema importância para existência do fenótipo mucóide (109).

Os resultados obtidos através do PCR para o gene regulatório *algU* demonstraram que este gene, embora participante do processo regulatório para gerar a cápsula em cepas de *P. aeruginosa*, como visto nos trabalhos de Wozniak & Ohman, 1994, pode não ser fundamental na síntese de alginato. Esta observação foi por nós confirmada, uma vez que algumas cepas (10) com morfotipo mucóide possuem o *algU* (25,0%) e portanto têm a transcrição do gene *algD* regulada por tal gene. Outras cepas com o mesmo morfotipo mostraram-se, contudo, negativas para a presença do *algU*, levando-nos a supor que os genes *algR*, *algP* e *algB* devem estar envolvidos nesse processo, como observado por Selvaraj et al., 1998. Além disso, um outro mecanismo que pode explicar estes resultados é um polimorfismo na sequência do gene *algU* na região de anelamento ao “*primer*”. Nesse caso, o anelamento seria estável apenas nas sequências perfeitamente homólogas.

Algumas cepas não mucóides (11) e aquelas isoladas de pacientes não portadores de FC (9) apesar de terem sido inicialmente classificadas com este morfotipo, apresentaram 27,5% e 22,5%, respectivamente, de positividade no ensaio para a detecção do gene *algU*, soma-se a isto o fato de que todas as cepas apresentaram o gene *algD*. Dessa forma, outro mecanismo regulatório (*mucA* e *mucB*) que controla a transcrição do *algU* e suprime a expressão desse gene e, conseqüentemente, a expressão do alginato deve estar ocorrendo.

Para obtenção de uma análise precisa a respeito do mecanismo regulatório que gera a transcrição do gene *algD*, seria necessário um estudo que permitisse avaliar a presença dos genes regulatórios *algR*, *algP* e *algB*, e os regulatórios de *algU*. Todavia, como esse não foi o objetivo do nosso trabalho, estudos posteriores poderão responder a estas questões.

De forma geral, observamos que entre as cepas isoladas de pacientes com fibrose cística existem diferenças quanto à expressão dos fatores de virulência aqui estudados. Como estas diferenças aparecem apenas fenotipicamente, podemos sugerir que as cepas não

mucóides expressam em maior frequência as enzimas gelatinase e elastase, o que torna estas cepas mais aptas à colonização e com maior poder de destruição celular. Observamos também que entre as cepas mucóides, que são favorecidas pela presença da cápsula, algumas continuam expressando exoenzimas, entretanto, em menor frequência. Os resultados obtidos demonstraram também que, comparativamente, as cepas de *P. aeruginosa* isoladas de FC não mucóides e aquelas de isolados clínicos mostram resultados similares quanto à produção das exoenzimas, os quais podem ser verificados através dos dados da tabela 5, onde se observa que a frequência de resultados positivos é semelhante nos dois grupos, e esses, são fenotipicamente diferentes do grupo de amostras mucóides. Entretanto, quando observamos a frequência de cepas positivas no ensaio para detectar o gene *algU*, verificamos que os três grupos de amostras apresentaram resultados semelhantes. Dessa forma, podemos sugerir que as amostras que inicialmente colonizam o paciente possuem características semelhantes quanto à produção de fatores de virulência, e que a modificação destas cepas no pulmão de pacientes com FC se deve, principalmente, à pressão exercida pelo meio em que estas cepas se encontram, onde há um número elevado de íons disponíveis, uma grande quantidade de muco e um meio desidratado, o que dificulta a expulsão da bactéria do pulmão. Os resultados da análise genotípica para *algD* revelaram que entre as diversas cepas não existem diferenças quanto à presença deste gene. Entretanto, não podemos afirmar que todas as cepas podem tornar-se mucóides, já que não realizamos PCR para todos os genes envolvidos na síntese da cápsula de alginato.

6. Conclusões

A análise comparativa entre diversas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, através de métodos tradicionais e moleculares, permite concluir que:

As cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com fibrose cística, com morfotipo, não mucóide expressaram em maior frequência as exoenzimas elastase e gelatinase quando comparadas àquelas com morfotipo mucóide de mesma origem.

Entre os fatores de virulência estudados, a elastase aparece como a exoenzima mais frequentemente produzida por cepas não mucóides isoladas de pacientes com fibrose cística e por cepas obtidas de pacientes não portadores de FC.

A hemaglutinação com eritrócitos de diferentes origens na presença e na ausência de manose por nós utilizado como método indicativo da presença de pili não apresentou resultados satisfatórios, o que indica que este método não é indicado para a detecção dessa estrutura neste grupo bacteriano.

A análise genotípica para o gene *algD* indicou que todas as linhagens estudadas apresentam esse gene que é fundamental para produção da cápsula de alginato.

A análise genética para o gene *algU* demonstrou que ele não está presente em todas as cepas bacterianas estudadas e que este gene, provavelmente, não atua como regulador da transcrição do gene *algD* em todas as linhagens desta amostragem.

Abstract

Cystic Fibrosis (CF) is a genetic disease, recessive autosomal, characterized by anomalies on eletrolitic transport. *Pseudomonas aeruginosa* is an important opportunist pathogen, frequently founded in patients with CF. In this patients, colonization starts with a non-mucoid form bacteria, after this, bacteria turning to mucoid form. The objective of this work was to verify comparatively the production of some virulence factors by *P. aeruginosa* in mucoid and nonmucoid strains isolated of CF patients and in strains isolated of others infections. The method to detect hemolysin used blood agar with 5% of sheep blood. The gelatin hydrolysis was used to detect gelatinase. Elastase production was observed used elastin 1%. Pili production was analised by microhemagglutination method and alginate capsule by PCR method to detect genes *algD* e *algU*. Non-mucoid isolates of patients with FC and isolates others of clinical cases strains produces exoenzymes gelatinase and elastase in larger frequency than mucoid strains. Hemolysin production and presence of genes *algD* and *algU* was resembling on three bacterians groups. The gene *algD* was founded in all studied strains and essay of microhemagglutination was not satisfactory to detect pili in *P. aeruginosa* strains.

7. Referências Bibliográficas

1. Al-Awqati, Q.; J. Barasch, and. Landry. 1992. Chloride channels of intracellular organelles and their potential role in cystic fibrosis. *J. Exp. Biol.* 172:245-266.
2. Anastassiou, E. D.; A. C. Mintzas, C. Kounavis, and G. Dimitracopoulos. 1987. Alginate production by clinical nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J. Clin. Microbiol.* 25:656-659.
3. Anwar, H.; J. L. Strap, and J. W. Costerton, 1992. Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:1347-1351.
4. Baker, N. R. and C. Svanborg-Eden. 1989. Role of alginate in the adherence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot. Chemother.* 42:72-79.
5. Bandjee, M. C. J., A. Lasdunski; M. Bally, J. Carrère; J. P. Chazalette, and C. Galabert. 1995. Production of elastase, exotoxina A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. of Clinical. Microbiology* 33: 924-929.
6. Barasch, J.; B. Kiss, A. Prince, L. Saiman, B. Gruinert, and Q. Al-Awqati. 1991. Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature London.* 352:70-73.
7. Berka, R. M.; G. L. Gray, and L. Vasil. 1981. Studies of Phospholipase C (Heat-Labile Hemolysin) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity.* 34: 1071-1074.
8. Berka, R. M., and M. L. Vasil. 1982. Phospholipase C (Heat-Labile Hemolysin) of *Pseudomonas aeruginosa*: Purification and Preliminary Characterization. *J. Bacteriol.* 152:239-245.

9. Berry, A.; J. D. De Vault, A. M. Chakrabarty. 1989. High osmolarity is a signal for enhanced *algD* transcription in mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J. Bacteriol.* 171:2312-2317.
10. Boat, T. F.; A. L. Beadet, and M. J. Welsh. 1993. Cystic fibrosis, p. 2649-2680. In C.R. Scriver, A. L. Beaudet, W.S. Sly, and D.Valle (ed.). *The metabolic basis of inherited disease*. McGraw-Hill, New York.
11. Boucher, J. C., J. Martinez-Salazar, M. J. Schurr, M. Mudd, H. Yu, and V. Deretic. 1996. Two distinct loci affecting conversion to mucoid in Cystic fibrosis encode homologs of the serine protease HtrA. *J. Bacteriol.* 178:511-523.
12. Bourne, H.; D.A. Sanders; and F. McCormick. 1990. *Nature (London)*. 348:125-132.
13. Braum, P.; J. Tommassen, and A. Filloux. 1996. Role of the propeptide in folding and secretion of elastase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 19: 297-306.
14. Britigan, B. E., M. B. Hayek, B. N. Doebbeling, and R. B. Fick, Jr. 1993. Transferrin and lactoferrin undergo proteolytic cleavage in the *Pseudomonas aeruginosa* - infected lungs of patients with cystic fibrosis. *Infection and Immunity*. 61 : 5049-5055.
15. Cabral, D. A.; B. A. Loh, and D. P. Speert. 1987. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* resists nonopsonic phagocytosis by human neutrophils and macrophages. *Paediatr. Res.* 22:429-431.
16. Caplen, N. J., E. W. F. W. Alton, P. G. Middleton, J. R. Dorin, B. J. Stevenson, X. Gao, S. R. Durham, P. K. Jeffery, M. E. Hudson, C. Coutelle, L. Huang, D. J. Porteous, R. Williamson, and D. M. Geddes. 1995. Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat. Med.* 1:39-46.
17. Chitnis C. E. and D. E. Ohman. 1990. Cloning of *Pseudomonas aeruginosa algG* which controls alginate structure. *J. Bacteriol.* 172:2894-2900.

18. Coburn, J.; R. T. Wyatt, B. H. Iglewski and D. M. Gill. 1989. Several GTP-binding proteins, including p21c-H-ras, are preferred substrates of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. J. Biol. Chem. 264 (15):9004-9008.
19. Coburn, J.; and D. M. Gill. 1991. ADP-ribosylation of p21ras and related proteins by *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. Infect. Immun. 59 (11):4259-4262.
20. Coburn, J.; A. V. Kane; L. Feig; and D. M. Gill. 1991. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S requires a eukaryotic protein for ADP-ribosyltransferase activity. J. Biol. Chem. 266 (10):6438-6446.
21. Coyne, M. J. Jr., K. S. Russell, C. L. Coyle, and J. B. Goldberg. 1994. The *Pseudomonas aeruginosa* *algC* gene encodes phosphoglucomutase, required for the synthesis of a complete lipopolysaccharide core. J. Bacteriol. 176:3500-3507.
22. Cross, A. S., J. C. Sadorff, B. H. Iglewski, and P. A. Sokol. 1980. Evidence for the role of toxin A in the pathogenesis of infection with *Pseudomonas aeruginosa* in humans. J. Inf. Dis. 142:538-546.
23. Crystal, R. G.; N. G. McElvaney, M. A. Rosenfeld; C. S. Chu; A. Mastrangeli; J. G. Hay; S. L. Brody; H. A. Jaffe; N. T. Eissa and C. Danel. 1994. Administration of an adenovirus containing the human *CFTR* cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. Nat Genet. 8:42-51.
24. Darzins, A. and A. M. Chakrabarty. 1984. Cloning of genes controlling alginate biosynthesis from mucoid cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol.: 159:9-18.
25. Deretic, V., M. J. Schurr, J.C. Boucher, and D. W. Martin. 1994. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis: Environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors. J. Bacteriol. 176:2773-2780.
26. De Vries, C. A., and D. E. Obman. 1994. Mucoid to nonmucoid conversion in alginate producing *Pseudomonas aeruginosa* often results from spontaneous mutations in

- algT*, encoding a putative alternate sigma factor, and shows evidence for autoregulation. J. Bacteriol. 176:6677-6687.
27. Doggett, R. G. 1969 Incidence of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* from clinical sources. Appl. Microbiol. 18:936-937.
28. Doggett, R. G. G.; M. Harrison, and E. S. Wallis. 1964. Comparasion of some properties of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from infections in persons with and without cystic fibrosis. J. Bacteriol. 87:427-431.
29. Döring, G. 1994. The role of neutrophil elastase in chronic inflammation. Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 150 (Suppl.):S114-117.
30. Döring, J. R., P. Dickinson, E. W. F. W. Alton, S. N. Smith, D. M. Geddes, B. J. Stevenson, W. L. Kimber, S. Fleming, A. R. Clarke, M. L. Hooper, L. Anderson, R. S. P. Beddington, and D. J. Porteous. 1992. Cystic fibrosis in the mouse by targeted insertional mutagenesis. Nature (London) 359:211-214.
31. Dosanjh, A., W. Lencer, D. Brown, D. A. Ausiello, and J. L. Stow. 1994. Heterologous expression of delta F508 CFTR results in decreased sialylation of membrane glycoconjugates. Am. J. Physiol. 266:C360-C366.
32. Drumm, M. L.; H. A. Pope; W. H. Cliff; J. M. Rommens; S. A. Marvin; L. S. Tsui; F. S. Collins; R. A. Frizzelle, and J. M. Wilson. 1990. Correction of the Cystic Fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. Cell. 62:4227-4233.
33. Dubnau, E.; J. Weir, G. Nair, L. Carter; C. Moran, Jr., and I. Smith. 1988. *Bacillus* sporulation gene *spoOH* codes for σ^{30} (σ^H). J Bacteriol. 170:1054-1062.
34. Evans, L. R., and A. Linker. 1973. Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 116 : 915-924.
35. Fleiszig, S. M.; J. P. Wiener-Kronish; H. Miyazaki; V. Vallas; K. E. Mostov; D. Kanada; T. Sawa; T. S. Yen, and D. W. Frank. 1997. *Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S. Infect Immun. 65(2): 579-586.

36. Flynn, J. L., and D. E. Ohman. 1988. Use of gene replacement casmid vector for cloning alginate conversion genes from mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains: *algS* controls expression of *algT*. J. Bacteriol. 170:3228-3236.
37. Franklin, M. J., and D. E. Ohman. 1993. Identification of *algF* in the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* which is required for alginate acetylation. J. Bacteriol. 175:5057-5065.
38. Franklin, M. J., and D. E. Ohman. 1996. Identification of *alg* and *algJ* in the *Pseudomonas aeruginosa* biosynthetic gene cluster which are required for alginate O-acetylation. J. Bacteriol. 178:2186-2195.
39. Fu, H.; J. Coburn, and J. Collier. 1993. The eukaryotic host factor that activates exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is a member of the 14-3-3 protein family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 2329-2324.
40. Fyfe, J. A. M., and J. R. W. Govan. 1980. Alginate synthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*: a chromosomal locus involved in control. J. Gen. Microbiol. 119:443-450.
41. Garber, N., N. Sharon, D. Shohet, J. S. Lam, and R. J. Doyle. 1985. Contribution of hydrophobicity to hemagglutination reactions of *Pseudomonas aeruginosa*. Infection and Immunity. 50 : 336-337.
42. Gill, J. F., V. Deretic, and A. M. Chakrabarty. 1986. Overproduction and assay of *Pseudomonas aeruginosa* phosphomannose isomerase. J. Bacteriol. 167:611-615.
43. Giligan, P.H. 1991. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. Clin. Microbiol. Reviews. 4: 35-51.
44. Goldberg, J. B., M. J. Coyne, A. N Neely, and I. A. Holder. 1995. Avirulence of a *Pseudomonas aeruginosa* *algC* mutant in a burned-mouse model of infection. Infect. Immun. 63:4166-4169.
45. Govan, J. R. W. and G. S. Harris. 1986. *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: unusual bacterial adaptation and pathogenesis. Microbiol. Sci. 3:302-308.

46. Govan, J. R. W. and S. Glass. 1990. The microbiology and therapy of cystic fibrosis lung infection. *Rev. Med. Microbiol.* 1:19-28.
47. Govan, J. R. W. and V. Deretic. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Reviews.* 60:539-574.
48. Gray, G. L., and M. L. Vasil. Mapping of a gene Controlling the production of phospholipase C and alkaline phosphatase in *Pseudomonas aeruginosa*. 1981. *Mol. Gen. Genet.* 183:403-405.
49. Hancock, R. E.; L. M. Muthaira, L. Chan, R. P. Darsveau, D. P. Speert, and G. B. Pier. 1983. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypeable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect. Immun.* 42:170-177.
50. Hoiby N.; G. Döring, and P. O. Schiøtz. 1986. The role of immune complexes in the pathogenesis of bacterial infections. *Annu. Rev. Microbiol.* 40: 29-53.
51. Iacocca, V. F.; M. S. Sibinga, and G. J. Barbero. 1963. Respiratory tract bacteriology in cystic fibrosis. *Am. J. Dis. Child.* 106:316-324.
52. Imundo, L.; J. Barasch, A. Prince, and Q. Al-Awqati. 1995. Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3019-3023.
53. Johansen, H. K.; F. Espersen, S. J. Cryz, Jr., H.P. Hougen, A. Fomsgaard, J. Rygaard, and N. Hoiby. 1994. Immunization with *Pseudomonas aeruginosa* vaccines and adjuvant can modulate the type of inflammatory response subsequent to infection. *Infect. Immun.* 62:3146-3155.
54. Johansen, H. K, and N. Hoiby. 1992. Seasonal onset of initial colonisation and chronic infection with *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis in Denmark. *Thorax.* 47:109-111.

55. Kanthakumar, K.; G. Taylor; K. W. T. Tsang; D. R. Cundell, A. Rutiman; P. K. Jeffrey, P. J. Cole, and R. Wilson. 1993. Mechanism of action of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin on human ciliary beat in vitro. *Infect. Immun.* 61:2848-2853.
56. Kerem, E.; M. Corey, R. Gold, and H. Levison. 1990. Pulmonary function and clinical course in patients with cystic fibrosis after pulmonary colonization with *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Pediatr.* 116:714-719.
57. Khedhir, H. A. and Al-Jorany. 1997. Heterogeneous adhesion properties of *Pseudomonas aeruginosa* strains to different erythrocytes species. *Dirasat, Medical and Biological Sciences.* 24: 122-128.
58. Knight, D. A.; J. T. Barbieri. 1997. Ecto-ADP-ribosyltransferase activity of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *Infect Immun.* 65(8): 3304-3309.
59. Koch C.; and N. Hoiby. 1993. Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet* 341: 1065 1069.
60. Komisami, K.; B. F. Habbick, and S. K. Tumber. 1987. Role of sialic acid in saliva-mediated aggregation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Infect. Immun.* 55:2364-2369.
61. Krivan, H. C.; D. D. Roberts, and V. Ginsburg 1988. Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc beta 1-4Gal found in some glycolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6157-6161.
62. Krivan, H. C., V. Ginsburg, and D. D. Roberts. 1988. *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia* isolated from cystic fibrosis patients bind specifically to gangliotetraosylceramide (asialo GM1) and gangliotriaosylceramide (asialo GM2). *Arch. Biochem. Biophys.* 260:493-496.
63. Kubesch, P.; T. Dörk, U. Wulbrand, N. Kälin, T. Neumann, B. Wulf, H. Geerlings, H. Weissbrodt, H. von der Hardt, and B. Tümmler. 1993. Genetic determinants of airways colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Lancet.* 341:189-193.

64. Kurioka, S.; and P. V. Liu. 1967. Effect of the hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa* on phosphatides and phospholipase C activity. J. Bacteriol. 93: 670-674.
65. Lam, J. R.; Chan K Lam, and J. W. Costerton. 1980. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. Infect. Immun. 28: 546-556.
66. Learn, D.B.; E. P. Brestel, and S. Seetharama. 1987. Hypochlorite scavenging by *Pseudomonas aeruginosa* alginate. Infect. Immun. 55:1813-1818.
67. Lightfoot, J.; and J. S. Lam. 1993. Chromosomal mapping, expression and synthesis of lipopolysaccharide in *Pseudomonas aeruginosa*: a role for guanine diphosphate (GDP)-D-mannose. Mol. Microbiol. 8:771-782.
68. Liu, P. V. 1979. Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*, p.63-68. In: R. G. Doggett (ed.), *Pseudomonas aeruginosa*. Academic Press, Inc., New York.
69. Liu, S.; T. L. Yahr; D. W. Frank; J. T. Barbieri. 1997. Biochemical relationships between the 53-kilodalton (Exo 53) and 49-kilodalton (ExoS) forms of Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 179: 1609-1613.
70. Lory, S. and P. C. Tai. 1985. Biochemical and genetic aspects of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. Curr.Top.Microb.Immun. 118:53-69.
71. Maharaj, R.; T. B. May; S. K. Wang, and A. M. Chakrabarty. 1993. Sequence of the *alg8* and *alg44* genes involved in the synthesis of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*. Gene 136:267-269.
72. Mahenthiralingam, E., M. E. Campbell and D. P. Speert. 1994. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. Infect. and Immunity. 62: 596-605.
73. Mai, G.T.; W. K. Seow; G. B. Pier; J. G. McCormack and Y. H. Thong. 1993. Suppression of lymphocyte and neutrophil functions by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide (alginate): reversal by physiochemical, alginate, and specific monoclonal antibody treatments. Infect. Immun. 61:559-564.

74. Majtán, V.; A. Hošťacka; Košiarová, A.; Majtánová, L' and Kouhútová, S. 1991. On the toxinogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* strains. J. of Hygiene, Epid., Microb. And Imunol. 35: 217-224.
75. Martin, D. W., B.W. Holloway, and V. Deretic. 1993. Characterization of a locus determining the mucoid status of *Pseudomonas aeruginosa*: *AlgU* shows sequence similarities with a *Bacillus* sigma factor. J. Bacterial. 175:1153-1164.
76. Martin, D.W.; M. J. Schurr; M. H. Mudd; J. R W. Govan; B. W. Holloway, and V. Deretic. 1993. Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* into cystic fibrosis patients. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:8377-8381.
77. Martin, D. W., M. J. Schurr, H. Yu, and V. Deretic. 1994. Analysis of promoters controlled by the putative sigma factor *AlgU* regulating conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*: relationship to stress response. J. Bacteriol. 176:6688-6696.
78. Martin, D. W.; M. J. Schurr, M. H. Mudd, and V. Deretic. 1993. Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* into the alginate-producing form: inactivation of *mucB* causes conversion to mucoidy . Mol. Microbiol. 9: 495-506.
79. McAvoy, M. J.; V. Newton, A. Paull, J. Morgan, P. Gacesa, and N. J. Russell. 1989. Isolation of mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* from non-cystic fibrosis patients and characterisation of the structure of their secreted alginate. J. Med. Microbiol. 28:183-189.
80. McGovan, S. J.; H. C. Gorham, and D. A. Hodgson. 1993. Light-induced carotogenesis in *Mixococcus xanthus*: DNA sequence analysis of the *carR* region. Mol. Microbiol. 10:713-725.
81. McIver, K. S.; E. Kessler; J. C. Olson, and D. E. Ohman. 1995. The elastase propeptide functions as an intramolecular chaperone requires for elastase activity and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. 18: 877-889.
82. Monday, S. R., and N. L. Schiller. 1996. Alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: the role of *AlgL* (alginate lyase) and *AlgX*. J. Bacterial. 178:625-632.

83. Morihara, K. 1964. Production of elastase and proteinase by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 88:745-757.
84. Mull, J. D., and W. S. Callahan. 1963. Estimation of elastolytic activity of strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 85:1178-1179.
85. Murray, P. R.; G. S. Kobayashi, M. A. Pfaller; K. S. Rosenthal. 1994. Medical Microbiology. 2 Ed. Pg. 253-259.
86. Ohman, D. E., and A. M. Chakrabarty. 1981. Genetic mapping of chromosomal determinants for the production of the exopolysaccharide alginate in a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate. 33 : 142-148.
87. Olson, J. C.; and Ohman, D. E. 1992. Efficient production and processing of elastase and LasA by *Pseudomonas aeruginosa* require zinc and calcium ions. J. Bacteriol. 174:4140-4147.
88. Pedersen, S. S., F. Espersen, N. Hoiby, and T. Jensen. 1990. Immunoglobulin A and immunoglobulin G antibody responses to alginates from *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 28:747-755.
89. Pedersen, S. S., N. Hoiby, F. Espersen, C. Koch. 1992. Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Thorax. 47:6-13.
90. Pedersen, S. S. 1992. Lung infection with alginate-producing. mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. APMIS 100(Suppl. 28):1-79.
91. Pier, G. B.; G. J. Small, and H. B. Warren. 1990. Protection against mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in rodent models of endobronchial infections. Science. 249:537-540.
92. Pier, G. B., S. Takeda, M. Grout, and R. B. Markham. 1993. Immune complexes from immunized mice and infected cystic fibrosis patients mediate murine and human T cell killing of hybridomas producing protective. opsonic antibody to *Pseudomonas aeruginosa* J. Clin. Invest. 91:1079-1087.

93. Plotkowski, M. C., M. Chevillard, D. Pierrot, D. Altemayer and Puchelle. 1992. Epithelial respiratory cells from cystic fibrosis patients do not possess specific *Pseudomonas aeruginosa* - adhesive properties. J. Med. Microbiol. 30:104-111.
94. Prince, A. 1992. Adhesins and receptors of *Pseudomonas aeruginosa* associated with infection of the respiratory tract. Microb. Pathog. 13:251-260.
95. Pugashetti, B. K., L. Vadas, H. S. Prihar, and D. S. Feingold. 1983. GDP-mannose dehydrogenase and biosynthesis of alginate-like polysaccharide in a mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 153:1107-1110.
96. Ramphal, R.; C. Guay, and G. B. Pier. 1987. *Pseudomonas aeruginosa* adhesins to tracheobronchial mucin. Infect. Immun. 55:600-603.
97. Ramphal, R.; & Pier, G.B. 1985. Role of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in adherence to tracheal epithelial cells. Infect. Immun. 61:559-564.
98. Roychoudhury, S., N. A. Zielinski., J. D. De Vault., J. Kato, D. L. Shinabarger, T. B. May, R. Maharaj, K. Kimbara, T. K. Misra, A. M. Chakrabarty. 1991. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis : biosynthesis of alginate as a virulence factor. Antibiot Chemother. 44 : 63-67.
99. Russell, N. J.; and P. Gacesa. 1988. Chemistry and biology of the alginate of mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Mol. Aspects Med. 10:1-91.
100. Rust, L.; E. C. Pesci, and B. H. Iglewski. 1996. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* elastase (las B) regulatory region. J. Bacteriol. 178:1134-1140.
101. Saiman, L.; and A. Prince. 1993. *Pseudomonas aeruginosa* pill bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. J. Clin. Invest. 92:1875-1880.
102. Saiman, L., J. Sadoff, and A. Prince. 1989. Cross-reactivity of *Pseudomonas aeruginosa* antipilin monoclonal antibodies with heterogeneous strains of *P. aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia*. Infect. Immun. 57:2764-2770.

103. Salyers, A. A., and D. D. Whitt. Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach. 1994. pg. 269-270.
104. Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring harbor Laboratory Press, NY, pp.1584.
105. Saunders, W. B.; W. Burrows, J. W. Moulder and R. Murdoch. 1963. Textbook of Microbiology. Pg. 659-660.
106. Sbarra, A. J., R. F. Gilligan, and W.A. Bardawill. 1960. A plate assay for elastase. Nature 188:322-323.
107. Schlichtman, D.; A. Kavanaugh-Black., S. Shankar., and A. M. Chakrabarty. 1994. Energy metabolism and alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: role of the tricarboxylic acid cycle. 176 : 6023-6029.
108. Schurr, M. J. D., Martin, M. H. Mudd, and V. Deretic. 1994. Gene cluster controlling conversion to alginate-overproducing phenotype in *Pseudomonas aeruginosa*: functional analysis in a heterologus host and in the instability of mucoidy. J. Bacteriol. 176: 3375-3382.
109. Schurr, M. J., H. Yu, J. C. Boucher, N. S. Hibler, and V. Deretic. 1995. Multiple promoters and induction by heat shock of the gene encoding the alternative sigma factor AlgU (σ^E) which controls mucoidy in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 177:5670-5679.
110. Schurr, M. J. J.; D. W. Martin; M. H. Mudd; N. S. Hibler; J. C. Boucher, and V. Deretic. 1993. The *algD* promoter: regulation of alginate production by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Cell. Mol. Biol. Res. 39:371-376.
111. Selvaraj, U.; D. E. Ohman; R. Quarless; D. J. Hassett, and D. J. Wozniak. 1998. Phosphorylation-independent activity of the response regulators algB and algR in promoting alginate biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 180(4): 956-968.

112. Sheehan, D. J.; Janda, J. M. and Bottone, E. J. 1982. *Pseudomonas aeruginosa*: Changes in antibiotic susceptibility, enzymatic, and antigenicity among colonial morphotypes. 15: 926-930.
113. Shinaharger, B., A. Berry, T. May, R. Rothmel, A. Fialho, and A. M. Chakrabarty. 1991. Purification and characterization of phosphomannose isomerase-guanosine phospho D-mannose pyrophosphorylase: a bifunctional enzyme in the alginate biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. 266:2080-2088.
114. Simpson, J. A.; S. E. Smith, and R. T. Dean. 1989. Scavenging by alginate of free *Pseudomonas aeruginosa* radicals released by macrophages. Free Radical Biol. Med. 6:347-353
115. Simpson, J. A., S. E. Smith, and R. T. Dean. 1988. Alginate inhibition of the uptake of by macrophages. J. Gen. Microbiol. 134: 29-36.
116. Southern, P. M.; B. B. Mays, A. K. Pierce, and J. P. Sanford. 1970. Pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Lab. Clin. Med. 76: 548-559.
117. Strom, M. S., and S. Lory. 1993. Structure-function and biogenesis of the type IV pili. Annu. Rev. Microbiol. 47 : 565-596.
118. Tatnell, P. J.; N. J. Russell, and P. Gacesa. 1994. Chemical analysis of alginate from mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Biochem. Soc. Trans. 22:310S.
119. Vasil, M. L.; and B. H. Iglewski. 1978. Comparative toxicities of diphterial toxin and *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A: evidence for different cell receptors. J. Gen. Microbiol. 108:333-337.
120. Vasil, M. L. D. Kabat, and B. H. Iglewski. 1977. Structure-activity relationships of an exotoxins of *Pseudomonas aeruginosa*. Infection and Immunity. 16:353-361.
121. Wainwright, B. 1991. The molecular pathology of cystic fibrosis. Curr. Biol. 1:80-82.
122. Wang, Q., and J. M. Kaguni. 1989. A novel sigma factor is involved in expression of the *rpoH* gene of *Escherichia coli*. Bacteriol. 171:4248-4253.

123. Wang, S. K., I. Sa' Correia, A. Darzins, and A. M. Chalurabarty. 1987. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* alginate (*alg*) gene region II. J. Gen. Microbiol. 133:2303-2314.
124. Welsh, M. J. 1993. Cystic fibrosis gene therapy using an adenovirus: in vivo safety and efficacy in the nasal epithelium. Fed. Regisi. 58:21737.
125. Wilson, E. D. 1930. Studies in bacterial proteases I. The relation of proteases production to the culture medium. J. bacteriol. 20:41-59.
126. Woods, D. E., D. C. Strauss, W. G. Johanson, Jr., V. K. Berry, and I. A. Bass. 1980. Role of pili in adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mammalian buccal epithelial cells. Infect. Immun. 29 : 1146-1151.
127. Woods, D. E., M. S. Schaffer, H. R. Rabin, G. D. Campbell, and P. A. Sokol. 1986. Phenotypic comparison of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a variety of clinical sites. J. Clinical Microbiol. 24: 260-264.
128. Wozniak, D. J. 1994. Integration host factor and sequences downstream of the *Pseudomonas aeruginosa algD* transcription start site are required for expression. J. Bacteriol. 176: 5068-5076.
129. Wozniak, D. J.; and Ohman, D. E. 1994. Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* genes *algR*, *algB*, and *algD* reveals a hierarchy of alginate gene expression which is modulated by *algT*. J. Bacteriol. 176: 6007-6014.
130. Xiao, Y.; S. Heu, J. Yi, Y. Lu, and S. W. Hutcheson. 1994. Identification of putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 *hrp* and *hrmA* genes. J. Bacteriol. 176:1025-1036.
131. Ye, R. W., N. A. Zielinsid, and A. M. Chakrabarty 1994. Purification and characterization of phosphomannomutase/phosphoglucomutase from *Pseudomonas aeruginosa* involved in biosynthesis of both alginate and lipopolysaccharide. J. Bacteriol. 176:4851-4857.

132. Yu, H., M. J. Schurr, and V. Deretic. 1995. Functional equivalence of *Escherichia coli* σ^E and *Pseudomonas aeruginosa* AlgU: *E. coli* *rpoE* restores mucoidy and reduces sensitivity to reactive oxygen intermediates in *algU* mutants of *P. aeruginosa*. J. Bacteriol. 177:3259-3268.
133. Zhou, L.; C. R. Dey, S. E. Wert, M. D. DuVall, R. A. Frizzell, J. A. Whitsett. 1994. Correction of lethal intestinal defect in a mouse model of cystic fibrosis by human CFTR. Science. 266: 1705-1708.
134. Zielinski, N., A. Chakrabarty, and A. Berry. 1991. Characterization and regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* *algC* gene encoding phosphomannomutase. J. Biol. Chem. 266:9754-9763.