UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC/44202
IB/ 81622

INSTITUTO DE BIOLOGIA

T/UNICAMP

SECRETÁRIA DE PÓS-GRADUAÇÃO I. B.

Universidade Estadual de Campinas

Cristiane Nucci

Estudo Microbiológico Comparativo de Amostras de *Edwardsiella tarda* Isoladas do Homem e de Peixes.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato a) Cristiane Nucci
e aprovada pela Comissão Julgadora.
25/01/01

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção de Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular na área de Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro

Co – Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE IB 1816 22
N.º CHAMADA:
V. Ex.
TOMBO BC/ 44202
PROC. 16-392/01
C [ ] D [x]
PREÇO R$ 11,00
DATA 26/04/01
N.º CPD

CM-00155029-0

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

N883e

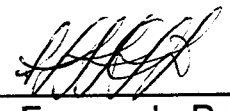
Nucci, Cristiane.
Estudo microbiologico comparativo de amostras de *Edwardsiella tarda* isoladas do homem e de peixes / Cristiane Nucci. -- Campinas, SP : [s.n.], 2000.
88f. : il.

Orientador: Antonio Fernando Pestana de Castro.
Co-orientador: Wanderley Dias da Silveira.
Tese (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia

1. Peixes. 2. Celulas - Adesão. 3. Biologia molecular. 4. Microbiologia. I. Castro, Antonio Fernando Pestana de. II. Silveira, Wanderley Dias da Silveira. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

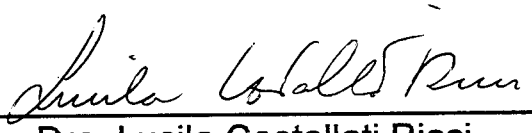
Data da defesa: 25/01/01

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro (orientador)

Prof. Dr. Marcelo Brocchi



Profa. Dra. Lucila Costallati Ricci

Prof. Dr. Tomomasa Yano

Aos meus pais, que tanto amo e aos quais tanto devo;
Ao Rodolfo, mais que um grande amor, um grande amigo e
ao Enzo nosso filho que está a caminho.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro, pela orientação, aconselhamento, amizade e sobretudo pela experiência transmitida.

Ao Prof. Dr. Marcelo Brocchi, pelo apoio, amizade e por fazer parte da banca prévia e definitiva.

À Profa. Dra. Lucila Costallat Ricci, pelo carinho, amizade e por participar do exame de qualificação e banca definitiva.

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, por sua participação na banca prévia e por todo apoio.

À Profa. Dra. Clarice Weins Arns, por sua participação na banca prévia e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira, pela co-orientação e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, por sua participação no exame de qualificação e por toda ajuda prestada.

À Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti, pelo apoio na cultura de células e pela amizade.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho

À Silvia Yuine Bando, aluna de doutorado do Instituto de Ciências Biomédicas – Dep. de Imunologia, pelo apoio no teste de RAPD e pela acolhida em seu laboratório.

À Sarah da Silvia Corrêa aluna de mestrado do Instituto de Ciências Biomédicas – Dep. de Microbiologia, pela amizade e ajuda no teste de RAPD.

À Marcela Alves Ribeiro, pela ajuda nos testes de PCR.

Aos amigos Gerson, Michelle, Angela, Keila, Leila e Adriana, pela ajuda e amizade no decorrer destes anos.

À Paula, Jusceley, Silvinha, Sérgio e João, amigos que mesmo à distância estão sempre me incentivando.

À Sra. Mercedes, por toda ajuda e carinho.

Ao Marcelo, Marcela e Kiky, cunhados maravilhosos.

À Mirtis, pela amizade e pelos seus préstimos na solução dos problemas técnicos e administrativos.

À Lourdes e Zaira por toda ajuda e atenção.

À Ana Lúcia pela amizade e ajuda na cultura de células.

À todos os funcionários e amigos do departamento de Microbiologia.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo), pelo auxílio financeiro.

Em especial aos meus irmãos Cristine e Gustavo, amigos de toda uma vida.

Sumário

1 – Introdução..... 1

2 – Objetivos..... 10

3 – Material e Métodos..... 12

3.1 – Amostras Padrão..... 12

3.1.1 – Amostras Produtoras de Toxinas..... 12

3.1.2 – Amostras Padrão de Aderência..... 12

3.1.3 - Amostras Padrão de Fator de Colonização..... 13

3.1.4 - Amostras Padrão de Invasão..... 13

3.1.5 – Controle Negativo..... 13

3.2 – Amostras estudadas..... 13

3.3 – Manutenção das amostras..... 15

3.4 – Isolamento e Identificação preliminar das amostras de *E. tarda* da região de Campinas..... 15

3.5 – Adesinas..... 16

3.6 – Pesquisa de produção de hemolisina..... 17

3.6.1 – Método em picada..... 17

3.6.2 – Método de ágar sobrecamada..... 17

3.6.3 – Método da hemolisina de contato e método da presença de hemolisina solúvel..... 18

3.7 – Adesão a células HeLa..... 18

3.7.1 – Preparo das amostras bacterianas..... 18

3.7.2 – Preparo das células HeLa..... 19

3.7.3 – Adesão..... 19

3.8 – Invasão a células HeLa..... 20

3.9 – Pesquisa de produção de bacteriocinas..... 21

3.10 – Coloração Negativa..... 22

3.11 – Pesquisa de fatores de virulência por PCR..... 23
3.11.1 – Pesquisa de enterohemolisina e hemolisina..... 23
3.11.2 – Pesquisa de enterotoxina..... 26
3.11.3 – Pesquisa de shiga toxina (Stx) e fatores citonecrotizantes (CNF)..... 28
3.11.4 – Detecção de aerobactina..... 31
3.11.5 – Pesquisa de adesão e invasão..... 31
3.12 – RAPD..... 34
3.12.1 – Extração de DNA..... 34
3.12.2 – Reação de RAPD..... 34
3.12.3.- Análise dos dados..... 35
4 – Resultados..... 36
4.1 – Isolamento e identificação de *E. tarda*..... 36
4.2 – Microhemaglutinação Manose Resistente (MHMR)..... 38
4.3 – Pesquisa da produção de hemolisina..... 40
4.4 – Adesão a células HeLa..... 44
4.5 – Invasão a células HeLa..... 46
4.6 – Pesquisa da produção de bacteriocinas..... 46
4.7 – Coloração negativa..... 46
4.8 – Pesquisa de fatores de virulência testados por PCR..... 50
4.9 – RAPD..... 50
5 – Discussão..... 52
5.1 – Características Biológicas..... 52
5.2 – Estrutura Clonal..... 57
6 – Conclusão..... 62
7 – Apêndice..... 63
Referências Bibliográficas..... 69

Índice de Tabelas

TABELA 1 – Características bioquímicas do gênero *Edwardsiella tarda* 2

TABELA 2 – Amostras de *Edwardsiella tarda* de origem humana e de peixe que foram estudadas nesta pesquisa..... 14

TABELA 3 – Apresentação dos resultados positivos de teste de Microhemaglutinação Manose Resistente (MHMR), realizado com as amostras de *E. tarda*..... 38

TABELA 4 – Descrição das amostras que apresentaram halo de hemólise nos diferentes métodos utilizados para detecção da produção de hemolisina..... 42

TABELA 5 – Resultado do teste de adesão em células HeLa..... 44

Índice de Figuras

FIGURA 1 – Foto dos resultados do sistema API 20E com a amostra T24C(peixe), isolada neste trabalho, confirmada como *Edwardsiella tarda* 37

FIGURA 2 – Freqüência do fenótipo hemolítico dentre as 53 amostras de *Edwardsiella tarda*, determinada por: inoculação por picada, ágar sobrecamada, hemolisina de contato e hemolisina solúvel..... 41

FIGURA 3 – Resultado positivo com presença de halo no teste para produção de hemolisina sobrecamada (AO), amostra 18 (humana) e 9.8 (peixe) de *Edwardsiella tarda*..... 43

FIGURA 4- Resultado negativo no teste para produção de hemolisina sobrecamada (AO), amostra 25 de *Edwardsiella tarda*..... 43

FIGURA 5 – Amostra 26 de *Edwardsiella tarda*, isolada de humanos (Brasil) adesão às células HeLa após 1 hora de incubação. Aumento de 1000x..... 45

FIGURA 6 – Amostra 9.8 de *Edwardsiella tarda*, isolada de peixe (Espanha), adesão às células HeLa após 1 hora de incubação. Aumento de 1000x..... 45

FIGURA 7 – Amostra 22 de *Edwardsiella tarda*, isolada de humanos (Brasil), invasão às células HeLa. Aumento 1000x..... 47

FIGURA 8 – Amostra 4 de *Edwardsiella tarda*, isolada de humanos (Brasil), invasão às células HeLa. Aumento 1000x..... 47

FIGURA 9 – Teste de coloração negativa realizado com a amostra ET-2, isolada de humanos (USA), incubada a 37°C, visualizando-se fímbrias em microscópio eletrônico de transmissão (M.E.T.). Aumento de 41.700x..... 48

FIGURA 10 – Teste de coloração negativa realizado com a amostra 16, isolada de humanos (Brasil), incubada a 37°C, visualizando-se fímbrias em M.E.T. Aumento de 90.000x..... 48

FIGURA 11 – Teste de coloração negativa realizado com a amostra ET-2 isolada de humanos (USA), incubada a 16°C, não visualizando fímbrias em M.E.T. Aumento 41.700x..... 49

FIGURA 12 – Dendrograma baseado na análise do clonal UPGMA dos coeficientes de Jaccard no teste de RAPD. Foram utilizadas para a construção do dendrograma amostras de *Edwardsiella tarda* isoladas de homem e de peixes..... 51

Resumo

Com a expansão da piscicultura nos últimos anos em vários países, inclusive no Brasil, problemas associados a bactérias patogênicas , como *Edwardsiella tarda*, tem aumentado.

Nesta pesquisa foram estudadas 53 amostras de *Edwardsiella tarda*, 43 cedidas por pesquisadores brasileiros e estrangeiros, (31 humanas e 12 de peixes), e 10 amostras de peixes isoladas por nós.

O estudo da produção de hemolisina foi realizado através de quatro métodos diferentes: picada (P) onde 56,6% foram positivas, ágar sobrecamada (AO) no qual 81,1% das amostras foram positivas, hemolisina da contato (CH), 64,1% das amostras foram positivas e hemolisina solúvel (HS), onde não houve presença de hemólise.

As amostras foram analisadas quanto a microhemaglutinação manose resistente (MHMR), para a pesquisa de adesinas ativas em eritrócitos de humano, boi, carneiro, galinha, cobaia e cavalo, sendo que estes 3 últimos mostraram-se mais sensíveis: 9,4%, 31,2% e 18,9% respectivamente de amostras hemaglutininantes. Os eritrócitos de humano, boi e carneiro não apresentaram resultados significativos.

Foram pesquisados fatores de virulência como: enterotoxina termo-lábil (LT-1), shiga-like toxina (Stx-1 e Stx-2), fatores citonecrotizantes (CNFgeral, CNF-1 e CNF-2) , "enteroaggregative stable toxin 1"(EAST-1), aerobactina (AER), invasão (EI), presença do plasmídio EAF, presença do gene *eae*A que codifica para intimina, enterohemolisina(EntHLY) e hemolisina (HLY) através da técnica de PCR, não sendo encontrado nenhum dos fatores de virulência citados acima.

A produção de bacteriocinas também não foi detectada entre estas amostras.

O teste de adesão foi realizado com 1 hora de incubação e todas as amostras aderiram.

No teste de invasão 100% das amostras invadiram as células HeLa.

Seis amostras foram submetidas ao teste de coloração negativa e em duas delas foram detectadas fímbrias.

Foi realizada uma análise genômica através do teste RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), mediante o qual foi possível a construção de um dendrograma para comparação das amostras.

Abstract

Because of the growing in recent years of aquaculture in many countries, including Brazil, problems associated with pathogenic bacteria as *Edwardsiella tarda* has increased. In this work 53 strains of *Edwardsiella tarda* were studied, 43 of these were received from others foreigner and Brazilian researchers (31 from humans and 12 from fishes), and the remaining 10 strains were isolated from fishes during this research from lakes around Campinas.

Study of hemolysis production was carried out by means of four different methods: Plate Assay (PA) where 56,6% strains were positive, Agar Overlay (AO) where 81,1% were positive, Contact Hemolysis (CH) with 64,1% of positive results, and supernatant assay (SA) where hemolysins was not detected. These strains were analyzed with regard to Mannose-Resistant Hemagglutination (MRHA) to look for the presence of adhesins active on severals erythrocytes such as: human, calf, sheep, chicken, guinea pig and horse, the later 3 showed more sensibility with 9,4%; 31,2% and 18,9% of positive hemagglutininination strains respectively.

Virulence factors were also analyzed via PCR technique, they were as follows: enterotoxins heat-labile (LT-1), shiga-like toxin (Stx-1 e Stx-2), citotoxic necrotizing factor (CNF, CNF-1 e CNF-2), enteroaggregative stable toxin 1 (EAST-1), aerobactin (AER), invasion (EI), EPEC adherence factor (EAF) detection of the *eae* gene (production of intimins), enterohemolysin (EntHLY) and hemolysin (HLY). None of these factors, including production of bacteriocins were found among these strains.

The adhesion test was carried out with 1 hour of incubation and all strains adhered. In the test of invasion 100% of the strains able to invade HeLa cells. Six strains were submitted to negative staining test and in two of

these pilli were detected. Also, the RAPD was used for investigating the genetic relationships of all strains. A dendrogram was constructed based on statistical analysis of fingerprint differences.

1 – Introdução

EWING et al., (1965) estudando um bacilo gram-negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae,* pelas características incomuns, caracterizadas principalmente por uma fraca ou nula atividade metabólica frente a carboidratos propuseram a denominação *Edwardsiella*, que teria somente uma única espécie, *Edwardsiella tarda*.

Anos mais tarde, uma segunda espécie *Edwardsiella hoshinae*, dentro deste gênero, foi proposta por GRIMONT et al. (1980). Um ano mais tarde, HAWKE et al. (1981) descreveram uma terceira espécie do gênero, a *Edwardsiella ictaluri*, que foi isolada de peixes afetados mormente por septicemia e abscessos. As diferentes espécies do gênero *Edwardsiella* estão principalmente associadas a ambientes de água doce e animais que habitam estes ecossistemas, como anfíbios, répteis e peixes.

Entre estas bactérias, uma das mais estudadas, é a *E. tarda*, que tem sido isolada de uma grande variedade de animais de água doce e de vida marinha, incluindo tartarugas, cágados, peixes, pelicanos, jacarés, lagartos, sapos, cobras e focas. Esta bactéria vem sendo descrita como causadora de inúmeras enfermidades em animais, como enfisematose putrefativa do bagre, enterites crônicas em pingüins e microabcessos renais e doenças hepáticas em enguias. Pode ser encontrada sem causar enfermidades no trato intestinal de grandes mamíferos, tendo sido relatada mais freqüentemente em macacos, gambás e porcos (JANDA et al. 1991).

Recentemente, a *Edwardsiella tarda* tornou-se conhecida como um patógeno humano, que pode causar uma variedade de síndromes clínicas como bacteremia, febre entérica, gastroenterites, em infeções que lembram

as salmoneloses (JANDA & ABBOTT, 1993a); JARURATANASIRIKUL & KALNAUWAKUL, 1991).

Nas provas bioquímicas usuais a *Edwardsiella tarda* é identificada como uma bactéria com as seguintes características mais importantes: produção de indol e testes de lisina e ornitina descarboxilase positivos (ver tabela 1). Propriedades marcantes desta bactéria são a rápida produção de H_2S e a incapacidade de fermentar a maioria dos carboidratos (GUTIERREZ et al. 1993) donde advém a denominação "tarda"(do latim = lenta).

Tabela 1 - Características bioquímicas do gênero *Edwardsiella*.

Teste	E. hoshinae	E. ictaluri	E. tarda
Produção de Indol	[-]	-	+
Vermelho de metila	+	-	+
Citrato de Simmons	-	-	-
Produção de H_2S	-	-	+
Lisina decarboxilase	+	+	+
Ornitina decarboxilase	+	d	+
Motilidade	+	-	+
Utilização de malonato	+	-	-
D-Glicose, produção de gás		d	+
Produção de ácido :			
L-Arabinose	[-]	-	-
Lactose	-	-	-
D-Manitol	+	-	-
Melibiose	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	-
Trealose	+	-	-
D-Xilose	-	-	-
ONPG(ortonitrofenil-galactosideo)	-	-	-

Um novo biogrupo de *Edwardsiella tarda*, designado biogrupo 1, foi descrito como distinto da espécie clássica por sua capacidade em fermentar arabinose, manitol e sacarose (provas negativas para as amostras clássicas) e por não reduzir o tetrationato nem produzir H_2S (testes positivos nas culturas clássicas) (EWING et al.1965; WALTON et al. 1993).

BOCKEMUHL et al. (1971) relataram na Tailândia vinte e cinco casos de infeções humanas por *Edwardsiella tarda*, e, principalmente a partir deste trabalho e outros mais ou menos concomitantes, a *E. tarda* passou a ser considerada como um patógeno capaz de produzir no homem doenças similares à salmonelose, ocorrendo com mais freqüência em crianças e idosos, ou em pessoas imunodeprimidas.

VANDEPITTE et al. (1983) descreveram um caso de diarréia por *Edwardsiella tarda* em uma criança de dois meses. A bactéria foi isolada de um aquário com peixes tropicais na casa do paciente, o que mostra a importância deste tipo de animal como reservatório ou fonte de infeção para o homem.

Com a expansão da piscicultura nos últimos anos em vários países, inclusive no Brasil, problemas associados a bactérias patogênicas em animais aquáticos têm aumentado, talvez, também por um maior interesse dos especialistas desta área. Particularmente, uma série de propriedades importantes na virulência desta bactéria para peixes têm sido atribuída a plasmídios. Os plasmídios como determinantes de virulência podem ser responsáveis pela codificação de antígenos específicos de superfície, permitindo o ataque da bactéria às células de peixes mais sensíveis, ou ainda, determinantes de virulência podem agir via produção de toxinas, provavelmente citotoxinas, como parte do processo invasivo. O uso

prolongado de antibióticos no tratamento de doenças infecciosas de peixes tem contribuído na seleção e maior freqüência de plasmídios R em bactérias consideradas patogênicas e importantes para a aquacultura comercial (REGER et al. 1993).

Ainda não estão bem explicados os mecanismos pelos quais *Edwardsiella tarda* causa doença. Entretanto, dois principais fatores de virulência têm sido descritos: invasão em células hospedeiras (MARQUES et al.,1984) e produção de hemolisina (JANDA & ABBOTT, 1993b).

Durante meados dos anos 80 vários mecanismos de virulência foram relatados, mormente em *Edwardsiella tarda*. MARQUES et al. (1984) relataram a capacidade invasora, a produção de hemolisina e o perfil plasmídial em 12 amostras de *Edwardsiella tarda*, isoladas de infecções humanas no Brasil. As amostras testadas foram invasivas em células HeLa, e nove delas causaram algum tipo de reação inflamatória quando inoculadas nos olhos de cobaias, no teste Sereny, mas não foram consideradas como tipicamente positivas neste teste. Não foi detectada a produção de nenhum tipo de toxina, de acordo com os testes utilizados na época. Todas as culturas foram hemolíticas em placas de ágar sangue de carneiro e coelho, porém não o foram em placas de ágar sangue humano. Uma das culturas apresentou hemólise completa nas três placas de ágar sangue testadas. Das 12 culturas estudadas, quatro não apresentaram nenhum plasmídio, cinco apresentaram um e três amostras apresentaram dois. Os plasmídios eram de diferentes tamanhos e nove deles estavam presentes em duas ou mais culturas.

JANDA et al. (1991b) relataram a invasão e multiplicação de *Edwardsiella spp* em células HEp-2. Os testes examinados em microscopia

ótica e a análise das células indicaram que 62 % das 13 amostras de *E.tarda* analisadas e algumas culturas de *E.hoshinae* foram invasivas, enquanto as de *E.ictaluri* foram invariavelmente negativas, quanto a esta propriedade.

Em outros estudos realizados amostras de *Edwardisiella tarda* foram invasivas em células HEp-2, além de produzir hemolisina e sideróforos (JANDA et al. 1991a).

A exemplo da que ocorre com *Salmonella enterica* Typhimurium (PORTILLO & FINLAY, 1994) e *Shigella flexneri* (ADAM et al. 1995) que induzem a formação de membranas "ruffles" em células hospedeiras, PHILLIPS et al. (1998), demonstraram durante a invasão de *Edwardsiella tarda* em células HEp-2, a formação de projeções da membrana plasmática assemelhando-se à "ruffles", reforçando as semelhanças que existem entre estas enterobactérias.

STRAUSS et al. (1997) relacionou a capacidade invasiva de *E.tarda* com a atividade hemolítica codificada pelo gene (*ehl*). Neste estudo também demonstrou-se que *E.coli* não patogênica contendo o gene *ehl* invadia células HEp-2 com mais eficiência do que amostras de *E.coli* não hemolíticas.

Pesquisas com as três espécies de *Edwardsiella* foram feitas para avaliar suas propriedades de superfície e morfologia estrutural. Dois principais tipos de adesinas foram presuntivamente detectados por provas de hemaglutinação, identificando-se: Hemaglutinação do tipo 1, inibida por D-manose (microhemaglutinação manose - sensível ou MHMS) e encontrado nas três espécies, e uma hemaglutinação de tipo 2 onde não houve inibição da mesma por D-manose (microhemaglutinação manose - resistente ou

MHMR), sendo a MHMR associada principalmente com amostras de *Edwardsiella tarda*(WONG et al.1989).

REGER et al. (1993) compararam as três espécies de *Edwardsiella* quanto à susceptibilidade a antimicrobianos. Estes estudos mostraram que todas as culturas foram susceptíveis aos agentes quinolônicos testados, para gentamicina e doxiciclina. *E. tarda* e *E. hoshinae* foram resistentes à clindamicina, ao passo que *E. ictaluri* foi moderadamente susceptível. A enzima β-lactamase foi produzida por todas as culturas de *E. tarda*, mas não por *E.hoshinae* e *E. ictaluri.* As três espécies são geralmente susceptíveis a agentes antimicrobianos ativos em bactérias gram-negativas com exceção da colistina e polimixina B. Plasmídios R transferindo resistência às sulfonamidas e tetraciclinas ou sulfonamidas, tetraciclinas, estreptomicina, kanamicina e cloranfenicol, têm sido detectados em *Edwardsiella tarda*. A ocorrência da classe de plasmídios- R transportando sozinhos resistência à tetraciclina, geralmente em amostras isoladas de peixes marinhos e de água doce, também tem sido descrita. Das culturas de *Edwardsiella tarda* e *Edwardsiella ictaluri* estudadas por aqueles autores, 20 % mostraram-se resistentes ao poder bactericida do soro humano, enquanto doze de treze culturas de *Edwardsiella hoshinae* também apresentaram esta propriedade. A soro resistência pode ter portanto um importante papel na patogenicidade destas espécies (REGER et al. 1993).

JANDA & ABBOTT (1993b) também descreveram a produção de uma hemolisina, por *Edwardsiella tarda*, que é parcialmente regulada pela quantidade relativa de ferro, podendo assumir importante papel nas doençaas humanas.

Detecção direta de *Edwardsiella tarda* através da técnica de PCR, utilizando fragmentos de DNA associados a produção de hemolisina, foram descrito por CHEN & LAI (1998).

A pesquisa de mecanismos de virulência de *Edwardsiella tarda*, com exceção dos trabalhos recentemente realizados por pesquisadores chineses sobre a biologia molecular da hemolisina produzida por *E. tarda* isolada de enguias, poucos têm sido os estudos sobre a utilização das técnicas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para estudar fatores de virulência produzidos por esta enterobactéria. A ação citotóxica da maioria das amostras de *E.tarda* tem dificultado os estudos que têm sido feitos em um passado não muito remoto, inclusive no Brasil (MARQUES et al., 1984), para uma possível detecção da produção de enterotoxinas sejam termolábeis (LTs) ou termoestáveis (STs), verocitotoxinas (VT1 e VT2) atualmente modificado para "shiga-like toxins" (Stx), fatores citonecrotizantes (CNFs), produção de adesinas, invasão, produção de aerobactina, sideróforos etc..

Em grande parte, os ensaios biológicos, feitos especialmente em linhagens celulares, foram prejudicados pelo poder invasivo e por produção de efeito muito citotóxico para as células HeLa. Como se daria, então, o contato das diferentes cepas de *E. tarda* com a célula hospedeira, ou linhagens celulares , tais como HeLa e HEp-2? Teria a *Edwardsiella tarda* capacidade de produzir LT? Esta toxina embora relegada a um segundo plano nos estudos epidemiológicos das Salmonelas, já foi descrita nesta bactéria (PESTANA DE CASTRO ,comunicação pessoal).

Apesar de ser uma bactéria invasora, apresentaria a *Edwardsiella tarda* o fenômeno "attaching effacing"(A/E) com ou sem presença de gene *eae*A? Sabe-se que *Listeria* sp (SVANBORG et al.,1996), *Helycobacter pilori*

(DYTOC et al., 1993) e *Micoplasma penetrans* podem apresentar o fenômeno A/E, mas a pesquisa do gene *eae*A e da região LEE (GIRON et al. 1996) poderia significar a presença de uma adesina relacionada à intimina de EPEC, ou do tipo " attaching effacing *Escherichia coli*" ou AEEC, descritas em coelhos ou "Porcine EPEC (PEPEC)" , estas últimas relatadas em amostras de *Escherichia coli* isoladas de suínos no Canadá, em especial aquelas pertencentes ao sorogrupo O45: K: " 65".

Muitos métodos genotípicos têm sido utilizados na caracterização bacteriana ou nos estudos taxonômicos. As técnicas mais usadas atualmente são: RFLP (Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição) (LIU et al., 1995), eletroforese de campo pulsado (BRIAN et al.,1993), Ribotipagem (CAVÉ et al., 1994) e RAPD (Análise da amplificação randômica do DNA polimórfico) (PACHECO et al.,1998). Esta última, realizada neste trabalho, é uma técnica de tipagem molecular rápida que consiste em um PCR modificado, onde uma pequena e aleatória seqüência de oligonucleotídeo é usada como iniciador para amplificar regiões através do genoma, originando fragmentos de DNA característicos da composição genômica do organismo (WILLIAMS et al. 1990 e BANDO et al. 1998).

Neste trabalho fizemos um estudo comparativo entre amostras de *E.tarda* isoladas de homens e de peixes, usando como parâmetros os testes de adesão e invasão em células HeLa, Microhemaglutinação manose – resistente (MHMR), produção de hemolisina, fatores de virulência através da técnica de PCR que têm sido pouco usada no estudo desta enterobactéria, bem como uma análise genotípica utilizando a técnica RAPD

Embora, a realização de testes biológicos, com algumas de nossas amostras de *Edwardsiella tarda*, já tenham sido feitas no passado por outros

autores (BOCKEMÜHL et al. 1971; JANDA & ABBOTT, 1993(a)(b); JANDA et al., 1991(a)(b); MARQUES et al. 1984), o estudo de fatores de virulência usando a técnica de PCR não tem sido utilizada e assim poderíamos detectar nesta bactéria- e não custa lembrar que *E.tarda* é uma enterobactéria- mecanismos de virulência iguais ou pelo menos relacionados aos encontrados na família *Enterobacteriaceae* .

2 – Objetivos

2.1.- Isolar amostras de *Edwarsiella tarda* de peixes de água doce, com ou sem sintomatologia de enfermidades causadas por esta bactéria nestes animais.

2.2.- Estudar bioquimicamente estas amostras para tentar detectar biotipos diferentes, em especial do biogrupo I.

2.3.- Estudar estas amostras quanto à presença de fatores de virulência que possam ser detectados diretamente ou indiretamente por ensaios biológicos e técnicas moleculares fundamentalmente por PCR, averiguando as seguintes características: produção de enterotoxinas, produção de hemolisinas; detecção de prováveis adesinas microhemaglutinantes na presença de D-manose; adesão e invasão em células HeLa; produção de citotoxinas do tipo Stx ou VT ou VT-"like" ou ainda do tipo dos CNFs; detecção de aerobactina e produção de colicina V nas diferentes amostras a serem estudadas.

2.4.- Reestudar bioquimicamente e pelas técnicas mencionadas no item anterior as 31 amostras de *Edwardsiella tarda* isoladas de espécimes humanos (24 delas cedidas pelo Prof. Dr. L.R. Trabulsi da Fundação Instituto Butantã e pela Profa. Dra. Lilian Marques, do Instituto Adolpho Lutz e 7 cedidas pelo Dr. Janda (USA).

2.5.- Realizar estudo semelhante com 12 amostras de peixes, enviadas por outros pesquisadores e aquelas que foram isoladas por nós, quanto à presença de fatores de virulência, mencionados em 2.3.

2.6.- Comparar as amostras através da análise genética (RAPD), podendo assim estabelecer uma relação clonal entre elas.

2.7.- Fazer um estudo comparativo, o mais detalhado possível, dos resultados obtidos com as amostras de origem humana e de peixes, a nível fenotípico e molecular .

3 - Material e Métodos

3.1 – Amostras Padrão

3.1.1 – Amostras Produtoras de Toxinas (cedidas pelo Prof. Dr. Jorge Blanco)

Escherichia coli O157-156→ Enterohemolisina - PCR

Escherichia coli FVL-2 → Hemolisina - PCR

Escherichia coli 40T → LT-1 - PCR

Escherichia coli O3:H12 e O44:H12 → EAST-1 - PCR

Escherichia coli O157-157 → STx1 - PCR

Escherichia coli O157-157 → STx2 - PCR

Escherichia coli FLV-1 → CNF - PCR

Escherichia coli FLV-1 → CNF1 - PCR

Escherichia coli B51 e CCB37 → CNF2 - PCR

Escherichia coli FVL-2 → AER - PCR

Escherichia coli LTR3 → EI - PCR

Escherichia coli O157-157 e FV154 → EAE – PCR

Escherichia coli FV174 → EAF - PCR

3.1.2. - Amostras Padrão de Aderência

Escherichia coli E 2348/69 (EPEC) → Aderência Localizada

Escherichia coli O8 TR 302/4 (DAEC) → Aderência Difusa

Escherichia coli O431-1 (EAggEC) → Aderência Agregativa

3.1.3. – Amostras Padrão de Fator de Colonização

Escherichia coli K99+ → K99

Escherichia coli Pr-4787 O115:H $^{-}$ K165+ →F165

Escherichia coli K88+ → K88

Escherichia coli 603A O9: H $^{-}$:K $^{-}$987p+ → 987P

Escherichia coli B41M → F41

Escherichia coli 567/7 O8:H $^{-}$ → F42

Escherichia coli ATT25 → F17

3.1.4. – Amostra Padrão de Invasão

Shigella dysenteriae

3.1.5. - Controle Negativo

Escherichia coli C600 (K12) → negativa para todos os testes

3.2 – Amostras Estudadas

Conforme discriminado na Tabela 2 foram estudadas 31 amostras de *E. tarda* originárias de infecções humanas, das quais algumas foram isoladas pela Profa. Dra. Lilian R.M. Marques e pelo Prof. Dr. L. Rachid Trabulsi. Outras, originárias do C.D.C., Atlanta, Georgia, USA, foram cedidas pelo Prof. Dr. Trabulsi e outras foram enviadas pelo Prof. Dr. M. J. Janda do "Department of Health Services" da California USA. Outras isoladas de peixes foram enviadas por vários pesquisadores, e outras de peixes foram por nós isoladas, na região de Campinas em Mogi-Guaçu S.P.,. Todas as amostras foram submetidas às provas bioquímicas de EPM, MILi e Citrato.

Tabela 2. Amostras de *Edwardsiella tarda* de origem humana e de peixes que formam estudadas nesta pesquisa

AMOSTRAS	ORIGEM	CEDIDAS POR
2	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
3	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
4	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
5	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
6	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
7	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
8	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
9	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
10	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
11	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
13	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
14	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
15	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
16	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
17	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
18	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
19	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
20	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
21	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
22	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
23	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
25	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
26	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
27	humana	Dr L.R. Trabulsi (Brasil)
ET-1	fezes humana	Dr J. M. Janda (USA)
ET-2	fezes humana	Dr J. M. Janda (USA)
ET-11	fezes humana	Dr J. M. Janda (USA)
ET-12	fezes humana	Dr J. M. Janda (USA)
ET-13	Abscesso perianal humano	Dr J. M. Janda (USA)
ET-14	fezes humana	Dr J. M. Janda (USA)
ET-15	Sangue humano	Dr J. M. Janda (USA)
EDK-1	Ictalurus puntactus(Japão)	Dr Alicia Toranzo (Espanha)
KGE-7901	Tilapia nilotica (Japão)	Dr Alicia Toranzo (Espanha)
9.8	Morone saxatilis(USA)	Dr Alicia Toranzo (Espanha)
FL4-53-4K	Morone saxatilis (USA)	Dr Alicia Toranzo (Espanha)
FL3-22	peixe anjo	Dr Alicia Toranzo (Espanha)
NCIMB 2034	peixe(espécie desconhecida)	Dr Alicia Toranzo (Espanha)
FL7-88-3	Tilapia	Dr Ana M. Baya (USA)
FL6-60	Peixe	Dr Ana M. Baya (USA)
FL5-60-2	Peixe	Dr Ana M. Baya (USA)
12116	Peixe	Dr Harirakan (Canada)
14876	Peixe	Dr Harirakan (Canada)
17570	Peixe	Dr Harirakan(Canada)
T10A	Tilápia	Esta pesquisa
T1A	Tilápia	Esta pesquisa
T17B	Tilápia	Esta pesquisa
T15B	Tilápia	Esta pesquisa
PCA	Pacu	Esta pesquisa
P	Pacu	Esta pesquisa
T24C	Tilápia	Esta pesquisa
T19A	Tilápia	Esta pesquisa
T11B	Tilápia	Esta pesquisa
T18D	Tilápia	Esta pesquisa

3.3 – Manutenção das Amostras

Durante o desenvolvimento deste trabalho, todas as amostras de *E. tarda* foram mantidas em meio TSA ("Triptic Soy Agar" – DIFCO)

3.4 - Isolamento e identificação preliminar das amostras de *E. tarda* da região de Campinas, SP.

Foram examinados 143 peixes de diferentes procedências (mercados, peixarias e coletados em rios da região de Campinas). Destes apenas 7 eram de "água salgada". Trabalhamos quase que exclusivamente com peixes de "água doce" dos quais o isolamento de *E. tarda* parece ser bem mais comum. Para tal, foram utilizados os seguintes materiais e métodos:

a) Conteúdo intestinal:

1) Foi semeado em meio de Selenito(Oxoid) e incubado por 24 h a 37°C. Suspensão a 10 % de fezes de peixes em tampão salina fosfatada 0,1M (PBS) foi também semeada diretamente em placas de Petri com os meios seletivos para o isolamento de enterobactérias, em especial MacConkey(MC), e SS de procedência comercial, Oxoid, Difco ou similar, sendo estas também incubadas como descrito acima;

2) A partir da semeadura dos materiais em meio de Selenito, foi feito plaqueamento nos meios de MC e SS. As colônias que se comportaram como lactose negativas e produziram H_2S no meio de SS, foram identificadas pela semeadura em meios de EPM, MILi e citrato(Difco). Quando necessário, foram realizados testes complementares, como fermentação de carboidratos (glicose, sacarose, maltose, sorbitol, manose, rafinose, salicina, lactose e manitol), reação de VM (vermelho de

metila), atividade da ornitina decarboxilase (meio comercial MIO da Difco) e fenilalanina. Procuramos selecionar testes positivos e negativos para maior segurança da identificação e para uma possível determinação de biotipos.

b) Isolamento de vísceras de peixes:

De cada peixe coletado, seja em pescarias, mercados ou em poços de piscicultura, frescos ou congelados, durante a necrópsia, para a coleta de fezes, foram antecipadamente separados fragmentos de fígado, rins e baço, que foram triturados em gral estéril, fazendo-se uma suspensão de aproximadamente 10 % em PBS. A partir desta foram feitas semeaduras do mesmo modo como descrito para o exame do conteúdo intestinal. Durante a necropsia, os órgãos foram examinados quanto a presença de lesões, em especial, abscessos

3.5 - Adesinas

A pesquisa de adesinas, usando teste de microhemaglutinação manose- resistente (MHMR),foi feita utilizando a metodologia de OLIVEIRA et al., 1991. As amostras a serem testadas foram cultivadas por 18 horas, utilizando os meios CFA, Minca e TSA, procedendo-se a hemaglutinação frente a eritrócitos de : cavalo, humano, cobaia, carneiro, galinha e boi.

O teste de MHMR foi realizado da seguinte maneira: na primeira fileira (A) da placa de microtítulo de fundo em "U", foram colocados 100 µl de PBS (PBS acrescido de 0,5 % de D-manose) e nas demais fileiras, 50 µl. Com o auxílio de um palito (palito de madeira estéril) foi raspado da cultura da placa de Petri, o induto bacteriano de cada cultivo e diluiu-se os mesmos na primeira cavidade de cada fileira da microplaca contendo 100 µl de PBS,

seguindo-se leve agitação para homogeneização. Foram feitas diluições a partir da primeira concavidade até a última, de cada fileira, dispensando os últimos 50 µl para que todas elas ficassem com o mesmo volume (50 µl). Assim , da primeira até a última concavidade, tínhamos as seguintes diluições 1:2, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256. Em seguida, em todas as cavidades, foram acrescentados 50 µl da hemácia (que foram lavadas previamente 2 vezes em salina 0,15 M (10min. a 1.800r.p.m.) e uma vez com PBS, e diluídas a 1 % em tampão PBS com 0,5% de D-manose). A placa de microtítulo foi agitada levemente e incubada a 4°C por 1 hora. Após este período foi realizada a leitura, sendo positivas as amostras onde as hemácias se apresentaram como uma tênue rede depositada no fundo da concavidade e negativas as amostras onde as hemácias se sedimentaram no fundo da concavidade, formando um "botão".

3.6 - Pesquisa da produção de Hemolisina

A detecção qualitativa da produção de hemolisina foi realizada conforme recomendado por JANDA & ABOTT (1993), utilizando para tal quatro métodos diferentes:

3.6.1 - Método em Picada (P) - O meio BHI (Difco) acrescido de 12% de ágar e 1% de eritrócitos humanos do grupo A (HUA), foi distribuído em placas de Petri, e inoculado, por picada, com as amostras de *E. tarda*. As placas foram incubadas a 37°C por 18-20h;

3.6.2 - Método de ágar sobrecamada (overlay) (AO) – As suspensões bacterianas foram semeadas em meio de ágar Luria, semeadura esta feita

pelo sistema de "spot". Após incubação nas condições acima citadas, em cada placa foi vertido ágar semi-sólido (0,65 %), contendo 1 % de hemácias HUA. As placas foram reincubadas por 37°C, durante 4 h, só então procedeu-se a leitura para presença ou ausência de halo de hemólise;

3.6.3 - Método da hemolisina de contato (CH) e **Método da presença de hemolisina solúvel (HS)** foram realizados com as amostras de *E tarda* semeadas em meio líquido. Assim sendo, cada amostra de *E. tarda* foi semeada em tubos contendo caldo triptona, os quais foram incubados por 18-20 h a 37°C. Depois da incubação cada cultura foi dividida em duas porções. Para o teste de CH, 100 µl das culturas em caldo foram misturados com 100 µl de uma suspensão a 2 % de HUA, em PBS, numa placa de microtítulo de 96 concavidades. Após incubação por 1 h a 37°C, cada cavidade foi examinada para a presença de sinais macroscópicos de hemólise. Para o teste de hemolisina solúvel, o restante das culturas foi filtrado em filtros de 0,45 µm (Millipore) e os filtrados livres de células bacterianas, foram testados para a presença de hemolisina, como descrito para o método anterior.

3.7 - Adesão a células HeLa

3.7.1 – Preparo das Amostras Bacterianas

As amostras de *Edwardsiella tarda*, bem como as amostras padrão foram semeadas em TSB (DIFCO) e incubadas por 18 horas a 37°C.

3.7.2 – Preparo das Células HeLa

Este teste foi realizado com as células HeLa (Carcinoma epitelial de cérvix humano, ATTCC:CCL2), mantidas e repicadas no Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, nos procedimentos adotados pelo laboratório sob coordenação da Profª Dra. Maria Silvia Viccari Gatti.

A metodologia utilizada foi descrita por SCALETSKY et al.(1984) com algumas modificações. As células foram cultivadas em microplacas (Falcon,USA) com 24 orifícios em atmosfera de CO_2 , contendo 1ml de meio Eagle (M.E.M.) acrescido de 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (50% penicilina e 50% estreptomicina).

A estas microplacas previamente foram colocadas lamínulas redondas esterilizadas de 13mm de diâmetro em cada orifício.

O crescimento das monocamadas foi acompanhado pela observação após 24-48 horas em microscópio invertido. A cultura era considerada ideal para o teste quando as células apresentavam cerca de 50% ou mais de confluência da monocamada e apresentavam baixa refringência, sem deslocamento.

3.7.3 - Adesão

Após a formação da monocamada celular, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com tampão PBS estéril e em cada orifício foram adicionados 0,9 ml de MEM. Em seguida, cada amostra bacteriana crescida por 18 horas em TSB (DIFCO) foi adicionada a cada orifício na quantidade de 0,1 ml. A placa foi incubada por 1h a 37°C e, após este período, lavada 10 vezes com 1 ml de PBS por orifício. As lamínulas foram fixadas com metanol por 10 minutos

e coradas com May-Grünwald (5 minutos) e Giemsa (20 minutos) e observadas em microscópio ótico com objetiva de imersão.

3.8 - Invasão a células HeLa

A capacidade invasora das amostras de *E. tarda* isoladas de infecções humanas e de peixes foi avaliada em células HeLa, o preparo das amostras bacterianas e o preparo das células HeLa foi feito conforme descrito nos itens 3.7.1 e 3.7.2.

O desenvolvimento do teste foi baseado nos trabalhos de MARQUES et al. (1984) e JANDA et al. (1991). Após a formação da monocamada celular, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com tampão PBS esterilizado e em cada orifício foram adicionados 0,9 ml de MEM. Em seguida, cada amostra bacteriana crescida por 18 horas em caldo simples foi adicionada a cada orifício na quantidade de 40µl.

A placa foi incubada por 50 minutos a 37°C e, após este período, lavada 10 vezes com 1 ml de PBS por orifício. Foi adicionado novamente 1 ml de MEM em cada orifício, contendo 2% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina, gentamicina (50µl/ml) e lisozima (300µg/ml), para eliminar as bactérias que não foram removidas com as lavagens.

A placa foi novamente incubada por 50 minutos a 37°C e depois lavada por 6 vezes com 1ml de PBS. As lamínulas foram fixadas com metanol por 10 minutos e coradas com May-Grünwald (5 min) e Giemsa (20 min) e observadas em microscópio ótico com objetiva de imersão.

Todas as amostras foram testadas em duplicata. A invasão foi constatada quando ao redor das bactérias era visualizada uma área clara, lembrando um vacúolo.

3.9.- Pesquisa de produção de bacteriocinas (colicinas)

O teste baseou-se na inibição do crescimento de amostras de *E. tarda* através da produção de colicina V, segundo AKUTSU et al. (1989); GRIMONT et al. (1980) e KONISTY, (1982).

As amostras de *E. tarda* (supostas produtoras) foram semeadas em 4 ml de caldo LB e incubadas por 18 h a 37°C. Em seguida, foram adicionados 500 µl de cada pré-cultura nas concavidades de um carimbo padrão, idêntico ao usado para as provas de sensibilidade aos antimicrobianos. As placas contendo meio LA foram carimbadas e incubadas por 18 h a 37°C.

Após este período adicionou-se 5 ml de clorofórmio nas tampas das placas, que foram mantidas fechadas por 40 minutos para a inativação das bactérias. Em seguida as placas ficaram semi-abertas a 37°C para total evaporação do clorofórmio.

Uma alíquota de 100 µl de cada amostra indicadora de coligenicidade foi adicionada em 4 ml de meio LA semi-sólido, resfriado a 45 °C, que foi vertido sobre cada placa, que após solidificação foi incubada por 18 h a 37°C.

A formação de halos de inibição do crescimento da cultura indicadora ao redor do cultivo bacteriano inoculado inicialmente, indica a produção de colicinas.

As amostras de *Escherichia coli* indicadoras de colicinas utilizadas foram as seguintes:

22R80.....**todos os tipos de colicinas**

BZB 2101.....**col.A**

20R996.....**col.B**

BZB 2103.....col.D

BZB 2104.....col.E1

BZB 2125.....col.E2

BZB 2107.....col.E4

BZB 2109.....col.E6

BZB 2110.....col.E7

22R82.....col.Ia

20R914.....col.K

BZB 2123.....col.N

20R915.....col.BeV

3.10 - Coloração Negativa

As amostras submetidas a este teste foram: ET-2, 16, 27(isoladas de humanos), KGE-7901 e 9.8 (isoladas de peixes). Em uma folha de parafina foi colocado, respectivamente:

- Uma gota da suspensão de *Edwardsiella tarda* a ser observada
- Uma gota do ácido fosfotúngstico a 4% (PTA)

Com o auxílio de uma pinça, a tela de 200"mesh" recoberta por uma membrana de suporte sólida (FORMVAR-CARBONO), foi colocada sobre a gota da suspensão bacteriana e deixada por 2 minutos, o excesso foi retirado com papel de filtro e a tela ficou secando por mais dois minutos. Em seguida a tela foi colocada sobre a gota de PTA por 2 minutos e deixada secar por 2 horas (Técnicas de Microscopia Eletrônica,1982).

A observação foi feita em microscópio eletrônico (LEO 906).

3.11 – Pesquisa de Fatores de Virulência por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

A técnica de PCR é uma poderosa ferramenta disponível para a Biologia Molecular. Esta técnica é usada para amplificar "in vitro" um número de cópias específicas de uma seqüência de DNA de dupla fita. A reação é baseada na variação cíclica de temperatura na presença de DNA, iniciadores, dNTPs e uma DNA polimerase estável a altas temperaturas.

Geralmente são realizados de 25 a 40 ciclos de amplificação, no nosso caso foram utilizados 30 ciclos, sendo cada ciclo composto pela temperatura de denaturação (geralmente 94°C), temperatura de anelamento (depende da homologia, extensão e quantidade de GC do iniciador) e temperatura de alongamento (geralmente 72°C), onde a nova fita de DNA é sintetizada (XU & LARZUL 1991).

Durante cada ciclo, fitas de DNA complementares à de interesse são copiadas em sua extensão por iniciadores, que hibridam com a fita oposta e flanqueiam a região de interesse do DNA alvo. Teoricamente, cada nova molécula de DNA sintetizada é usada com molde no ciclo seguinte, resultando o PCR em uma acumulação exponencial de um fragmento específico de uma fita dupla de DNA flanqueado por 2 iniciadores.

Pode-se fazer o teste com DNA purificado ou diretamente da cultura bacteriana.

3.11.1 - Pesquisa de Enterohemolisina e Hemolisina

Como se sabe *E.tarda* produz uma potente hemolisina, conforme foi estudado no item 3.6. Esta hemolisina assim como hemolisinas de outras bactérias podem destruir o tapete de células Vero e Y-1, e nas amostras

invasivas de *E. tarda* também ocorre este fenômeno, prejudicando consequentemente a leitura dos testes biológicos para verotoxinas e enterotoxinas. Deste modo a utilização do teste de PCR usando iniciadores de *E.coli* , poderia nos trazer resultados interessantes.

O teste foi realizado segundo metodologia utilizada por BLANCO *et al.*(1997b), com algumas modificações. Inicialmente, procedeu-se o crescimento das amostras bacterianas em placas de TSA (Difco) a 37°C por 18 horas.

O DNA bacteriano foi preparado mediante a coleta deste crescimento com o auxílio de ponteiras novas e esterilizadas e foi misturado a 100μl de água Milli-Q esterilizada, contida em tubos do tipo "eppendorf".

Este raspado bacteriano foi, a seguir, fervido por 10 minutos para romper a parede bacteriana e iniciar a desnaturação do DNA. Para evitar o anelamento do DNA já desnaturado, os tubos foram colocados em banho de gelo para serem utilizados em seguida.

Os iniciadores utilizados para pesquisa de Enterohemolisina (SCHMIDT et al. 1995) foram:

Ent HLY HLY A1 GGT GCA GCA GAA AAA GTT GTA G
HLY A4 TCT CGC CTG ATA GTG TTT GGT A

Estes iniciadores amplificam uma região de 1.551 pares de bases.

Em um tubo de microcentrífuga (500μl) foram adicionados os componentes abaixo:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10μl	1x
10mM dNTP mixture	2μl	0.2 mM cada
50mM $MgCl_2$	3μl	1.5 mM
Iniciadores(10μM cada)	1 - 8.0μl 2 - 7.0μl	0.5 μM cada
DNA molde	10μl	
Taq DNA polimerase (5U/μl)	0.5μl	2.5 U
H_2O Milli-Q esterilizada	60μl	
TOTAL	100μl	

Antes de adicionar a Taq DNA polimerase, a reação foi incubada a 95°C por 10 minutos para desnaturação do DNA.

O termociclador (MJ Reseach Modelo PTc- 150-16, USA) foi programado para 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 2 minutos na temperatura de anelamento de 62°C e 1 minutos a 72°C.

Para observação do produto amplificado, foi utilizada eletroforese em gel de agarose a 1% preparado em tampão TBE e submetidos a uma diferença de potencial de 100 volts. Cada corrida eletroforética continha um marcador de peso molecular (1kb Ladder - Gibco BRL) para referência.

Todas as reações foram acompanhadas do padrão negativo K12 - C600. Em cada orifício do gel foi aplicado 10μl de uma solução que continha 10μl da reação de PCR e 3μl do tampão de ressuspensão (Apêndice). Após a corrida, os géis foram mergulhados em solução de Brometo de Etídio (0,5μg/ml) por 20 minutos, e observados em transiluminador ("High Performance Ultraviolet Transilluminator UVP – Ultra Violet Products")

As demais reações de PCR seguiram o mesmo padrão, mudando-se evidentemente a seqüência de iniciadores, a temperatura de anelamento, e o tamanho do fragmento a ser amplificado, que foram discriminados para cada

uma das reações abaixo descritas. Para o teste de identificação de hemolisina foram utilizados os seguintes iniciadores:

HLY HLY1 (13 A) AAC AAG GAT AAG CAC TGT TCT GGC T

HLY2 (13 B) ACC ATA TAA GCG GTC ATT CCC GTC A

Estes iniciadores amplificam uma região de 1.177 pb. Foram usadas as seguintes temperaturas: 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 66°C e 1 minuto a 72°C. Cada amostra foi tratada da seguinte forma:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10µl	1x
10mM dNTP mixture	2µl	0.2 mM cada
50mM $MgCl_2$	3µl	1.5 mM
Iniciadores(10µM cada)	1 - 8.5µl 2 – 8.0µl	0.5 µM cada
DNA molde	10µl	
Taq DNA polimerase (5U/µl)	0.5µl	2.5 U
H_2O Milli-Q esterilizada	59µl	
TOTAL	100µl	

3.11.2 - Pesquisa de Enterotoxinas

A detecção da produção de enterotoxinas por testes em cultura de células é prejudicada em *Edwardsiella tarda*, por causa da produção de hemolisina. Deste modo, foi necessário verificar se as nossas amostras de *Edwardsiella tarda*, mencionadas na Tabela 2, teriam seqüências genéticas homólogas ou relacionadas a aquelas responsáveis pela codificação de fatores de virulência em *Escherichia coli*, uma vez que sua expressão, detectável por testes biológicos, poderia estar mascarada. Assim, os

iniciadores que se seguem foram usados na detecção dos fatores de virulência e são comuns em diferentes virotipos de *Escherichia coli*. Como utilizamos iniciadores para a amplificação de seqüências genéticas desta última bactéria, os controles positivos foram em todos os testes, amostras padrão de *Escherichia coli* portadoras das mesmas.

Todas estas amostras, bem como a metodologia utilizada, seguiram protocolos gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Jorge Blanco, Laboratório de Referência em *Escherichia coli* (LREC), da Faculdade de Veterinária da Universidade de Santiago de Compostela, Espanha. Para LT-1 foram utilizados os seguintes iniciadores:

LT-I LTI-1 GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC

LTI-2 CCG AAT TCT GTT ATA TAT GTC

Estes amplificam uma seqüência de 696 pb (SCHULTSZ et al. 1994). Foram usadas como temperaturas: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C e 1 minuto a 72°C, foi incluída como amostra padrão para esta reação a amostra de *Escherichia coli* 40T. Cada amostra foi tratada da seguinte forma:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10µl	1x
10mM dNTP mixture	2µl	0.2 mM cada
50mM $MgCl_2$	3µl	1.5 mM
Iniciadores(10µM cada)	1 - 6,5 µl 2 - 6,5 µl	0.5 µM cada
DNA molde	10µl	
Taq DNA polimerase (5U/µl)	0.5µl	2.5 U
H_2O Milli-Q estéril		
TOTAL	100µl	

EAST-1 EAST-1 1a CCA TCA ACA CAG TAT ATC CGA

EAST-1 1b GGT CGC GAG TGA CGG CTT TGT

Estes amplificam uma seqüência de 111pb; usou-se o ciclo: 95°C (30 s), 55°C (2 min) e 72°C (2 min) (YAMAMOTO & ECHEVERRIA, 1996). Cada amostra foi tratada da seguinte forma:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10µl	1x
10mM dNTP mixture	2µl	0.2 mM cada
50mM $MgCl_2$	3µl	1.5 mM
Iniciadores(10µM cada)	1 – 6.0µl 2 – 7.0µl	0.5 µM cada
DNA molde	10µl	
Taq DNA polimerase (5U/µl)	0.5µl	2.5 U
H_2O Milli-Q esterilizada		
TOTAL	100µl	

3.11.3 - Pesquisa de Shiga toxina (Stx) (BLANCO J.E. et al. 1996) e Fatores citonecrotizantes (CNFs) (BLANCO M.. ET AL. 1996)

Stx1→Stx1-A CAG TTA ATG TGG TGG CGA AG

Stx1-B CTG CTA ATA GTT CTG CGC ATC

Estes amplificam uma seqüência de 894 pb, sendo o ciclo composto de: 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 55°C e 1 minuto a 72°.

Cada amostra foi tratada da seguinte forma:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10µl	1x
10mM dNTP mixture	2µl	0.2 mM cada
50mM $MgCl_2$	3µl	1.5 mM
Iniciadores (10µM cada)	1 – 7.0µl 2 – 6.5µl	0.5 µM cada
DNA molde	10µl	-
Taq DNA polimerase (5U/µl)	0.5µl	2.5 U
H_2O Milli-Q estéril	61µl	
TOTAL	100µl	

Stx2→Stx2-A CTT CGG TAT CCT ATT CCC GG

Stx2-B GGA TGC ATC TCT GGT CAT TG

Estes amplificam uma seqüência de 478 pb, sendo usada como temperaturas 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 55°C e 1 minuto a 72°C. Cada amostra foi tratada da seguinte forma:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10µl	1x
10mM dNTP mixture	2µl	0.2 mM cada
50mM $MgCl_2$	3µl	1.5 mM
Iniciadores (10µM cada)	1 – 6.0µl 2 – 6.5µl	0.5 µM cada
DNA molde	10µl	
Taq DNA polimerase (5U/µl)	0.5µl	2.5 U
H_2O Milli-Q estéril	62µl	
TOTAL	100µl	

CNF (geral) CNF-A C TGG ACT CGA GGT GGT GG

CNF-B CT CCT GTC AAC CAC AGC C

Estes amplificam uma seqüência de 533 pb. Foram utilizadas como temperaturas 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 65°C e 1 minuto a 72°C. A concentração dos iniciadores foi de 50pmol.

CNF1 CNF1-A GAA CTT ATT AAG GAT AGT

CNF1-B CAT TAT TTA TAA CGC TG

Estes amplificam uma seqüência de 543 pb. Foram usadas como temperaturas 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 48°C e 1 minuto a 72°C. A concentração dos iniciadores foi de 50 pmol.

CNF2 CNF2-A AAT CTA ATT AAA GAG AAC

CNF2-B CAT GCT TTG TAT ATC TA

Estes amplificam uma seqüência de 543 pb, sendo utilizadas como temperaturas 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 48°C e 1 minuto a 72°C. A concentração dos iniciadores foi de 50 pmol. As amostras testadas para CNF geral, CNF1 e CNF2 foram tratadas da seguinta forma:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10μl	1x
10mM dNTP mixture	2μl	0.2 mM cada
50mM $MgCl_2$	3μl	1.5 mM
Iniciadores(10μM cada)	1 – 6.0μl 2 – 6.0μl	0.5 μM cada
DNA molde	10μl	
Taq DNA polimerase (5U/μl)	0.5μl	2.5 U
H_2O Milli-Q estéril	63μl	
TOTAL	100μl	

3.11.4 - Detecção de Aerobactina

A E R AER1 TAC CGG ATT GTC ATA TGC AGA CCG T
AER2 AAT ATC TTC CTC CAG TCC GGA GAA G

Estes amplificam uma seqüência de 602 pb (YAMAMOTO et al. 1995) , sendo usadas como temperaturas 1 minuto a 94°C, 1 minutos a 63°C e 1 minuto a 72°. Cada amostra foi tratada da seguinte maneira:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10µl	1x
10mM dNTP mixture	2µl	0.2 mM cada
50mM $MgCl_2$	3µl	1.5 mM
Iniciadores (10µM cada)	1 – 8.0µ 2 – 8.0µl	0.5 µM cada
DNA molde	10µl	
Taq DNA polimerase (5U/µl)	0.5µl	2.5 U
H_2O Milli-Q estéril	59µl	
TOTAL	100µl	

3.11.5 - Pesquisa de adesão e invasão

Levando-se em conta que *E.tarda* além de aderir também invade células HeLa e HEp-2, e considerando que tínhamos iniciadores disponíveis, ainda por PCR, verificamos a presença do gene *eae*A que codifica para proteína intimina, envolvida na produção da lesão ättaching effacing", presença de seqüências homólogas do plasmídeo EAF, além da invasão (EI) de *E.coli* enteroinvasiva (EIEC).

Como o processo de invasão e destruição das linhagens celulares é muito rápido não há dúvida que algum processo de adesão ocorre

preliminarmente e não se torna visível por testes biológicos, por causa da hemolisina produzida por *E. tarda.*

A utilização de iniciadores para a pesquisa do gene *eae*A e para presença do plasmídeo EAF foi feita por PCR, uma vez que, como já falamos acima, a rápida destruição do tapete celular dificulta ou mesmo impossibilita a utilização de testes biológicos para esta finalidade.

EIEC→EI1(6 A) GCT GGA AAA ACT CAG TGC CT

EI2(6 B) CCA GTC CGT AAA TTC ATT CT

Estes amplificam uma seqüência de 424 pb (BEUTIN et al. 1997), sendo o ciclo de: 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 55°C e 1 minuto a 72°C. Cada amostra foi tratada da seguinte maneira:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10µl	1x
10mM dNTP mixture	2µl	0.2 mM cada
50mM $MgCl_2$	3µl	1.5 mM
Iniciadores (10µM cada)	1 – 7.0µl 2 – 6.5µl	0.5 µM cada
DNA molde	10µl	
Taq DNA polimerase (5U/µl)	0.5µl	2.5 U
H_2O Milli-Q estéril	61µl	
TOTAL	100µl	

EAE→EAE-1 ACG TTG CAG CAT GGG TAA CTC

EAE-2 GAT CGG CAA CAG TTT CAC CTG

Estes amplificam uma seqüência de 815 pb (BLANCO J.E. et al. 1996), foram usadas como temperaturas 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 56°C e 1 minuto a 72°C. Cada amostra foi tratada da seguinte forma:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10µl	1x
10mM dNTP mixture	2µl	0.2 mM cada
50mM $MgCl_2$	3µl	1.5 mM
Iniciadores (10µM cada)	1 – 7.0µl 2 – 7.0µl	0.5 µM cada
DNA molde	10µl	
Taq DNA polimerase (5U/µl)	0.5µl	2.5 U
H_2O Milli-Q estéril	61µl	
TOTAL	100µl	

EAF EAF1(5 A) CAG GGT AAA AGA AAG ATG ATA A

EAF25(5B) TAT GGG GAC CAT GTA TTA TCA

Estes amplificam uma seqüência de 397 pb (FRANKE J. et al. 1994), sendo usadas como temperaturas 1 minuto a 94°C, 1 minutos a 54°C e 1 minuto a 72°C. Cada amostra foi tratada da seguinte forma:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
10x PCR buffer	10µl	1x
10mM dNTP mixture	2µl	0.2 mM cada
50mM $MgCl_2$	3µl	1.5 mM
Iniciadores(10µM cada)	1 – 9.0µl 2 – 7.5µl	0.5 µM cada
DNA molde	10µl	
Taq DNA polimerase (5U/µl)	0.5µl	2.5 U
H_2O Milli-Q estéril	57µl	
TOTAL	100µl	

3.12 - Análise da Amplificação Randômica do DNA Polimórfico – RAPD (Williams et al., 1990)

O RAPD inicialmente descrito por WILLIAMS et al., 1990 , consiste em uma outra análise do DNA polimórfico baseado na técnica de PCR (já descrita anteriormente) , mas distinto desta por se basear na amplificação do DNA genômico utilizando iniciadores com uma seqüência arbitrária de nucleotídeos.

3.12.1 – Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada segundo metodologia fornecida pela Promega para o Kit Wizard® Genomic DNA Purification. O DNA foi quantificado através da eletroforese horizontal em gel de agarose a 1% e corado com brometo de etídio. Após esta quantificação, as amostras foram diluídas em alíquotas de 2 ng/μl de DNA em água MilliQ estéril e estocadas a -20°C. As alíquotas utilizadas mais freqüentemente foram estocadas a 4°C.

3.12.2 – Reação de RAPD (BANDO et al.,1998)

De um total de nove iniciadores utilizados, três foram escolhidos por evidenciarem um maior polimorfismo de bandas, são eles:

OPR – 06 GTCTACGGCA
OPR – 08 CCCGTTGCCT
OPR – 09 TGAGCACGAG

A reação de amplificação foi realizada em tubos de 200μl com um volume final de 20μl. Cada amostra foi tratada da seguinte forma:

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
50mMPCR buffer	2μl	10x
200mM dNTP mixture	0.4μl	0.2 mM cada
50mM $MgCl_2$	1μl	2,5 mM
Iniciadores(4μM cada)	2μl	0.4 μM cada
DNA molde(5ng/μl)	2μl	10ng
Taq DNA polimerase (5U/μl)	0,3μl	1.5 U
H_2O Milli-Q estéril	12.3μl	
TOTAL	20μl	

A mistura foi primeiramente aquecida a 94°C por 4 minutos, seguindo-se 40 ciclos nas seguintes temperaturas: 94°C por 45 segundos, 36°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos; para uma completa extensão dos produtos amplificados adicionamos um passo final de 7 minutos a 72°C.

Para observação do produto amplificado, foi utilizada eletroforese em gel de agarose a 1%, preparado em tampão Borato EDTA (TBE). Cada corrida eletroforética continha um marcador de peso molecular para comparação do peso molecular do fragmento amplificado. Após a corrida, os géis foram mergulhados em solução de brometo de etídio (0,5μg/ml), observados em transiluminador de U.V. e fotodocumentados.

3.12.3 – Análise dos dados

A similaridade entre os isolados foi realizada pelo método UPGMA (unweigted pair group method using average linkages), utilizando o programa NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), versão 1.7 (Exeter Software, Setauked, NY, USA).

4 – Resultados

4.1 - Isolamento e identificação de *Edwardsiella tarda*

Dos 143 peixes analisados, dez amostras de *E.tarda* foram isoladas de um pesqueiro em Mogi-Mirim. Estas, quando submetidas aos testes bioquímicos já mencionados, apresentaram resultados compatíveis para *E.tarda.* A identificação foi confirmada pelo sistema API 20E.(Ver Figura 1) São elas: T10A, T1A, T17B, T15B, PCA, P, T24C, T19A, T11B e T18D.

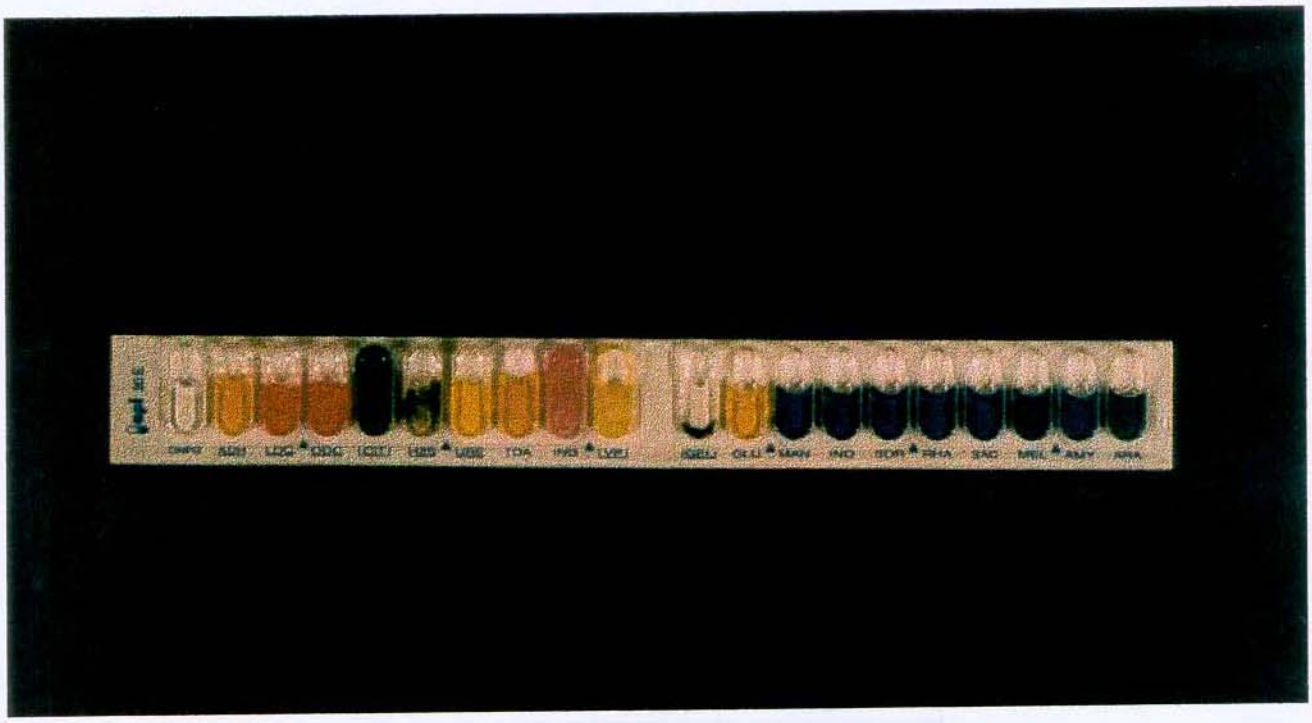


Figura 1 - Foto dos resultados sistema API 20E com a amostra T24C (peixe), isolada neste trabalho, confirmada como *Edwardsiella tarda*.

4.2 - Microhemaglutinação Manose Resistente MHMR

Todas as amostras listadas na Tabela 2 foram analisadas neste teste com hemácias de cavalo, boi, galinha, carneiro, cobaia e humana nos meios CFA, TSA e Minca.

Nenhuma das amostras testadas apresentou microhemaglutinação positiva para hemácias humanas, de boi e de carneiro. Das 53 amostras analisadas com hemácia de cavalo, 10 apresentaram hemaglutinação com título significativo (maior que 1:8), com hemácias de cobaia e de galinha, 17 e 5 amostras respectivamente apresentaram hemaglutinação com título significativo. O meio TSA se mostrou mais adequado para a detecção de propriedades hemaglutinantes de *E. tarda*. Ver tabela 3.

Tabela 3 - Apresentação dos resultados positivos de teste de Microhemaglutinação Manose Resistente (MHMR), realizado com amostras de *E. tarda*

Hemácia: Cavalo

AMOSTRAS	Título	Meios
3	1:16	TSA
4	1:8	TSA e Minca
16	1:128	TSA
17	1:8	TSA e Minca
20	1:32	TSA
21	1:16	TSA e Minca
27	1:16	TSA
KGE-7901	1:128	TSA
9.8	1:8	TSA
NCIMB 2034	1:8	TSA

Hemácia: Cobaia

AMOSTRAS	Título*	Meios
2	1:16	CFA
3	1:8	TSA
	1:16	CFA
4	1:8	TSA
5	1:8	TSA e CFA
10	1:8	TSA e CFA
14	1:16	TSA
	1:8	CFA
15	1:8	CFA
17	1:16	TSA
	1:8	CFA
20	1:8	CFA
21	1:16	TSA e CFA
27	1:32	TSA
	1:8	CFA
KGE 7901	1:32	TSA
9.8	1:16	TSA
FL4-53-4K	1:8	CFA
FL7-88-3	1:8	TSA
ET-2	1:16	TSA
ET-11	1:8	TSA

Hemácia: Galinha

AMOSTRAS	Título*	Meios
3	1:8	TSA
14	1:8	TSA
16	1:8	CFA
20	1:8	TSA
22	1:8	TSA

***Maior diluição da cultura de *E. tarda* que ainda foi capaz de causar 100% de hemaglutinação.**

4.3 - Pesquisa da produção de Hemolisina

Para a pesquisa de hemolisina quatro métodos foram utilizados:

a) Método da inoculação em picada (P), onde 30 amostras foram positivas.

b) Método de ágar sobrecamada (AO), onde 43 das amostras testadas foram positivas (ver figura 3 e figura 4).

c) Método da hemolisina de contato (CH), 34 das amostras testadas foram positivas.

d) Método da hemolisina solúvel (HS), neste teste todas as amostras apresentaram resultado negativo.

Na figura 2 estão apresentadas as freqüências dos resultados.

Em todos estes testes a amostra de *E.coli* (K12 C600) foi utilizada como controle negativo.

As amostras que apresentaram resultados positivos, bem como os métodos onde estes resultados foram obtidos, estão representados na Tabela 4.

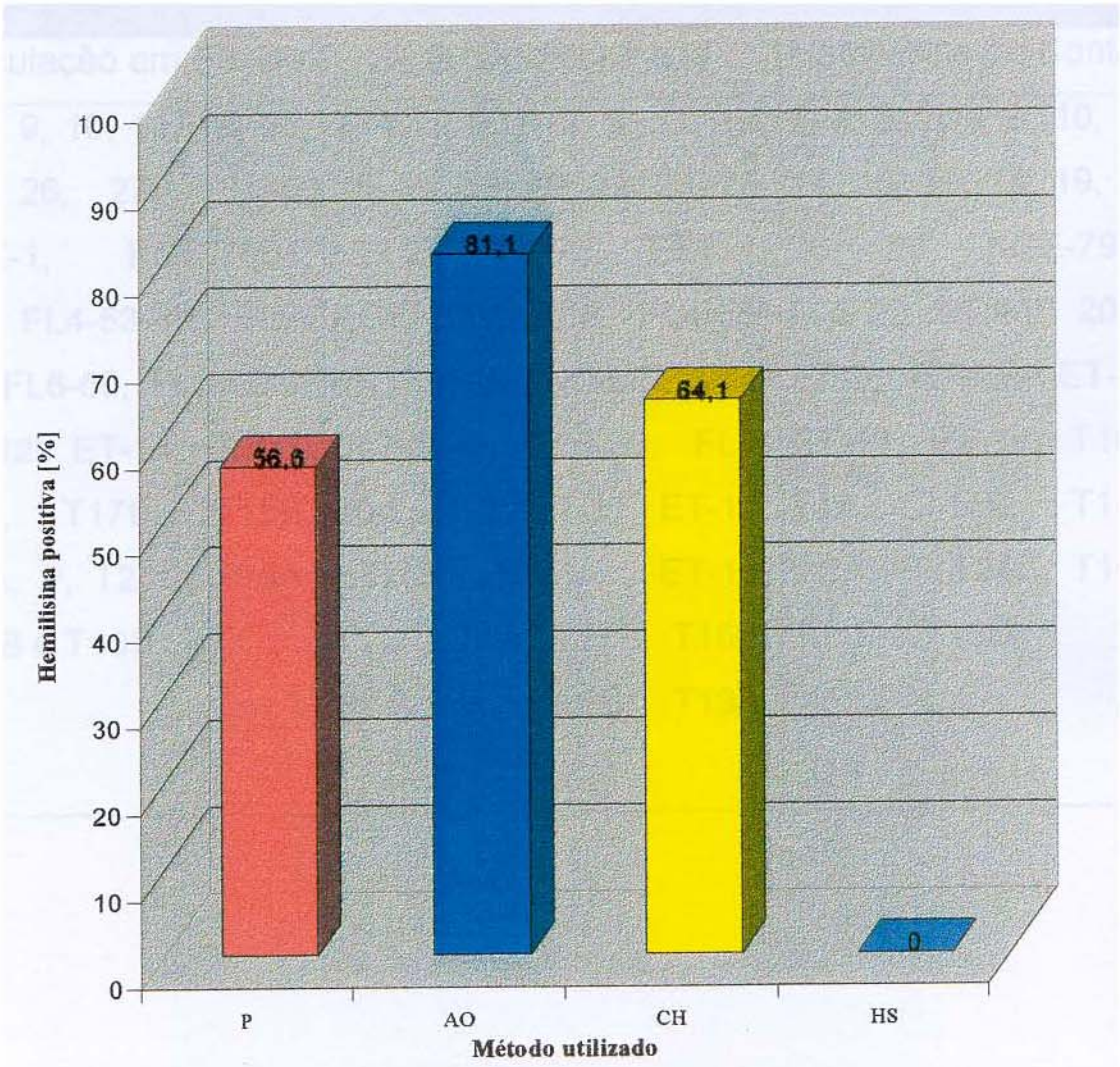


Figura 2. Frequência do fenótipo hemolítico dentre as 53 amostras de *Edwardsiella tarda.* determinada por: ► inoculação em picada, ► ágar sobrecamada, ► hemolisina de contato, e ► hemolisina solúvel.

Tabela 4 – Descrição das amostras que apresentaram halo de atividade hemolítica nos diferentes métodos utilizados para detecção da produção de hemolisina.

Métodos Utilizados		
Inoculação em Picada	Ágar Sobrecamada	Hemolisina de Contato
2, 7, 9, 10, 11, 16, 18, 22, 26, 27, 12116, EDK-1, KGE-7901, 9.8, FL4-53-4K, FL3-22, FL6-60, FL5-60-2, ET-12, ET-14, T10A, T1A, T17B, T15B, PCA, P, T24C, T19A, T11B e T18D	2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 15, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 12116, 14876, EDK-1, KGE-7901, 9.8, FL4-53-4K, FL3-22, NCIMB 2034, FL7-88-3, FL6-60, FL5-60-2,ET-2, ET-11, ET-12, ET-13, ET-14, ET-15, T10A, T1A, T17B, T15B, PCA, P, T24C, T19A, T11B e T18D	2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 26, 27, KGE-7901, FL3-22, NCIMB 2034, ET-2, ET-11, ET-12, ET-13, ET-14, T10A, T1A, T17B, T15B, PCA, P, T24C, T19A, T11B e T18D

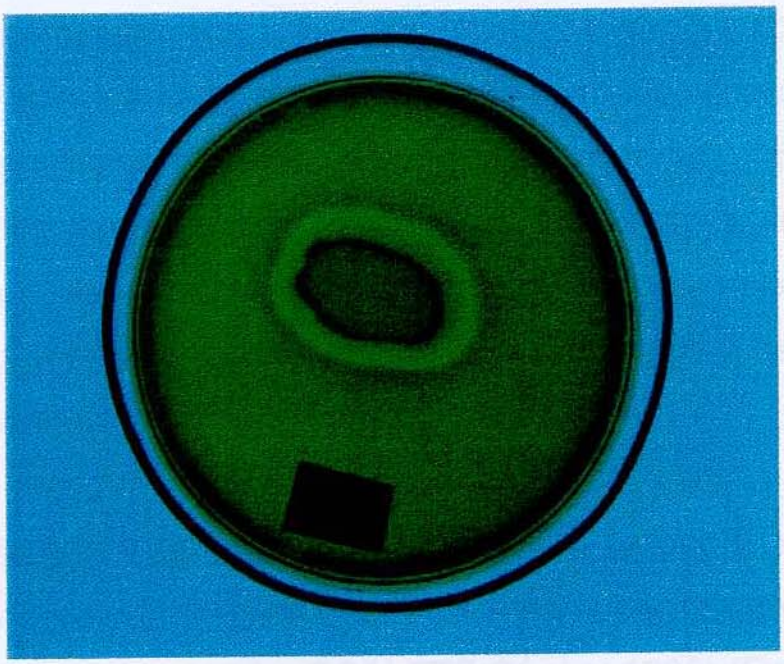


Figura 3 Resultado positivo, com presença de halo no teste para produção de hemolisina sobrecamada (AO). Amostra 9.8 (peixe) de *E. tarda*.

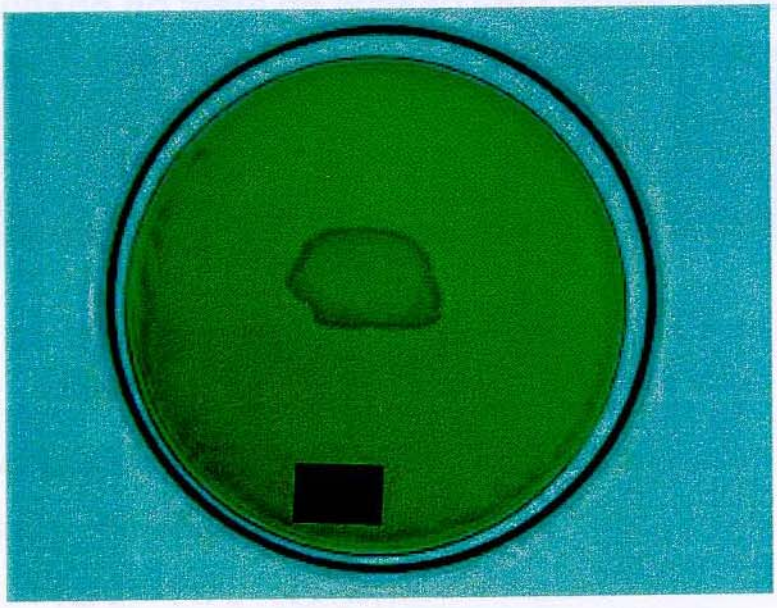


Figura 4 Resultado negativo no teste para produção de hemolisina sobrecamada (AO). Amostra 25 de *Edwardsiella tarda*.

4.4 - Adesão a células HeLa

A adesão a células HeLa foi feita com 1 hora, pois com intervalo de tempo maior a monocamada de células era destruída, provavelmente pela produção de hemolisina. Das 53 amostras testadas, 46 (86.7%) aderiram com 1 hora de incubação e 7 (13.2%) destruíram o tapete, como pode ser visto na Tabela 5. As amostras que destruíram o tapete celular com 1 hora de incubação foram testadas novamente com 30 minutos e neste caso todas as amostras aderiram.

Todas as amostras testadas apresentaram um padrão de adesão que lembra a adesão enteroagregativa de *E.coli,* onde as bactérias possuem um arranjo característico como tijolos empilhados na superfície das células ou na lamínula (NATARO et al., 1987 e SCALETSKY et al,1999).(Figuras 5 e 6)

Tabela 5 – Resultado do teste de adesão em células HeLa.

Amostras que aderiram às células HeLa, com 1 hora de incubação	Amostras que destruíram a monocamada de células, com 1 hora de incubação
3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 12116, 14876, 17570, EDK-1, KGE-7901, 9.8, FL4-53-4K, NCIMB2034, FL7-88-3, FL6-60, FL5-60-2, ET-1, ET-2, ET-15, T10A, T1A, T17B, T15B, PCA, P, T24C, T19A, T11B e T18D.	2, 11, FL3-22, , ET-11, ET12, ET-13, ET-14

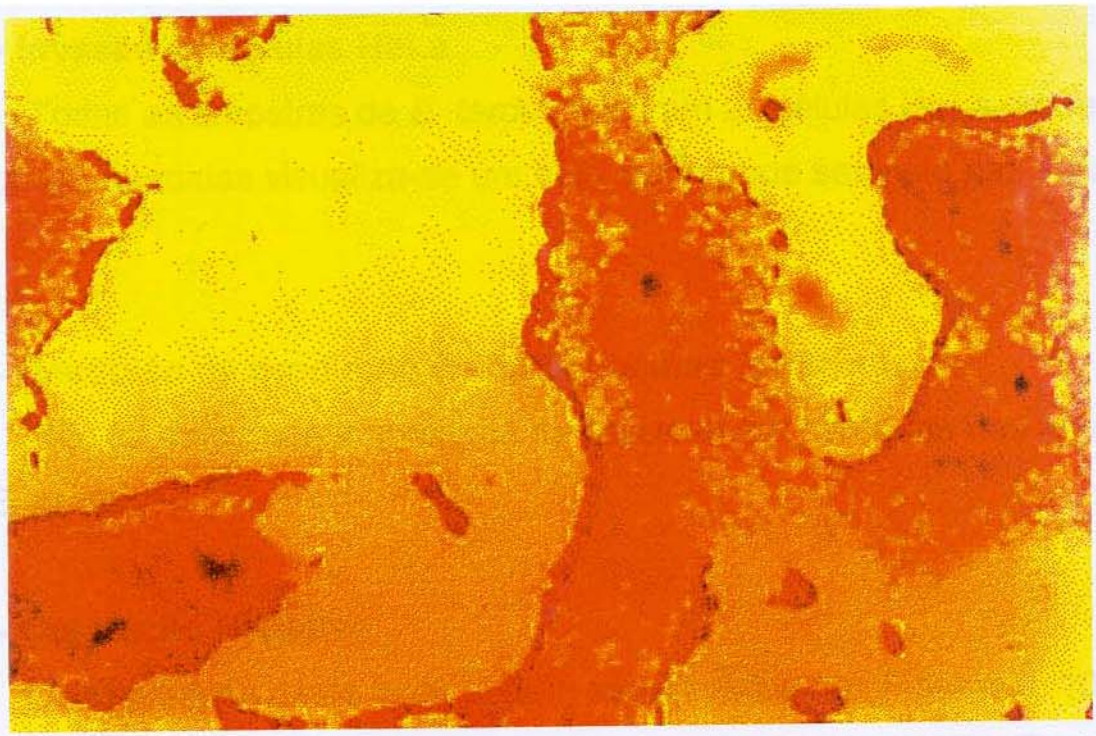


Figura 5 - Amostra 26 (humana) de *Edwardsiella tarda*. Adesão às células HeLa após 1 hora de incubação. Aumento 1000x.

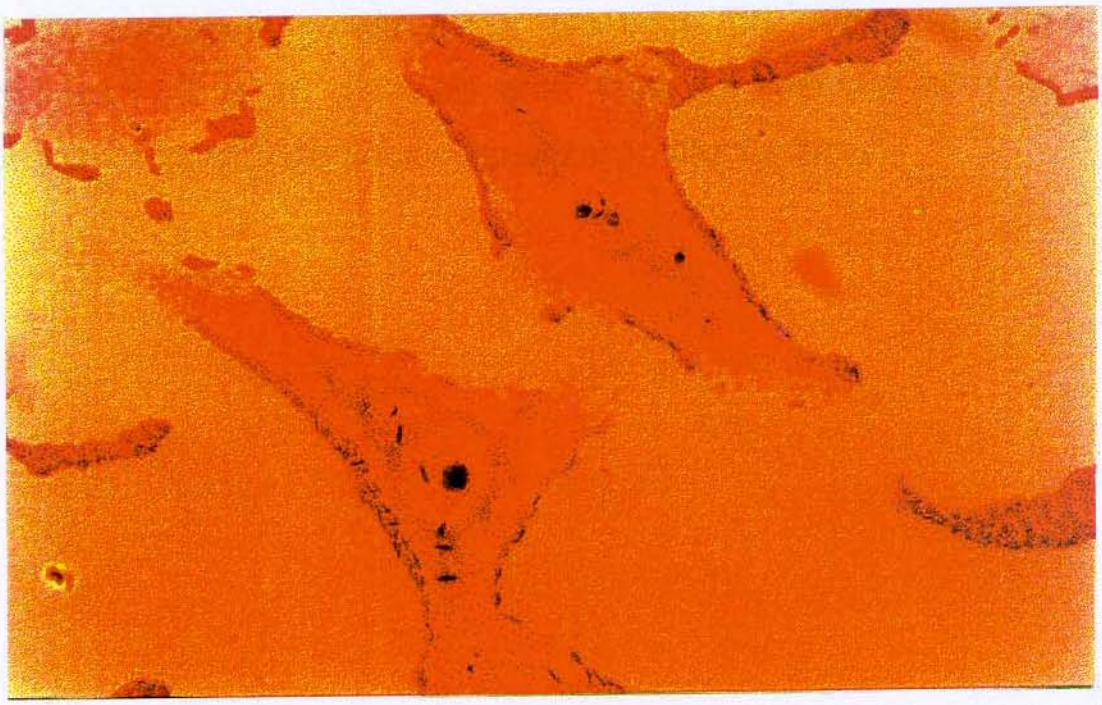


Figura 6 - Amostra 9.8 de *E. tarda*, isolada de peixe (Espanha). Adesão às células HeLa após 1 hora de incubação. Aumento 1000x.

4.5 - Invasão às células HeLa

Todas as amostras de *E. tarda* invadiram as células HeLa, ao redor das bactérias invadidas visualiza-se um halo como pode ser visto nas Figuras 7 e 8.

4.6 - Pesquisa de produção de bacteriocinas (colicinas)

Não foi detectada a presença de colicinas em nenhuma das amostras de *E. tarda*.

4.7 - Coloração Negativa

Os resultados deste teste podem serem vistos nas Figuras 9, 10 e 11.

As amostras, como eram de se esperar, apresentaram flagelos que estão relacionados com a grande motilidade da espécie. Esta técnica também conseguiu evidenciar a presença de numerosas fímbrias nas amostras ET-2 e 16. Quando este teste foi repetido com as amostras incubadas a 16 ºC, não houve visualização das fímbrias.

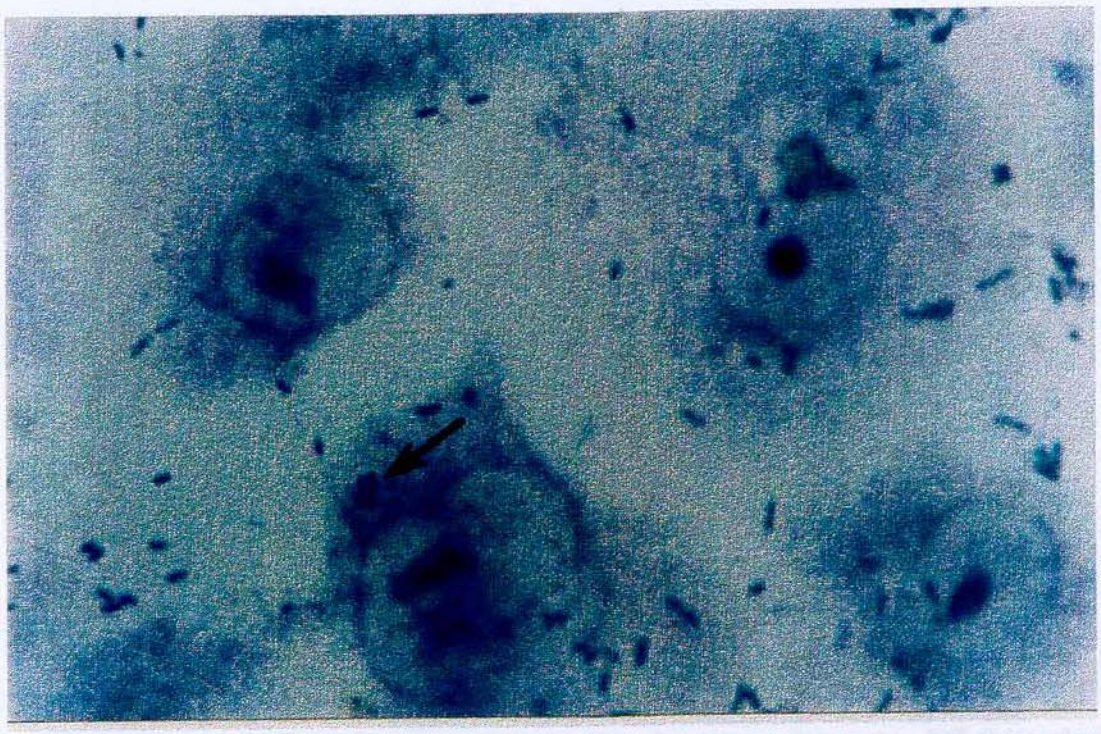


Figura 7 - Amostra 22 de *Edwardsiella tarda* , isolada de humanos(Brasil) e respectiva invasão às células HeLa. Aumento 1000x.

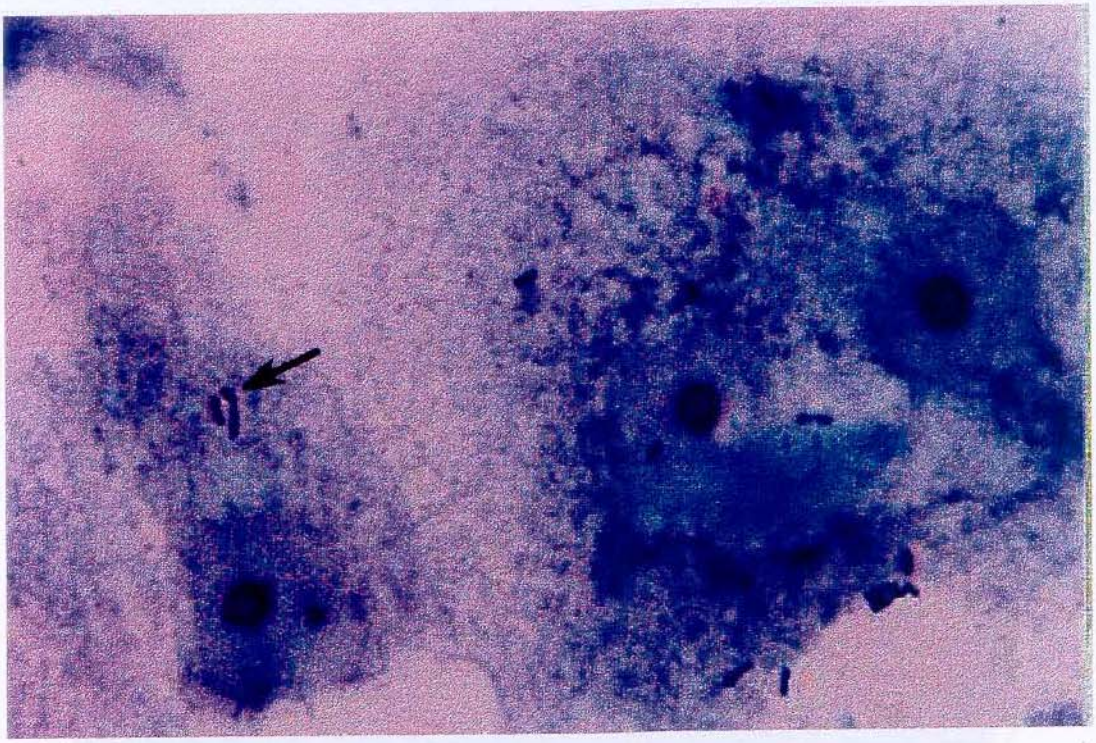


Figura 8 - Amostra 4 de *Edwardsiella tarda* , isolada de humanos(Brasil) e respectiva invasão às células HeLa. Aumento 1000x.

Figura 9 – Teste de coloração negativa realizado com a amostra ET-2 (isolada de humanos) incubada a 37°C, visualizando-se fímbrias em microscópio eletrônico de transmissão (M.E.T.). Aumento 41.700x.

Figura 10 - Teste de coloração negativa realizado com a amostra 16 (isolada de humano), visualizando-se em M.E.T. de fímbrias. Aumento 90.000x.

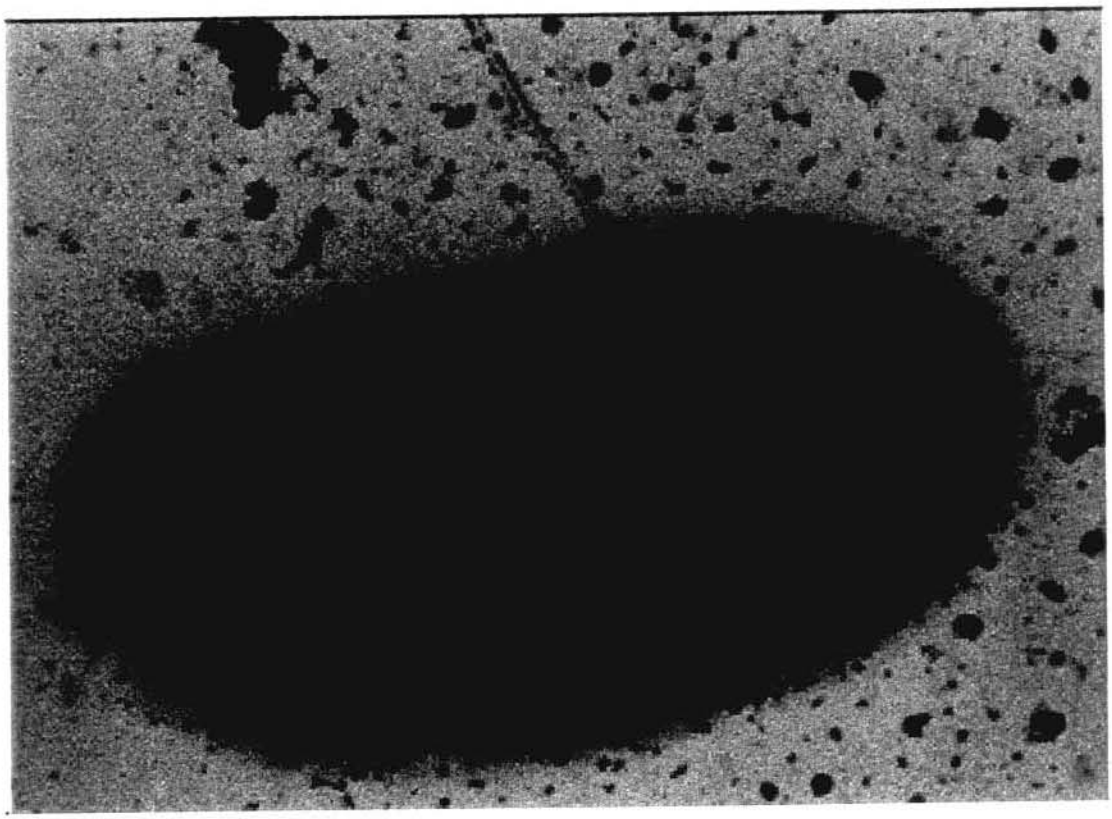


Figura 11 – Teste de coloração negativa realizado com a amostra ET-2 (isolada de humanos, M. Janda U.S.A.) incubada a 16°C, não visualizando fimbrias em microscópio eletrônico de transmissão (M.E.T.). Aumento 41.700x.

4.8 - Pesquisa de Fatores de Virulência por PCR

Utilizando a técnica de PCR, não foi possível detectar a presença de nenhum dos fatores de patogenicidade comuns a *E.coli* enteropatogênica tais como: Enterotoxina termo-lábil (LT-I), Shiga-like toxina (Stx-1 e Stx-2), Fatores citonecrotizantes (CNF geral, CNF-1 e CNF-2), "Enteroaggregative stable toxin"1(EAST-1), Aerobactina (AER), Invasão(EI), plasmídio EAF e presença de "attaching effacing fator" (EAE). A pesquisa de Enterohemolisina (EntHLY) e Hemolisina (HLY) também foram negativas.

4.9 – RAPD

Através do polimorfismo obtido com os iniciadores OPR-6, OPR-8 e OPR-9 foi possível a construção de um dendrograma pelo método UPGMA, utilizando o programa NTSYS-pc.

O dendrograma obtido pode ser visualizado na Figura 12.

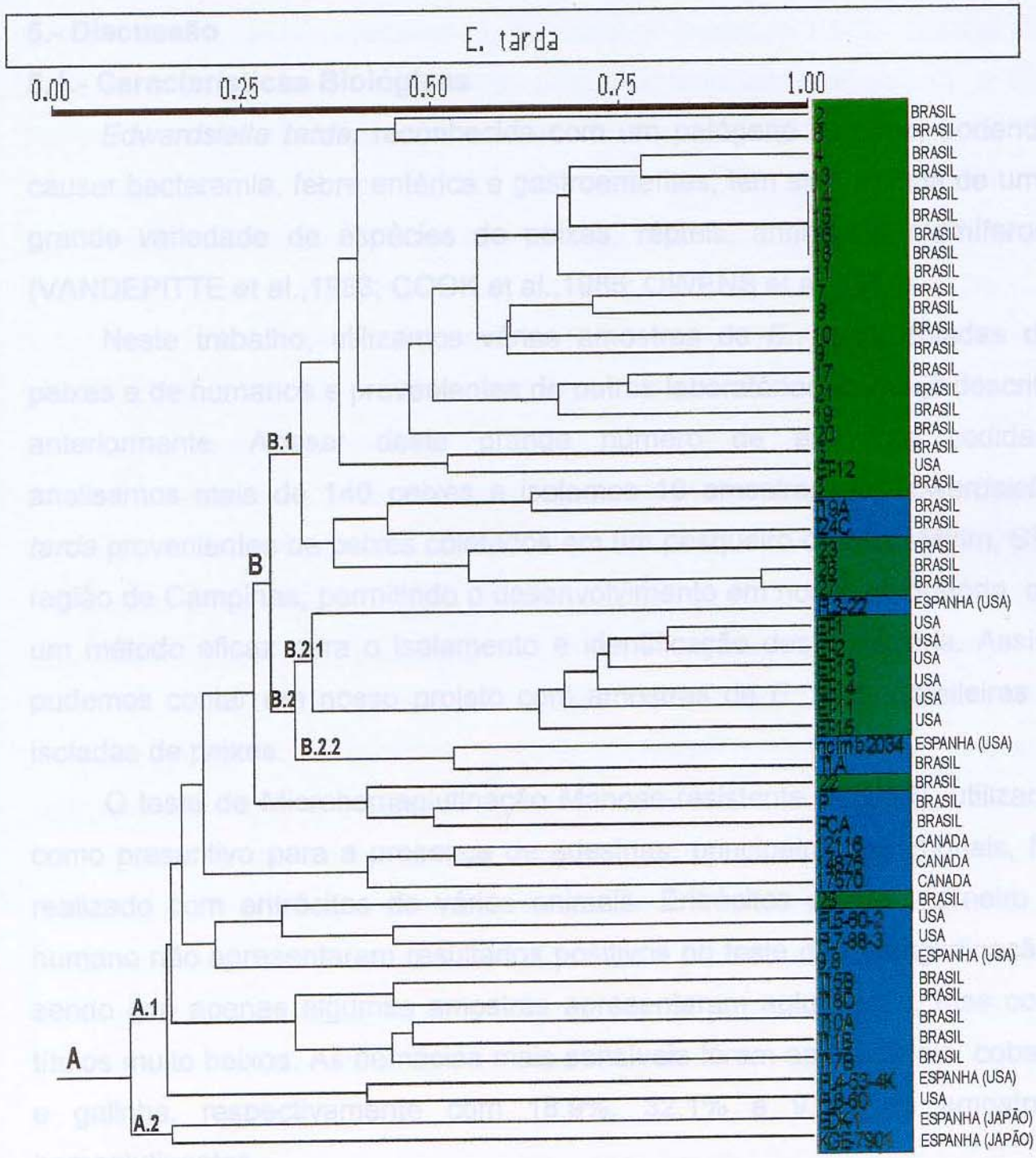


Figura 12 – Dendrograma baseado no método UPGMA (unweigted pair group method using average linkages) de análise clonal usando coeficiente de Jaccard. Foram utilizadas para a construção do dendrograma amostras de *Edwardsiella tarda* isoladas de homem ► e de peixes ►.

5.- Discussão

5.1.- Características Biológicas

Edwardsiella tarda, reconhecida com um patógeno humano, podendo causar bacteremia, febre entérica e gastroenterites, tem sido isolada de uma grande variedade de espécies de peixes, répteis, anfíbios e mamíferos. (VANDEPITTE et al.,1983; COOK et al.,1985; OWENS et al.,1974).

Neste trabalho, utilizamos várias amostras de *E. tarda* isoladas de peixes e de humanos e provenientes de outros laboratórios, como já descrito anteriormente. Apesar deste grande número de amostras cedidas, analisamos mais de 140 peixes e isolamos 10 amostras de *Edwardsiella tarda* provenientes de peixes coletados em um pesqueiro de Mogi-Mirim, SP, região de Campinas, permitindo o desenvolvimento em nosso laboratório, de um método eficaz para o isolamento e identificação desta bactéria. Assim pudemos contar em nosso projeto com amostras de *E. tarda* brasileiras e isoladas de peixes.

O teste de Microhemaglutinação Manose-resistente (MHMR), utilizado como presuntivo para a presença de adesinas, principalmente fimbriais, foi realizado com eritrócitos de vários animais. Eritrócitos de boi, carneiro e humano não apresentaram resultados positivos no teste de hemaglutinação, sendo que apenas algumas amostras apresentaram aglutinação, mas com títulos muito baixos. As hemácias mais sensíveis foram as de cavalo, cobaia e galinha, respectivamente com 18.9%, 32.1% e 9.4% de amostras hemaglutinantes.

Estes resultados estão de acordo com os descritos por WONG et al (1989), que obtiveram resultados mais significativos com estes mesmos eritrócitos, embora numa porcentagem muito maior. Em outro trabalho,

JANDA et al. (1991a), relataram a presença de hemaglutinação positiva em 54% de suas amostras de *E.tarda*, utilizando eritrócitos de cobaia e não notara nenhuma diferença entre amostras humanas e não humanas.

Algumas das amostras de *Edwardsiella tarda* que apresentaram aglutinação com títulos altos no teste de Microhemaglutinação Manose-Resistente, foram submetidas ao teste de coloração negativa, para a visualização de fímbrias. Apesar de muito usado em outras bactérias, (HAMILTON et al,1994) não encontramos na literatura científica nenhum registro de amostras de *E. tarda* submetidas a este teste. Seis amostras foram testadas e em duas delas pudemos evidenciar a presença nítida de numerosas fímbrias. Quando estas amostras positivas foram incubadas a 16°C e novamente submetidas ao teste de coloração negativa, as fímbrias não foram mais observadas, o que sugere tratar-se provavelmente de fímbrias do tipo MHMR que, a semelhança do que ocorre com *Escherichia coli*, podem estar envolvidas na adesão à células HeLa e talvez contribua com a adesão "in vivo" e invasão celular (in SAVAGE & FLETCHER, 1985).

Nenhuma das amostras examinadas produziram colicinas conhecidas. Colicinas são proteínas codificadas por plasmídios, que apresentam toxidade seletiva a bactérias intimamente relacionadas à produtora. Acredita-se que o maior grupo de colicinas (E1, A, B, N, Ia,, Ib e K) matam células sensíveis por promover trocas iônicas entre as membranas da célula alvo (PATTUS et al,1990)

Conforme planejado, foram pesquisados possíveis fatores de virulência de *E. tarda* através da técnica de PCR. Por se tratar de uma *Enterobacteriaceae,* utilizamos iniciadores de *Escherichia coli*, acreditando que pudessem existir fatores de virulência homólogos a aqueles de *E.coli.*

Nenhum dos fatores de virulência pesquisados (enterotoxina termo-lábil (LT-1), shiga-like toxins (STx) ou (SLT-1 e SLT-2), fatores citonecrotizantes (CNFgeral, CNF-1 e CNF-2) , EAST-1, aerobactina (AER), invasão (EI), plasmídio EAF, presença do gene *eae*A, responsável pela produção de intimina da lesão "Attaching and Effacing(A/E)" , enterohemolisina(EntHLY) e hemolisina (HLY)) foi encontrado.

Interessante ressaltar que embora as amostras tenham apresentado atividade hemolítica, esta parece não estar associada às hemolisinas conhecidas de *E.coli*.

Os resultados negativos para os diferentes fatores de virulência estudados, sugerem que os principais fatores de patogenicidade de E. tarda são a invasão e a produção de uma hemolisina, sendo que os genes que codificam para esta última foram identificados por CHEN et al (1996). Estes mesmos autores descreveram iniciadores que pelo PCR amplificaram estes genes e serviriam como um teste definitivo para a identificação de *Edwardsiella tarda*.

Tem sido relatada (JANDA & ABBOTT,1993b), a produção de uma potente hemolisina por *E. tarda*. Neste trabalho, pudemos estudar a produção da mesma através de quatro métodos diferentes. Das amostras testadas, apenas 6 não apresentaram hemólise em nenhum dos testes ressaltando-se que na detecção de hemolisina solúvel (HS), todas as amostras foram negativas. Nossos resultados podem ser corroborados pelos obtidos por JANDA & ABBOTT (1993), onde 80% das amostras foram positivas no teste de ágar sobrecamada (AO) e hemolisina de contato (CH) e 60% no teste em picada (P), não obtendo resultado positivo no teste de sobrenadante livre de células (hemolisina solúvel ou HS).

MARQUES et al. (1984) constataram que 100% das amostras de *Edwardsiella tarda* testadas, apresentaram hemólise em àgar sangue de carneiro e coelho e todas foram negativas em ágar sangue humano.

O estudo das interações de *E. tarda* com linhagens celulares é de execução difícil devido a presença de uma potente citotoxina produzida por estas bactérias, que destrói rapidamente as monocamadas celulares. Usando um mutante, STRAUSS et al. (1997), isolaram uma amostra de *E. tarda* não citotóxica, que também não produzia hemolisina. Esse duplo fenótipo reforça a hipótese de que esta citotoxidade é a responsável pela atividade hemolítica desta espécie. Curiosamente, a amostra mutante não citotóxica foi incapaz de invadir células HeLa.

O inicio da maioria das infecções bacterianas nas superfícies mucosas requer que a bactéria de algum modo, venha a aderir à célula hospedeira permitindo a colonização do tecido e mantenha uma população estável no local, por tempo variável. No caso de *E .coli* diarreiogênicas, a colonização é facilitada pela adesão à mucosa intestinal e esta adesão é mediada por adesinas que podem ser fimbriais e não-fimbriais (in SAVAGE & FLETCHER, 1985).

A pesquisa de adesão às células HeLa foi realizada com 1 hora de incubação, isto porque com 3 ou mesmo com 2 horas de adesão, a monocamada de células era destruída. Mesmo assim após 1 hora de incubação, 83,7% das amostras de *E. tarda* testadas foram aderentes, enquanto 16,3% ainda destruíram a monocamada de células, provavelmente pela produção de hemolisina "ligada" a célula bacteriana , já que sobrenadantes destas culturas não lisaram as hemáceas usadas nos testes de hemolisina. O teste de adesão também foi realizado tendo como controle

apenas o sobrenadante de algumas amostras e não ocorreu a destruição da monocamada celular, descartando parcialmente a possibilidade desta destruição ter sido causada por fatores tóxicos produzidos por *E. tarda* e liberados no meio, pois não podemos esquecer que todas as amostras foram negativas para o teste de hemolisina solúvel, como relatado em resultados. Todas as amostras testadas tiveram um padrão de adesão semelhante ao exibido por *E.coli* enteroagregativa (SCALESKY et.al, 1999).

A capacidade invasora das amostras de *Edwardsiella tarda* foi comprovada, como anteriormente descrito por outros pesquisadores (MARQUES et al, 1984) através do teste de invasão às células HeLa. As amostras foram visualizadas no interior das células com áreas claras ao redor, lembrando vacúolos.

Todas as amostras invadiram e esta invasão se deu em um tempo relativamente curto (50 minutos) comparado com outras enterobactérias. As amostras de *E. tarda* também causaram uma grande destruição da monocamada de células HeLa, observada principalmente após o período de multiplicação, sugerindo que a invasão de *E. tarda* causa a morte dessas células. Testes feitos com os sobrenadantes de *E. tarda* não foram capazes de destruir a monocamada de células HeLa. Nossos resultados estão de acordo com o trabalho de MARQUES et al. (1984) , que também evidenciaram a capacidade invasiva em 100% das amostras de *E. tarda* testadas e o descolamento das células HeLa após 120 minutos de incubação.

Bactérias invasivas usam diferentes estratégias para atingir o interior de células não fagocitárias. *E. tarda* e *Salmonella* são bioquimicamente relacionadas (JANDA & ABBOTT, 1993a), sendo que *Salmonella enterica*

Typhimurium tem uma capacidade de invasão eficiente e a internalização desta bactéria ocorre depois de poucos minutos de incubação, com as linhagens celulares. A morfologia das células hospedeiras muda drasticamente durante este tempo, observando-se modificações caracterizadas por "ruffles" ou vesículas na membrana plasmática que são formadas na área onde a bactéria interage com a célula hospedeira e para isso necessitam de uma rede de filamentos de actina intacta (PORTILLO & FINLAY,1994). Estas mudanças morfológicas também foram relatadas em células HEp-2 invadidas por *E. tarda* (PHILLIPS et al,1998).

5.2.- Estrutura clonal

A partir do teste de RAPD obtivemos um dendrograma onde pudemos identificar um grande "cluster" denominado por nós de "cluster"B, este por sua vez subdividido em dois "'clusters" menores B1 e B2 com aproximadamente 35% de similaridade, B2 ainda foi dividido em B2.1 e B2.2. Em B1 e B2.1 conseguimos agrupar 93,5% das amostras humanas, apenas 6,5% das amostras humanas ficaram fora deste grupo. Do "cluster"B2.2 em direção ao 'cluster"A agrupamos 86,4% das amostras de peixes, ficando 13,6% fora deste grupo.

Nos dias atuais está em desuso a determinação de sorotipos de *Edwardsiella tarda*, o que pode ser verificado procurando-se literatura sobre o assunto. No nosso caso foi impossível identificar sorologicamente nossas amostras.

Todavia entre as amostras que nos foram enviadas, especificamente aquelas remetidas pelo Prof. Dr. J.M.Janda, constava o sorotipo de todas as amostras por ele cedidas que foram os seguintes: ET-1(O33:H1), ET-

2(O40:H19), ET-11(O59:H19), ET-12(O24:H11), ET-13(O36:H1), ET-14 (O6:H19) e ET-15(O5:H1). Observando-se que embora cinco das sete amostras estudadas eram de origem fecal, os sorotipos isolados foram diferentes, o que sugere uma diversidade provavelmente intensa de antígenos O e H, dentro dessas amostras com a exceção dos antígenos H1 e H19 que apareceram em 6 das 7 amostras citadas.

Se nos reportarmos agora ao nosso dendrograma, verificamos que todas elas caíram num grande "cluster" que abrange 93,5% das amostras humanas como já citado. Seis amostras ficaram localizadas no "cluster" B.2.1 e apenas uma, curiosamente a amostra ET-12 a única enviada pelo Prof. Dr. J.M.Janda que apresentou o antígeno H11, ao contrário das demais (H1 e H19), localizou-se no "cluster" B1 junto com outras amostras humanas, em especial aquelas cedidas pela Prof. Dra. Lilian Marques, ou seja isoladas do Brasil ou advindas dos Estados Unidos (C.D.C. , Atlanta , Georgia, USA).

Este fato sugere que além da análise global onde foi demonstrado que as amostras humanas e de peixes, na sua grande maioria, se localizaram em "clusters" diferentes, que o antígeno H de *E. tarda* é importante na análise clonal deste microrganismo realizada pelo RAPD. Este fato tem sido observado com amostras de *Escherichia coli* diarreiogênicas que frequêntemente possuem o mesmo antígeno O e o antígeno H diferente, que lhe confere propriedades específicas de virulência. Em outras palavras tais amostras de *E. coli* se distribuem as vezes entre dois ou mais grupos diarreiogênicos. Por exemplo O111:H2 cai dentro do grupo EPEC no RAPD e também com relação a fatores de virulência ao passo que O111:H^- , cai dentro do grupo STEC (Shiga-toxins *E. coli*) (TRABULSI et al, (1996).

Das 6 amostras enviadas pela pesquisadora Prof. Dra Alicia Toranzo, da Espanha, todas isoladas de peixes, sendo quatro dos USA e duas do Japão, nas informações contidas na carta de remessa, menciona literalmente que todas elas pertenciam ao mesmo sorotipo típico e abundante, embora não relate qual, e que apenas uma a amostra FL3-22 pertencia a um sorotipo atípico. Observando o dendrograma verifica-se que as amostras do Japão estão dentro do "cluster" A.2, mas bem distante de todas as outras. As 4 amostras vindas da Espanha, mas de procedência americana distribuíram-se de forma heterogênea dentro do nosso dendrograma.

Em relação as dez amostras isoladas por nós de peixes, a distribuição também foi heterogênea sendo que oito das dez amostras ficaram dentro do grande "cluster" que incluíram as amostras de peixes. As duas amostras isoladas de peixe Pacu (P e PCA) ficaram agrupadas e cinco das oito amostras isoladas de Tilápia (T15B, T18D, T10A, T11B e T17B) também se encontram no mesmo "cluster".

Seria interessante mencionar, que embora o RAPD tenha de certa forma diferenciado com porcentagem bastante elevada amostras humanas de amostras de peixes, encontramos entre as amostras humanas duas isoladas de peixes no Brasil (T19A e T24C) e uma (FL3-22) que é justamente a amostra atípica vinda da Espanha, mas de procedência americana.

Embora possa parecer especulativo, ainda mais que não contamos com a determinação dos antígenos O e H, estes resultados podem sugerir que tais amostras pudessem ter maior facilidade de infectar humanos, por se parecer com as amostras isoladas destes. Não constitui surpresa uma vez que *Edwardsiella tarda* é considerada uma bactéria oportunista para o

homem, mas que peixes funcionariam com fonte de infecção para humanos, assim como o ambiente aquático onde tais peixes são encontrados. Esta suposição pode ser baseada no trabalho de VANDEPITTE et al. (1983), onde *Edwardsiella tarda* foi encontrada no aquário da casa e na criança doente.

Contrariamente ao se examinar o conjunto das amostras isoladas de peixes, de acordo com nosso dendrograma, verifica-se que duas delas (amostras 22 e 25) são de origem humana. Valeria neste caso o reverso do nosso raciocínio, de que fezes humanas eliminadas no ambiente aquático, poderiam servir como via de transmissão para peixes.

O estudo do RAPD com amostras de *E. tarda* oriundas de vários locais serviu para, pelo menos no nosso estudo, que totalizou 53 amostras, dividir com uma boa margem de segurança amostras de origem humana ou isoladas de peixes, com poucas exceções.

Verifica-se ainda que a origem das amostras quanto a sua procedência, com exceção das duas amostras do Japão, parece não ter influenciado muito na análise clonal e constituindo-se pois, num teste certamente útil para se inferir a origem de uma amostra de *Edwardsiella tarda* isolada de espécimes clínicos, de indivíduos normais ou ainda de peixes, quanto a provável fonte de infecção. Isto é se humanos se contaminaram com amostras de peixes ou se esses se contaminaram com amostras de origem humana.

Uma outra hipótese que não pode deixar de ser mencionada, analisando o dendrograma, excetuando-se as exceções já mencionadas, seria a dúvida de que a contaminação em humanos tenha como fonte de infecção peixes e seu ambiente.

Será que tais amostras como acontece com outros enteropatôgenos em sua maioria, em se tratando de humanos a infecção não é mantida diretamente pela via oral/fecal, desempenhando os peixes um papel secundário embora não dispensável.

Do mesmo modo, quase que se pode afirmar a mesma coisa em relação a peixes, que embora tenhamos observado exceções no RAPD, os resultados sugerem que estas amostras podem ser transmitidas no ambiente aquático de peixe para peixe sem participação, a menos que acidental, do homem.

Finalmente, queremos ressaltar que diante de toda a literatura consultada, este foi o único trabalho que encontramos sobre análise clonal de *Edwardsiella tarda*, utilizando a técnica de RAPD , que tem sido vastamente empregada para outros grupos de enterobactérias e microrganismos, (BANDO et al. 1998, PACHECO et al. 1997), o que confere ao nosso trabalho uma indiscutível originalidade.

6.- Conclusão

Os resultados obtidos no estudo das 53 amostras de *E. tarda* permitiu-nos apresentar as seguintes conclusões principais:

1 – Isolamento de 10 amostras de *E. tarda* de peixes.

2 – No teste de MHMR a maioria dos eritrócitos testados não apresentou resultado significativo, a não ser o de cavalo, cobaia e galinha.

3 – A presença de fímbrias a 37°C e ausência a 16°C, sugere que estas fímbrias são do tipo 2.

4 – Constatação da produção de hemolisina por *Edwardsiella tarda*, provavelmente ligada a célula bacteriana.

5 – Quanto ao tipo de aderência apresentado pelas amostras de *Edwardsiella tarda*, seu padrão de adesão foi do tipo enteroagregativo, semelhante ao que ocorre nas EAEC.

6 – As amostras estudadas apresentaram um grande poder invasivo com um forte efeito citotóxico.

7 – Nenhum dos fatores de virulência pesquisados pela técnica de PCR (enterotoxina termo-lábil (LT-1), shiga-like toxins (STx) ou (SLT-1 e SLT-2), fatores citonecrotizantes (CNFgeral, CNF-1 e CNF-2) , EAST-1, aerobactina (AER), invasão (EI), plasmídio EAF, presença do gene *eae*A, responsável pela produção de intimina da lesão "Attaching and Effacing(A/E)" , enterohemolisina(EntHLY) e hemolisina (HLY)) foi encontrado.

8 – Não foi constatada a produção de nenhuma das colicinas analisadas.

9 – O teste de RAPD mostrou-se parcialmente eficaz no agrupamento de *Edwardsiella tarda*, separando amostras de origem humana das de peixe.

7 – Apêndice

7.1. - MEIOS DE CULTURA

7.1.1. - Meio TSB (Trypticase Soy Broth)

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

7.1.2. - Meio BHI (Infusão de Cérebro e Coração)

O meio BHI (DIFCO) foi preparado de acordo com as especificações do fabricante.

7.1.3. - Meio EPM

a) Meio Base

Triptona.....10g

Extrato de Carne.....2g

NaCl.....5g

$Na_2HPO_4.5H_2O$.....2g

Sol. alc. azul de bromotimol (1,5%).....2ml

Ágar.....11g

Água destilada.....1000ml

b) Solução de Sais

Citrato de ferro amoniacal.....2g

$Na_2S_2O_3.5H_2O$.....2g

Glicose.....10g

Uréia.....40g

Água destilada.....85ml

A solução de sais foi esterilizada a 65ºC, em Banho-Maria, por 1hora e adicionada na quantidade de 17,5ml para cada litro de Meio Base, o qual teve seu pH ajustado para 7,4.

7.1.4. - Meio MILi (pH6.5)

Extrato de levedura.....3g

Peptona.....10g

Triptona.....10g

L-lisina.....10g

Dextrose.....1g

Ágar.....2g

Bromocresol púrpura.....0,02g

Água destilada.....1000ml

7.1.5. - Meio Ágar Citrato de Simmons

O meio Ágar Citrato de Simmons (DIFCO) foi preparado de acordo com as especificações do fabricante.

7.1.6. - Meio Mínimo Essencial de Eagle Modificado (MEM)

O meio MEM (CULTILAB) foi preparado de acordo com as especificações do fabricante.

7.1.7. - Meio de Minca

a) Meio base

KH_2PO_4.....1.36g

Extrato de levedura.....1,50g

$Na_2HPO_4.2H_2O$.....10,10g

Glicose.....1,00g

Ágar.....20,0g

Casaminoácidos.....1,00g

Água destilada.....1000ml

b) Solução de Sais

$MgSO_4.7H_2O$.....10,000g

$MnCl_2.4H_2O$.....1,000g

$FeCl_3.6H_2O$.....0,135g

$CaCl_2.2H_2O$.....0,400g

Água Milli-Q estéril.....1000ml

Foi Adicionado 1ml da solução de sais para cada 1000ml do meio base

7.1.8. - Meio CFA

a) Meio Base

Casaminoácidos.....10g

Extrato de levedura.....1,5g

Ágar.....20g

Água destilada.....1000ml

Solução de Sais.....10ml

b) Solução de Sais

$MgSO_4.7H_20$.....0,1g/100ml

$MnCl_2.4H_2O$.....0,78g/100ml

Para compor 10ml solução de sais, foram misturados 5ml da solução de cada sal.

7.1.9. - Meio TSA (Triptic Soy Agar)

O meio TSA (DIFCO) foi preparado de acordo com as especificações do fabricante.

7.1.10. - Lúria ágar

Triptona.....10g

Extrato de levedura.....5g

NaCl.....5g

Ágar bacteriológico.....15g

Água destilada.....1000ml

7.2. - SOLUÇÕES

7.2.1. - Tampão Salina Fosfatada (PBS) 0,1M

NaCl.....80,0g

KCl.....2.0g

$Na_2HPO_4.12H_2O$.....28,9g

KH_2PO_4.....2,0g

Água Milli-Q.....1000ml

Os sais foram diluídos em 10% a menos do volume, com exceção do KH_2PO_4, o qual foi misturado ao volume restante e utilizado no ajuste do pH para 7,4. (Solução de uso : 0,01M).

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

a) Salina

NaCl.....8,0g

KCl.....0,2g

Na_2HPO_4.....2,9g

KH_2HPO_4.....0,2g

Água Milli-Q.....1000ml

Autoclavado e armazenado à 4°C.

b) Tripsina

Tripsina (DIFCO).....2,0g

Solução salina (a).....10ml

c) Solução de Versene

Versene (EDTA).....0,2g

Solução salina (a).....10ml

d) Solução Vermelho de Fenol

Vermelho de Fenol.....0,5g

NaOH 1N.....3,5ml

e) Solução Final

Solução de tripsina (b).....50,0ml

Solução de versene (c).....10,0ml

Solução de Vermelho de fenol (d).....1,5ml

Ajustada para o pH 7,5.

Esterilizada por filtração.

7.2.3. - Tampão Tris-Borato (TBE)

Tris base.....54g

Ácido bórico.....27,5g

0,5M EDTA (pH8,0).....20ml

Água destilada.....1000ml

7.2.4. - Sol. Penicilina-Estreptomicina

Penicilina G Potássica.....60000000U

Estreptomicina.....60g

Hanks 1x estéril.....6000 ml

7.2.5.- Tampão TE 10x

100 mM Tris / HCl

10 mM EDTA

7.2.6. - Tampão de Ressuspensão

0.25% de azul de bromofenol

0.25% de xileno cianol

40% de sacarose

RNAse 20μg / ml

Referências Bibliográficas

ADAM, T.; ARPIN, M.; PRÉVOST, M.-C.; GOUNON, P. & SANSONETTI, P.J.– 1995. Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. The Journal of Cell Biology, 129(2):367-81.

AKUTSU, A.; MASAKI, H. & OHTA, T. - 1989. Molecular structure and immunity specificity of colicin E6, and evolutionary intermediate between E-group colicins and cloacins DF13. J. Bacteriol. 171: 6430-6437.

BANDO, S. Y.; do VALLE, G.R.F.; MARTINEZ, M.B.; TRABULSI, L.R. & MOREIRA-FILHO, C.A. – 1998. Characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains by RAPD analysis. FEMS Microbiol. Letters, 165:159-65.

BEUTIN, L.; GLEIER, K.; KONTNY, I.; ECHEVERRIA, P. & SCHEUTZ, F. – 1997. Origin and characteristics of enteroinvasive strains of *Escherichia coli* (EIEC) isolated in Germany. Epidemiol. Infect. 118(3):199-205.

BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; MORA, A.; BALAGUER, L.; MOURINO, M.; JUAREZ, A. & JANSEN, W.H. – 1996. O serogroups, biotypes, and *eae* genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. J. Clin. Microbiol. 12:3101-3107.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J.; ALONSO, M.P.; BALSALOBU, C.; MOURINO, M.; MADRID, C. & JUAREZ, A. – 1996. Polymerase chain reaction for detection of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). J. Microbiol. Methods. 26:95-101.

BRIAM, M.J., VAN, R., TOWNSEND, I., MURRAY, B.E., CLEARY, T.G. &PICKERING, L.K. – 1993. Evaluation of the molecular epidemiology of na outbreak of multiply resistant *Shigella sonnei* in a day-care center by using pulsed-field gel eletrophoresis and plasmid DNA analysis. J. Clin.Microbiol. 31:128-33.

BOCKEMÜHL, J.; PAN-URAI, R. & BURKHARDT F. - 1971. *Edwarsiella tarda* associated with human disease. Pathol. Microbiol. 7:393-401.

CAVÉ, H., BINGEN, E., ELION, J. & DENAMUR, E. – 1994. Differentiation of *Escherichia coli* strains using randomly amplified polymorphic DNA analysis. Res. Microbiol. 145:141-50.

CHEN, J. D.; LAY, S.Y. & HUANG, S. L. - 1998. Molecular cloning, characterization and sequencing of the haemolysin gene from Edwardsiella tarda. Archiv. Microbiol. 165: 9-7.

COOK, R.A. & TAPPE, J.P. – 1985. Chronic enteritis associated with *Edwardsiella tarda* infection in rockhopper penguins. J. Am. Vet. Assoc. 187:1219-20.

DYTOC, M.; GOLD, B.; LOUIE, M.; HUESCA, M.; FEDORKO, L.; CROWE, S.; LINGWOOD, C.; BRUNTON, J. & SHERMAN, P. - 1993. Comparison of *Helicobacter pylori* and attachhing-effacing *Escherichia coli* adhesion to eukaryotic cells. Infect. Immun. 61: 448-456.

EWING, W. H.; MCWOTHER, A. C.; ESCOBAR, M. R. & LUBIN, A. H - 1965. *Edwardsiella*,a new genus of *Enterobacteriaceae* based on a new species.*E.tarda*. Int. Bull Bacteriol Nomenclature Taxonomy. 15:33-8.

FRANKE, J.; FRANKE, S.; SCHMIDT, H.; SCHWARZKOPF, A.; WILLER, L. H.; BALJER, G.; BEUTIN, L. & KARCH, H. – 1994. Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor

probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. J. Clin. Microbiol. 32:2460-2463.

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F.; RICHARD, C. & SAKAZAKI, R. - 1980. *Edwardsiella hoshinae*, a new species of *Enterobacteriaceae*. Curr. Microbiol. 4:347-51.

GUTIERREZ, M. A.; MIYAZAKI, T.; HATTA, H. & KIM M. - 1993. Protective properties of egg yolk IgY containing anti-*Edwardsiella tarda* antibody against paracolo disease in the Japanese eel, *Anguilla japonica* Temmink (Schlegel. J. Fish Diseases. 16:113-22.

GIRÓN, L. A.; LANGE, M. & BASEMAN, J. B. - 1996. Adherence, fibronectin binding, and induction of cytoskeleton reorganization in cultured human cells by *Mycoplasma penetrans*. Infect. Immun. 64: 197-208.

HAMILTON, R. C.; BENNET, J.; DRANE, D.; PIETRZYKOWSKI. E.; DEDDON, F.; STEFANCIC, A & COX, J. – 1994. Negative staining cause clumping of *Bordetella pertussis* fimbriae. Micron 25(6):613-5.

HAWKE, J. P.; McWHORTHER, A. G.; STEIGERWALT, A. G. & BRENNER, D. J. - 1981. *Edwardsiella ictaluri* sp. nov.,the causative agent of enteric septicemia of cat fish. Int. J. Syst. Bacteriol. 31:396-400.

JANDA, J. M. & ABBOTT, S. L. – 1993(a). Infections associated with the genus *Edwardsiella*: the role of *Edwarsiella tarda* in human disease.Clin. Infect. Dis.17:142-8.

JANDA, J. M. & ABBOTT, S. L. – 1993(b). Expression of an iron regulated hemolysis from *Edwarsiella tarda*. FEMS Microbiol Lett. 111:275-280.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. & KROSKE-BYSTROM, S. et al. – 1991(a). Pathogenic properties of *Edwardsiella* species. J.Clin. Microbiol. 29:1997-2001.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. & OSHIRO, L. S. – 1991(b). Penetration and replication of *Edwarsiella* spp in HEp-2 cells.Infect Immun. 59:154-61.

JARURATANASIRIKUL, S. & KALNAUWAKUL, S. - 1991. *Edwardsiella tarda*: a causative agent in human infections. J. Trop. Med. Public Health. 22:31-4.

KONISTY, J. - 1982. The bacteriocin and other bacteriocins with established modes of action. Ann. Rev. Microbiol. 36: 125-144.

LIU, P.Y., LAU, Y., HU, B., SHYR, J., SHI, Z., TSAI, W., LIN, Y. &TSENG, C. – 1995. Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. J. Clin. Microbiol. 33:1779-83.

MARQUES, R. M.; TOLEDO, M. R. F.; SILVA, N. P.; MAGALHÃES M. & TRABULSI, L. R. - 1984. Invasion of HeLa cells by *Edwardsiella tarda*. Curr. Microbiol. 10:129-133.

NATARO, J.P., KAPER, J.B., ROBINS-BROWNE, R., PRADO, V., VIAL, P. & LEVINE, M.M. 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells. Paediatr.Infect. Dis. J. 6:829-31.

NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System - 1992. Version 1.70. Exeter Software, NY.

OLIVEIRA, M. S.; CASTRO, A. F. P. & SERAFIM M. B. - 1981. Mannose-resistant hemagglutination and colonization factor among *Escherichia coli* strains isolated from pigs. Vet. Record. 26:275-278.

OWENS, D.R.; NELSON, S.L. & ADDISON, J.B. – 1974. Isolation of *Edwardsiella tarda* from swine. Appl. Microbiol. 27:703-05.

PACHECO, A.B.F.; GUTH, B.E.C.; SOARES, K.C.C.; ALMEIDA, D.F. & FERREIRA, L.C.S. – 1997. Clonal relatioships among *Escherichia coli*

serogroup O6 isolates based on RAPD. FEMS Microbiol. Lett. 148:255-260.

PACHECO, A.B.F.; GUTH, B.E.C.; ALMEIDA, D.F. & FERREIRA, L.C.S. – 1996. Caracterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* by random amplification of polymorphic DNA. Res. Microbiol. 147:175-182.

PACHECO, A.B.F.; SOARES, K.C.C.; ALMEIDA, D.F.; VIBOUD, G.I.; BINSZTEIN,N. & FERREIRA, L.C.S. – 1998. Clonal nature of *Escherichia coli* seroutype O6:H16 revealed by randomly amplified polymorphic DNA analysis. J. Clin. Microbiol. 36:2099-2102.

PATTUS, F.; MASSOTTE, D.; WILMSEN, H.U.; LAKEY, J.; TSERNOGLOU, D.; TUCKER, A. & PARKER, M.W. – 1990. Colicins: prokaryotic killer-pores. Experientia Feb 15,46(2):180-92.

PHILLIPS, A. D.; TRABULSI, L.R.; DOUGAN, G. & FRANKEL, G. – 1998. *Edwardsiella tarda* induces plasma membrane ruffles on infection of HEp-2 cells. FEMS Microbiol. Lett 161(2):317-23.

PORTILLO,F.G. & FINLAY,B.B. – 1994. *Salmonella* invasion nonphagocytic cells induces formation of macropinosomes in the host cell. Infect. Immun. 62(10):4641-45.

REGER, P. J.; MOCKLER, D. F. & MILLER, M. A. - 1993. Comparasion of antimicrobial susceptibily, β-lactamase production, plasmid analysis and serum bactericidal activity in *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri* and *E. hoshinae*. J. Med Microbiol. 39:273-81.

SCALETSKY, I.C.A., PEDROSO, M.Z., OLIVA, C.A.G., CARVALHO, R.L.B., MORAIS, M.B. & FAGUNDES-NETO, U. 1999. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherenceof classic enteropathogenic

Escherichia coli to Hep-2 cells that is associated with infantile diarrhea. Infect. Immun. 67:3410-15.

SCALETSKY, I.C.A., SILVA, M.L.M. & TRABULSI, L.R. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. Infect. Immun. 45:534-536.

SAVAGE, D.C. & FLETCHER, M. 1985. Bacterial Adherence – Mechanisms and physiological significance. Plenum Press. New York.

SCHMIDT, H.; BEUTIN, L. & KARCH, H. – 1995. Molecular analysis of the plasmid encoded hemolysin of *Escherichia coli* O 157: H7 strain EDL 933. Infect. Immun. 63:1055-1061.

SCHULTSZ, C.; POOL, G. J.; van KETEL, R.; WEVER, B.; SPEELMAN, P. & DANKERT, J. – 1994. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA prodes and PCR. J. Clin. Microbiol. 32:2393-2397.

STRAUSS, E.J.; GHORI, N. & FALKOW, S. – 1997. An *Edwardsiella tarda* strain containing a mutation in a gene with homology to *shlB* and *hpmB* is defective for entry into epithelial cells in culture. Infect. Immun. 65 (9):3924-32.

SVANBORG, C.; HEDLUND, M.; CONNELL, H.; AGACE, W.; DUAN, R. D.; NILSSON, A. & WULLT, B. - 1996. Bacterial adherence and mucosal cytokine responses. Receptors and transmembrane signaling. Ann. NY Acad. Sci. 25: 797.

TRABULSI, L.R., CAMPOS, L.C., WHITTAM, T.S., GOMES, T.A.T., RODRIGUES, J. & GONÇALVES, G.A. 1996. Traditional and non-traditional enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. "In"

Proceedings of the symposium on enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Rev. Microbiol. 27 (Suppl.1):1-6.

VANDEPITTE, J.; LEMMENS, P. & DE SMERT, L. – 1983. Human edwardsiellosis traced to ornamental fish. J. Clin.Microbiol. 17:165-7.

WALTON, D. T.; ABBOTT, S. L. & JANDA, J. M. - 1993. Sucrose-positive *Edwarsiella tarda* mimicking a biogroup 1 strain isolated from a patient with cholelithiasis. J.Clin. Microbiol. 31:155-6.

WANG, G.; WHITTAM, T.S.; BERG, C.M. & BERG, D.E. – 1993. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. Nucleic Acids Res. 21:5930-5933.

WILLIAMS,J.G.; KUBELIK,A.R.; LIVAK,K.J.; RAFALSKI, J.A. & TINGLY,S.V. – 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18(22):6531-6535.

WONG, J. D.; MILLER, M. A. & JANDA, J. M. - 1989. Surface properties and ultrastructure of *Edwarsiella* species. J. Clin. Microbiol. 27:1797-801.

XU, L. Z. & LARZUL D. - 1991. The Polymerase Chain Reaction: Basic Methodology and Applications. Comp.Immun.Microbiol.Infect.Dis. 14:209-221.

YAMAMOTO, S.; TERAI, A.; YURI, K.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y. & YOSHIDA, O. – 1995. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. FEMS Immuniol. Med. Microbiol. 12(2):85-90

YAMAMOTO,Y. & ECHEVERRIA,P. – 1996. Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E.coli* strains pathogenic for humans. Infection and

Immunity. 64(4):1441-1445

Catálogos e manuais

Técnicas de Microscopia Eletrônica – Centro de M.E. Instituto Oswaldo Cruz. Art. Graf. FIOCRUZ. Rio de Janeiro-RJ, 1982.