

TOMOMASA YANO

UM PROVÁVEL ANTÍGENO DE ADERÊNCIA DO TIPO FÍMBRIA EM
AMOSTRAS DE *Escherichia coli* VEROCITOTOXIGÊNICAS
(VTEC) DE ORIGEM BOVINA

Tese apresentada a Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Professor Livre-Docente na área de Microbiologia junto ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia.

Campinas
1987

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À Dirce Mithico,

À nossas filhas,

Dirce Maria Emi

Ana Martha Tie

Tatiana Kazue

Cynthia Tomoe

Dedico,

AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro

Dr. Takao Namakata

Prof. Dr. Irineu José Barsanti de Camargo

Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira

Prof. Dr. Toshio Miwatani

Prof. Dr. Yoshifumi Takeda

Prof. Dr. Takeshi Honda

Domingos da Silva Leite

Marcina Garcia

João Batista Freire de Andrade Filho

Maria Silvia Viccari Gatti

Walderley Dias da Silveira

Gilson Paulo Manfio

Manoel Bernardo da Silva

Ana Stella Menegon

EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa em Gado, Campo Grande, MS.

FAPESP-Fundação de Amparo à Pesquisa do Est. de São Paulo.

CNPq-Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

FINEP-Financiadora de Estudos e Projetos.

A todos aqueles que, de uma ou de outra forma, ajudaram na minha formação acadêmica.

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. O auxílio financeiro ao projeto foi concedido pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Í N D I C E

	Página
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. Antígenos de aderência e Considerações Gerais	10
2.2. Antígenos de aderência em <u>E. coli</u> enterotoxigênicas (ETEC) de origem animal	13
2.2.1. Antígeno F4	13
2.2.2. Antígenos F5 e "F41"	14
2.2.3. Antígeno F6	17
2.2.4. Antígeno "F42"	18
2.2.5. Outros antígenos de aderência	20
2.3. Antígenos de aderência em <u>E. coli</u> enterotoxigênicas (ETEC) de origem humana	20
2.3.1. Antígenos F2 e F3	20
2.3.2. Outros antígenos de aderência	22
2.4. Fatores de aderência em amostras de <u>E. coli</u> enteropatogênica clássica (EPEC) e <u>E. coli</u> enterohemorrágica (EHEC)	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Amostras bacterianas	26
3.2. Meios de cultura	27
3.3. Teste de Microhemaglutinação manose-resistente (MHMR)	27
3.3.1. Coleta e preparo de hemácias	27
3.3.2. Preparo das suspensões bacterianas.	28

	Página
3.3.3. Teste	28
3.4. Preparo do antissoro	29
3.5. Teste de inibição de microhemaglutinação ma- nose-resistente (IMHMR)	30
3.6. Estudos de fatores que influenciam na pro- dução do antígeno EAF44	31
3.6.1. Efeito da temperatura	31
3.6.2. Efeito da glicose	31
3.6.3. Efeito da alanina	32
3.6.4. Efeito do acetato de sódio	32
3.6.5. Efeito do pH do meio mínimo	32
3.7. Teste de aderência	33
3.8. Teste de inibição de aderência	33
3.9. Microscopia eletrônica	33
3.10. Extração e semi-purificação do antígeno de aderência EAF44	34
3.11. Caracterização sorológica	35
3.11.1. Imunodifusão dupla	35
3.11.2. Imunoeletroforese	35
3.12. Estudos histológicos	36
4. RESULTADOS	38
4.1. Teste de Microhemaglutinação manose-resis- tente (MHMR)	38
4.2. Teste de inibição de microhemaglutinação ma- nose-resistente (IMHMR)	39
4.3. Fatores que influenciam na produção do an- tígeno EAF44	39
4.4. Teste de aderência	40
4.5. Microscopia eletrônica	41

	Página
4.6. Extração e semi-purificação do antígeno EAF44	41
4.7. Característica sorológica	42
4.7.1. Imunodifusão dupla	42
4.7.2. Imunoeletroforese	42
4.8. Estudos histológicos	43
5. DISCUSSÃO	57
6. RESUMO E CONCLUSÕES	73
7. BIBLIOGRAFIA	79

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A diarreia neonatal aguda dos animais domésticos, principalmente, suínos e bovinos; é causada por amostras de Escherichia coli enteropatogênicas, sendo esta enfermidade uma das mais importantes nos rebanhos suínos e bovinos em termos de mortalidade, o que implica em elevados prejuízos econômicos ao nosso país. Acredita-se que estas bactérias sejam responsáveis por mais de 50% das diarreias neonatais em animais no Brasil (A.P. Pestana de Castro - Comunicação pessoal).

Os colibacilos enteropatogênicos, causadores de moléstias entéricas em animais, podem ser classificados em pelo menos dois grupos, a saber: 1) E. coli enterotoxigênica (ETEC), produtora das enterotoxinas termolábeis (LT-I e LT-II) e/ou termoestáveis (STa e STb) e, 2) E. coli verocitotoxigênica (VTEC), que produz uma toxina denominada verocitotoxina (VT).

A enterotoxina termolábil (LT-I) de E. coli é uma proteína imunogênica, de alto peso molecular, semelhante sorológica e biologicamente à toxina colérica. Ambas têm como receptor o gangliosídeo GM1, presente na membrana das células epiteliais do intestino do homem e de animais sensíveis (48,52,110). Esta enterotoxina ativa a adenil-ciclase, provocando um aumento do AMP cíclico que, por sua vez, determina o bloqueio da absorção de NaCl pelas células apicais da mucosa, estimulando ainda a excreção desse sal pelas células das criptas. Em consequência destas alterações no metabolismo hidrossalino, ocorrerá um aumento

da quantidade de líquido na luz intestinal e, consequentemente, aparece uma diarreia do tipo osmótico.

Recentemente, foi descrito um novo tipo de enterotoxina termolábil que se assemelha à LT-I em várias de suas propriedades biológicas, em especial no que tange à atividade citotônica em cultura de células da linhagem Y-1, e aumento intracelular do AMP cíclico. Todavia, ao contrário de LT-I, que é neutralizável por antissoros preparados com a toxina colérica e a LT-I de origem humana ou suína, este novo tipo de toxina termolábil não é neutralizada pelos antissoros acima mencionados. Também, experimentos recentes evidenciam que o gangliosídeo GM1 não é o receptor para este novo tipo de enterotoxina termolábil, designada por vários autores de LT-II (51). Ao contrário de LT-I, os genes estruturais que codificam para esta enterotoxina parecem estar localizados no cromossomo bacteriano. A amostra produtora de LT-II, originalmente descrita foi isolada de búfalo, na Tailândia. Recentemente, trabalho realizado em São Paulo com amostras de E. coli isoladas de indivíduos com diarreia e de alimentos, embora em número reduzido, demonstraram ser produtoras de LT-II (L.R. Trabulsi - Comunicação pessoal).

As enterotoxinas termoestáveis (STa e STb) são peptídeos de baixo peso molecular (1500 a 3000 daltons) (1,125,130), o que as caracteriza como não imunogênicas em condições naturais, isto é, somente induzem a formação de anticorpos quando acopladas a proteínas (1,8,29,48,110). Biologicamente, a STa é uma potente toxina que tem a capacidade de alterar o metabolismo hidrossalino da mucosa intestinal, ativando a guanil-ciclase a nível de membrana, o

que provoca um acúmulo de GMP cíclico nas células epiteliais do intestino ocasionando, também, o aparecimento de diarreias agudas. A enterotoxina STb, por sua vez, é ativa em alça ligada de porco de 5 a 6 semanas de idade, porém, até hoje o seu mecanismo de ação não é bem conhecido (42,48).

A primeira descrição da produção de toxina VT foi feita em 1977, por Konowalchuk et al (69). Estes autores identificaram 10 amostras produtoras de VT (E. coli VT⁺) das quais 7 estavam associadas a quadro clínico de diarreica em crianças, uma com diarreia em leitão e duas haviam sido isoladas de queijo. Entre as amostras de origem humana, uma delas, denominada H-30, pertencente ao grupo da E. coli enteropatogênica clássica (EPEC), classificada como sorotipo 026:H11, era mais potente quanto a produção de VT, tendo então sido tomada como amostra padrão para o estudo desta citotoxina por estes, e outros autores que os sucederam (69,87). Konowalchuk et al (69) verificaram ainda, em ensaios realizados em células Vero, que a VT produzida por uma amostra de EPEC do sorogrupo 0128, e por uma amostra de origem suína (0138), ao contrário das demais, não eram neutralizadas por antissoro preparado com a amostra H-30. Estes dados forneceram a primeira indicação de que amostras de E. coli poderiam produzir mais do que uma citotoxina ativa em células Vero.

Vários trabalhos realizados com amostras de E. coli VT⁺ de origem humana demonstraram que esta toxina apresentava semelhança biológica e antigênica com a toxina produzida por Shigella dysenteriae, também ativa em células Vero (74,87,113,129).

Esta toxina foi denominada de toxina do tipo Shiga (SLT-I) ou VT-1. Ao contrário, outras amostras de E. coli, também VT⁺, não tinham o seu efeito citotóxico em células Vero neutralizado pela antitoxina de S. dysenteriae. Este segundo tipo de toxina foi então designado como tipo Shiga-II (SLT-II) ou VT-2.

Apesar de existirem algumas informações contraditórias quanto ao possível envolvimento da VT na etiopatogenia da diarreia em animais e no homem (12,14,43,61,62, 63,74,76,113,116,121), recentemente foi descrito nos EUA e no Canadá casos de colite hemorrágica associada à ingestão de hamburgers contaminados com amostras de E. coli do sorotipo 0157:H7, denominada por esta razão de E. coli enterohemorrágica (EHEC). Strockbine et al (129) investigando estas amostras mais detalhadamente, descobriram que estas eram capazes de produzir os dois tipos de VTs. Estudos realizados com VT-1 purificada a partir da amostra H-30 de E. coli e com amostra 933 de EHEC mostraram que estas citotoxinas produzidas pelas mesmas apresentavam atividade enterotóxica, citotóxica e letalidade para camundongos à semelhança do que tem sido relatado, como já mencionamos anteriormente, para a toxina de S. dysenteriae. Os mesmos autores, trabalhando com VT-2 produzidas por amostras EHEC, observaram que as propriedades biológicas da mesma eram semelhantes à VT-1, porém, a atividade letal da VT-2 para camundongos era maior, enquanto o efeito citotóxico em células Vero era menor.

Apesar das controvérsias já citadas sobre a importância da VTs em quadro diarréico, os relatos acima mencionados têm despertado a atenção de vários pesquisadores

no sentido de esclarecer sobre um possível envolvimento das citotoxinas VT-1 e VT-2 em enfermidades entéricas (60, 76,83,87,98,114,129).

No que concerne a espécie humana, esta atenção tem se concentrado sobretudo na EHEC do sorotipo 0157:H7. Para tal, diversos animais têm sido utilizados para estudar o mecanismo de virulência desta bactéria (4,5,38,83, 98,106). Assim sendo, experimentalmente foi possível reproduzir, com a amostra do sorotipo em questão, após inoculação oral, quadros diarréicos em coelhos recém-nascidos e em animais gnotobióticos mais especificamente, porcos e bezerros. O mecanismo de colonização do intestino de porcos gnotobióticos por amostra de EHEC parece ser semelhante àquele observado para a amostra do grupo EPEC (72). Em ambos os casos, experimentos "in vitro" realizados em cultura de tecidos e/ou em enterócitos, bem como estudos através de microscopia eletrônica e eletroforese em gel de agarose para determinação do perfil plasmidial de colibacilos destes grupos, revelaram que esta colonização provavelmente seria mediada por plasmídios (3,60,75,86,138).

Em experimentos realizados com coelhos recém-nascidos, inoculados intragastricamente com a amostra 933 de E. coli 0157:H7 (produtora de grande quantidade de VT) e com amostra de E. coli 0157:H45 (VT negativa), foi verificado que somente a amostra 933 foi capaz de desenvolver sintomas de quadro diarréico bem como colonização do epitélio intestinal. Nestes animais foi também detectada a presença de VT no líquido diarréico, demonstrando pois que houve produção desta toxina "in vivo" (98).

Os estudos histológicos realizados independentemente por Moxley e Francis (83) e Pai et al (98) revelaram que, a maioria das alterações causadas por amostras de E. coli VT⁺ inoculadas respectivamente em bezerros gnotobióticos e coelhos recém-nascidos, estava localizada principalmente no colon e se caracterizava por um significativo aumento das apoptoses na superfície de epitélio, diminuição de produção de mucina, elevação de atividade mitótica das células das criptas intestinais, além de moderada infiltração de neutrófilos na lâmina própria e no epitélio (83,98).

Estes dados recentes em relação às amostras de E. coli VT⁺, quer de origem humana (98), quer de origem animal (83), sugerem que, provavelmente, se uma determinada amostra de E. coli colonizar o intestino de animais e/ou indivíduos suscetíveis e, tiver a capacidade de produzir grande quantidade de VT, certamente, em nossa opinião, ocorrerão as alterações histológicas mencionadas acima, com conseqüente evolução para diarreia conforme foi observado aliás experimentalmente pelos autores acima citados (83, 98).

No que concerne aos animais, em especial, os suínos, certos sorogrupos de E. coli (0138,0139,0141, principalmente), por mecanismos ainda não bem estudados, são capazes de colonizar o intestino de leitões desmamados e elaborar uma toxina que, uma vez absorvida, possui um tropismo pelas células endoteliais de pequenos vasos e arteríola (121) (A.F. Pestana de Castro - Comunicação pessoal). Esta lesão acarreta extravasamento de plasma ocasionando nos animais infectados a presença de edema, localizado principal-

mente nas pálpebras, regiões infra-mandibular e paredeventral do abdômen. Via de regra, ocorre lesão de pequenos vasos do sistema nervoso central e quando isto acontece, os animais apresentam sintomas neurológicos.

Esta enfermidade, que causa grande prejuízos econômicos, é conhecida em patologia veterinária como doença de edema e a toxina produzida pelas amostras de E. coli mencionadas, a nível intestinal e, depois absorvida é conhecida como "princípio ativo da doença do edema", ou simplesmente PDE. O fato de estarmos tecendo tais considerações sobre a doença do edema se prende à observação de que o PDE é na realidade, pelo menos sob o ponto de vista biológico, extremamente semelhante a VT. Em outras palavras, é letal para camundongos, possui o efeito citotóxico em células Vero e não raro os leitões com doença do edema apresentam diarreia. Se esta é uma consequência da ação direta do PDE ou de eventual produção de enterotoxinas LT e/ou ST por amostras de E. coli envolvidas na doença ou ainda decorrência das ações simultâneas das enterotoxinas e da VT é assunto que carece de investigação mais detalhada.

Em todos os casos citados, em relação à produção de VT e/ou a PDE e, seja por amostras do grupo EPEC, EHEC ou as envolvidas na doença de edema, a semelhança do que ocorre com as amostras de ETEC, é óbvio que o primeiro passo para que os animais ou indivíduos apresentem diarreia, pela produção das citotoxinas VT ou PDE é a colonização das células das vilosidades intestinais dos mesmos por estes colibacilos. Esta colonização é mediada por antígenos de superfície das células bacterianas aos quais se convencionou denominar de fatores de colonização, adesinas ou an

tígenos de aderência. No caso dos ETEC está bem determinado que, na maioria das vezes, estruturalmente, esses antígenos são representados por fímbrias. Nos casos das EPEC com relação as quais, como já mencionamos, tem sido relatada a produção de VT, não se conhece ainda, sob ponto de vista morfológico, qual estrutura responsável pela aderência que tem sido investigada "in vitro", em certas linhagens celulares, nem o mecanismo de colonização "in vivo" conforme os experimentos realizados em animais (3,13,16,72,75,78,86,105,108,112,133,138)

Recentemente, estudando 104 amostras de E. coli isoladas de bezerros com diarreia na região de Campo Grande, MS, verificamos que 70 (67,3%) eram produtoras de VT, detectável através de ensaio em células Vero (141).

Tomando como base os atuais dados da literatura que sugerem um provável envolvimento da VT em doenças diarreicas e, levando-se em consideração que a etapa inicial da etiopatogenia destas enfermidades exigem que tais bactérias tenham a capacidade de aderir e colonizar o intestino de animais, no presente caso bovinos, a nossa pesquisa teve como finalidade primordial investigar a existência de um fator de aderência em algumas das amostras de E. coli VT⁺ por nós isoladas de bezerro. Em resumo, os objetivos deste trabalho foram:

- 1) pesquisar a presença de fatores ou antígenos de aderência em algumas amostras de E. coli VT⁺ isoladas de bezerro.
- 2) caracterizar, sob ponto de vista estrutural, o antígeno de aderência presente nessas amostras ao qual deno-

minamos provisoriamente de EAF 44 (enteropathogenic E. coli adherence factor) (86).

- 3) estudar as propriedades biológicas e sorológicas deste antígeno de superfície em relação a outros antígenos de aderência descritos em amostras de origem animal do grupo ETEC.
- 4) verificar quais as condições de cultivo que poderiam interferir na expressão do antígeno EAF 44, presente em amostras de E. coli VT⁺ isoladas de bezerros.

Considerando-se que na conduta de nossos estudos adotamos uma sequência de procedimentos que normalmente é utilizada na pesquisa dos fatores de colonização e da aderência de amostras do grupo ETEC e EPEC, achamos, a esta altura, que seria importante apresentarmos uma revisão bibliográfica dos diferentes fatores de colonização ou aderências descritas até o presente, nestes grupos de bactérias.

Acreditamos que esta revisão, além de fornecer informações sobre o assunto em questão, permitirá uma comparação entre o que já foi relatado para os diferentes antígenos de aderência de origem humana e animal e os resultados obtidos em relação aos quatro objetivos propostos para os fenômenos de aderência e colonização de amostras de VT⁺ de origem bovina por nós estudadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ANTÍGENOS DE ADERÊNCIA E CONSIDERAÇÕES GERAIS

A superfície externa de Escherichia coli e algumas outras bactérias da família Enterobacteriaceae é recoberta por substâncias capazes de provocar reações imunológicas no hospedeiro. Estas estruturas são comumente utilizadas para a classificação sorológica destas bactérias, sejam elas de origem humana ou animal, permitindo agrupá-las em sorogrupos e/ou sorotipos. Estes antígenos externos de E. coli são designados pelas letras O, K e H. A terminologia O (proveniente do alemão: Ohne Hauch) e H (do alemão: Hauch), introduzida por Weil e Felix (135, 136), é utilizada para os antígenos somáticos (O) e flagelares (H), respectivamente. Os antígenos somáticos O são moléculas de complexos lipopolissacarídeos e constituintes da parede bacteriana. São termostáveis e não são inativados por temperaturas de 100°C a 121°C. As características antigênicas dos antígenos O de E. coli permitem atualmente, distinguir pelo menos 167 sorogrupos desta bactéria. O antígeno flagelar (H) é de natureza protéica e é inativado a 100°C. Os diferentes antígenos H, hoje aproximadamente em número de 52, permitem a identificação de sorotipos, sendo muito importante a sua identificação, pois, não raro, dentro do mesmo sorogrupo de E. coli, existem sorotipos considerados patogênicos e não patogênicos. O termo K (do alemão: Kapsel) foi introduzido por Kauffman e Vahlne (64), sendo uti-

lizado para a denominação de estruturas de natureza polissacarídica que constituem os antígenos de envoltório ou capsulares ao redor das células bacterianas.

Além desses antígenos, existem estruturas do tipo fímbria que recobrem a parede bacteriana de amostras de E. coli e de outras bactérias gram-negativas e gram-positivas. O termo fímbria, significa "fibras" ou "filamentos", em latim, e foi introduzido em 1955 por Duguid et al (24) para designar apêndices bacterianos, de natureza protéica, não flagelares, sendo também chamados de "pili" (cabelos, em latim) por Brinton (7). Desde então, esses dois termos têm sido normalmente usados como sinônimos, embora Ottow (96) e Jones (57) recomendem que o termo fímbria deva ser reservado para a estrutura bacteriana sem função conjugativa. Devido à propriedade de aderência que leva à subsequente colonização, estas fímbrias bacterianas são também denominadas antígenos de aderência, adesinas ou fatores de colonização. Embora as fímbrias dos colibacilos, tanto de origem humana quanto de origem animal, sejam, na sua maioria, morfológicamente semelhantes, elas possuem propriedades antigênicas e hemaglutinantes diferentes que permitem caracterizá-las. Via de regra, essas fímbrias conferem às bactérias especificidade em relação ao hospedeiro (41).

Durante os estudos iniciais com estas fímbrias, Duguid et al (25) classificaram-nas em 6 classes ou tipos, de acordo com sua morfologia e proprie

dades hemaglutinantes. As fímbrias do tipo I, que atualmente são denominadas de F1 (95), conferem às bactérias a propriedade de aderência a várias células eucariontes (6,26,88,90,111). Embora dotada de atividade hemaglutinante, esta é inibida pela D-manose (41). Estes antígenos de aderência, principalmente em amostras de E. coli enteropatogênicas, além da capacidade de adesão "in vivo" às células intestinais de hospedeiros sensíveis, apresentam algumas características comuns tais como: aglutinação na presença de D-manose (41) de hemácias de várias espécies animais, são produzidos somente em cultivos a 37°C e não a 16°C (9,33,82,91,94,140) e, são codificados por plasmídios (32,41,71,93,94). Constituem exceções os antígenos F6 ou (987P) que não é hemaglutinante e o "F41", com relação ao qual, a semelhança do que ocorre para o F6, faltam dados conclusivos sobre a localização dos genes responsáveis pela expressão dos mesmos.

Recentemente, uma tentativa foi feita por Ørskov e Ørskov (95) para introduzir um novo e simplificado sistema de nomenclatura para os antígenos de estrutura do tipo fímbria, onde somente a designação F (fímbria) deve ser usada. Nós, no presente trabalho, utilizaremos a nomenclatura estabelecida por esses autores (95).

Após essas considerações gerais, vejamos agora, em relação aos diversos antígenos de aderência descritos em E. coli enteropatogênicas, quais os achados mais relevantes da literatura no que tange a:

propriedades hemaglutinantes, purificação e características físico-químicas e condições que afetam a produção destes antígenos "in vitro".

2.2. ANTÍGENOS DE ADERÊNCIA EM E. coli ENTEROTOXIGÊNICAS (ETEC) DE ORIGEM ANIMAL

2.2.1. ANTÍGENO F4

O antígeno F4, antigamente denominado K88 (124), foi o primeiro antígeno de aderência de estrutura do tipo fímbria a ser descrito como um fator de virulência em amostras de Escherichia coli enteropatogênicas, isoladas de suínos com diarreia (59). Este antígeno tem sido caracterizado sorologicamente, em três variantes antigênicas (F4ab, F4ac e F4ad) (45,92) e, apresenta a capacidade de aglutinar hemácias de cobaia na presença de D-manose a 4°C, característica essa que se elui à temperatura ambiente (59,126). Parry e Porter (99) observaram que a variante sorológica F4ab reagia melhor com hemácias de galinha do que com hemácias de cobaia e que esta hemaglutinação era estável à temperatura ambiente. Por outro lado, a variante F4ac reagia com hemácias de cobaia, somente quando o antígeno estava ligado à bactéria, não ocorrendo em preparações livres de células.

A purificação deste antígeno foi realizada (125,127) após a extração das fimbrias das células bacterianas por aquecimento a 60°C e precipitação no ponto isoelétrico, seguida de ultracentrifugação. Mooi e De Graaf (77) purificaram as variantes sorológicas de F4(ab,ac e ad) por gel filtração em Sepharose CL 4B, demonstrando, através de eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio (PAGE-SDS), que o peso molecular das três variantes estava em torno de 23.500 a 26.000 daltons.

Com relação à genética do antígeno F4, Ørskov e Ørskov (93), realizando experimentos de conjugação, sugeriram que os genes responsáveis pela codificação e expressão deste antígeno poderiam ser de origem plasmidial, plasmídeo este não conjugativo e que seria mobilizado por outro, do tipo conjugativo. Posteriormente, Shipley et al (115) confirmaram que o antígeno F4 era codificado por um plasmídeo de 50 Mdal, não conjugativo, que possuía também os genes para utilização da rafinose.

2.2.2. ANTÍGENOS F5 e "F41"

Em 1972, Smith e Linggood (120) descreveram, em amostras de E. coli enterotoxigênicas para bezerros, um novo antígeno K a

que chamaram de "Kco" ("common K antigen"), que posteriormente foi designado K99 (94) e, para o qual, foi proposta recentemente a denominação de F5 (95).

Morris et al (79,80,81) observaram em uma amostra de E. coli denominada B41 (0101:K30:K99) duas variedades do antígeno K99 quanto a mobilidade eletroforética. Seus resultados, também confirmados por Isaacson (54), sugeriam que a amostra de E. coli B41 possuía dois antígenos de superfície distintos, um de natureza catiônica e outra, aniônica. De Graaf e Roorda (22) descreveram que o antígeno F5 (ou o componente catiônico) aglutinava fortemente hemácias de cavalo e mais fracamente hemácias de carneiro, não sendo capaz de aglutinar hemácias de cobaia. O componente aniônico foi denominado de antígeno "F41", tendo sido verificado que este aglutinava fortemente hemácias de cobaia e fracamente as de carneiro e cavalo.

De Graaf et al (20,23) observaram que o meio de Minca, idealizado por Guinée et al (47), ou o meio mínimo com glicose (23) eram os mais indicados para se obter uma maior produção de F5, do que meios mais complexos e que, o aminoácido L-alanina, numa concentração de 1 mM, inibia "in vitro" a síntese de F5. Outro fator que poderia di-

minuir a produção "in vitro" da fímbria F5 seria a glicose, como foi observado por Guineé et al (46,47) e Isaacson (55). Contrariamente, Francis et al (37) descreveram que o meio mínimo contendo apenas 1% de glicose não inibia a produção de F5. Porém, quando este meio fosse também suplementado com acetato de sódio este fenômeno ocorria.

Os estudos da purificação dos antígenos de aderência da amostra de E. coli B41 revelaram, como seria de se esperar pelo exposto acima, duas subunidades protéicas, com pesos moleculares de 22.500 e de 29.500 daltons. Investigações posteriores revelaram que uma dessas proteínas, com mobilidade eletroforética do tipo catiônico, corresponderia ao antígeno F5 e que a outra proteína, atraída pelo ânodo, era na realidade o antígeno "F41" (55). Segundo dados de De Graaf et al (21), o antígeno F5 tem um peso molecular de 18.400 daltons e ponto isoelétrico de 9,75. Por outro lado, o antígeno "F41" era constituído por uma proteína, cujas subunidades tinham um peso molecular ao redor de 29.500 daltons, com ponto isoelétrico de 4,6. O antígeno F41, curiosamente, é o único entre os até agora descritos, que contém nada menos do que 10 resíduos do aminoácido hidroxilisina (22).

Smith e Linggood (120) relataram que F5 era codificado por um plasmídio conjugativo cujo peso molecular é de aproximadamente 52 Mdal (123). A bactéria E. coli B41, portadora dos dois tipos de antígenos de aderência, F5 e "F41", em testes de conjugação, transferiu a produção de F5 para outras bactérias, mas nos testes com antissoro anti-"F41" específico não foi detectado o antígeno "F41" nas amostras transconjugantes (22), indicando que a codificação para o antígeno F5 e "F41" não se encontrava no mesmo plasmídio. Até o momento não há qualquer informação sobre os genes que codificam para o antígeno "F41" nem mesmo com relação à sua localização, se cromossômica ou plasmidial.

2.2.3. ANTÍGENO F6

Nagy et al (84,85) descreveram, em 1976, um outro antígeno de aderência, 987P, também importante em casos de diarreia neonatal em suínos. Isaacson e Richter (56) observaram que o antígeno 987P, atualmente designado F6 (95), não possui capacidade hemaglutinante frente a uma grande variedade de hemácias (cobaia, cavalo, carneiro, homem, coelho, boi e galinha), nem a 4°C nem à temperatura ambiente, não sendo possível, por

tanto, utilizar esse tipo de teste na detecção deste antígeno, em amostras E. coli produtoras do mesmo.

Fusco et al (40) purificaram o antígeno F6 por precipitação com cloreto de magnésio, seguida de centrifugação e demonstraram que o mesmo seria composto de subunidades protéicas com peso molecular de 18.900 daltons. Isaacson e Richter (56) também purificaram o F6 e a sua análise química demonstrou que o referido antígeno era composto de proteínas, mas continha ainda um amino-açúcar não identificado. Alguns estudos têm demonstrado que os genes responsáveis pela codificação do antígeno F6 tem localização no cromossomos das bactérias que o produzem (41,85).

2.2.4. ANTÍGENO "F42"

Yano et al (140), em 1986, descreveram em amostras de E. coli enterotoxigênicas (ETEC) de origem suína, um novo antígeno de aderência denominado "F42" e mostraram ser este diferente dos antígenos anteriormente descritos. Esses autores (140) observaram que o antígeno "F42" aglutinava na presença de D-manose, hemácias humana, cavalo, cobaia, coelho e mais especificamente hemácias de galinha. Ainda as amostras de ETEC

"F42"⁺ possuem "in vitro" a capacidade de aderência às células Hela e a enterócitos de suínos. A produção do antígeno "F42" era glicose-dependente quando a amostra portadora era cultivada em meio mínimo. Também o aminoácido L-alanina, numa concentração de 1 mM, ou acetato de sódio (5 mM), inibiram a produção deste antígeno nas amostras cultivadas a 37°C em meio mínimo.

Leite (71) purificou o antígeno "F42" através de cromatografia em Sepharose 4B, após a extração e precipitação com sulfato de amônio, conforme preconizado por Stirm et al (128). Através da eletroforese em PAGE-SDS, verificou que o antígeno apresentava um peso molecular de aproximadamente 31.000 daltons e que seu ponto isoelétrico estava próximo ao pH 3,2.

Silveira (117), em 1986, demonstrou que a expressão do antígeno "F42" era codificada por um plasmídio conjugativo de peso molecular 40,40 Mdal. Este mesmo plasmídio também codificava a produção de enterotoxina STa e resistência aos antibióticos canamicina e estreptomicina apresentando ainda, a capacidade de mobilizar um plasmídio 65.12 Mdal, que era responsável pela resistência à tetraciclina.

2.2.5. OUTROS ANTÍGENOS DE ADERÊNCIA

Aning et al (2) descreveram em três amostras de E. coli (9970, 9972 e W2) de origem suína um novo fator de aderência antígenicamente diferente de F4, F5 e F6. Este antígeno, ao contrário do antígeno "F42", aglutinava somente hemácias de porco. Ainda, na mesma época de nossas pesquisas sobre o antígeno "F42", Fairbrother et al (36) descreveram, em 1986, outro antígeno com estrutura do tipo fímbria (F165) em amostras de E. coli isoladas de suínos com diarreia. Este antígeno era diferente sorologicamente de F4, F5, F6 e "F41" e também apresentava um padrão de hemaglutinação diferente do "F42", ou seja, culturas de bactérias F165⁺ não hemaglutinavam hemácias de boi, cavalo, cobaia e coelho, na presença de D-manose.

2.3. ANTÍGENOS DE ADERÊNCIA EM E. coli ENTEROTOXIGÊNICAS (ETEC) DE ORIGEM HUMANA

2.3.1. ANTÍGENOS F2 e F3

Um antígeno de superfície com propriedades similares ao F4, foi descrito em amostras de ETEC de origem humana, por Evans et al (32), em 1975, por eles denominado CFA/I e, atualmente, designado F2 (95). Posteriormente, Evans e Evans (30) descreveram outro

antígeno de aderência, F3, inicialmente denominado de CFA/II. Smyth (122) observou que o antígeno F3 era constituído por 3 antígenos de superfície diferentes ("coli surface antigens") aos quais denominou cs1, cs2 e cs3. A presença desses antígenos foi associada à visualização em eletroforese de PAGE-SDS, de 3 bandas correspondentes, respectivamente, a 16.300, 15.300 e 14.800 daltons.

Evans et al (31,34) observaram que amostras de ETEC F2⁺ apresentavam a 49°C hemaglutinação manose-resistente com hemácias humanas, de bovino e de galinha, enquanto que amostras F3⁺ aglutinavam apenas hemácias de origem bovina e de galinha.

A purificação do antígeno F2 foi descrita por Klemm (65), utilizando gel filtração em coluna de Sepharose 2B, tendo sido verificado que sua subunidade protéica tinha um peso molecular de 14.500 daltons. Wevers et al (137) reportaram que os pesos moleculares das subunidades de F2 e F3 eram de 12.000 e 13.000 daltons, respectivamente. Freer et al (39) relataram que o ponto isoelétrico do antígeno F2 era 4,8.

Os genes responsáveis pela codificação do antígeno de aderência F2 foram localizados em um plasmídeo de peso molecular próximo a 60 Mdal (32). Reis et al (109) demonstraram que este antígeno localizava-se

em um plasmídio não conjugativo juntamente com genes para enterotoxina STa.

Os antígenos de superfície do fator F3 (cs1, cs2 e cs3) têm também a sua expressão mediada por plasmídio não conjugativos de 59 Mdal (118,119,139).

2.3.2. OUTROS ANTÍGENOS DE ADERÊNCIA

Outros possíveis antígenos de aderência em E. coli enterotoxigênicas (ETEC) de origem humana têm sido descritos desde 1982. No entanto, faltam dados mais conclusivos para definir o seu envolvimento direto na patogenia da diarreia humana causada por estes colibacilos.

Thomas et al (131), em 1982, descreveram um antígeno denominado de E8775 que apresentou, na presença de D-manose, capacidade hemaglutinante com as hemácias de origem bovina e humana.

Em 1983, Darfeuille et al (18) descreveram outro antígeno denominado de "CFA/III" que mostrou padrão de hemaglutinação similar ao do antígeno F2, porém, diferia deste sorologicamente. O referido antígeno apresentou aderência "in vivo" a enterócitos de origem humana. O antígeno CFA/III foi purificado pelos mesmos autores

que verificaram ser o seu peso molecular de 16.000 daltons.

Honda et al (53) descreveram outro antígeno em amostras de ETEC de origem humana denominando-o 260-I. Este, ao contrário de F2,F3 e E8775, apresentou a característica de não aglutinar hemácias de origem humana e bovina, na presença de D-manose. Porém, foi visualizada ao microscópio eletrônico, uma estrutura do tipo fímbria. Esta estrutura, segundo os mesmos autores, tinha um peso molecular de 18.000 daltons.

Recentemente, Darfeuille-Michaud et al (17), em 1986, descreveram em amostras de ETEC, isoladas de crianças com diarreia, um antígeno não hemaglutinante mas cujas bactérias que o produziam eram capazes de aderir a enterócitos humanos. Segundo estes autores (17), este antígeno é de natureza proteica e tem um peso molecular de 16.000 daltons. Um plasmídeo de 66 Mdal está envolvido na sua síntese.

Mais recentemente, Knutton et al (68), em 1987, descreveram uma estrutura do tipo fímbria em amostra de ETEC pertencente ao sorogrupo 0148 que adere às células de mucosa epitelial de intestino humano. De acordo com estes autores, morfologicamente, este antígeno estudado através da microscopia eletrônica, é distinto de F2,F3 e E8775.

2.4. FATORES DE ADERÊNCIA EM AMOSTRAS DE Escherichia coli ENTEROPATOGÊNICA CLÁSSICA (EPEC) E Escherichia coli ENTEROHEMORRÁGICA (EHEC)

Até há pouco tempo, antígenos de aderência, com estrutura do tipo fímbria, eram encontrados somente em amostras de E. coli enterotoxigênicas (ETEC) tanto de origem animal quanto de origem humana. Um provável antígeno de aderência, também com estrutura do tipo fímbria, foi descrito recentemente por Karch et al (60), em 1987, em amostra de EHEC (0157:H7). Estes autores demonstraram que culturas destas bactérias não eram capazes de aglutinar nenhuma das hemácias por eles estudadas, nem aderiam a células da linhagem HEp-2. Apresentavam porém, a capacidade de adesão a células Henle 407, originária do intestino humano.

Além deste antígeno observado em amostra de EHEC, há descrição de um fator de aderência, de estrutura desconhecida, em amostras de E. coli enteropatógênicas clássicas (EPEC). Este fator denominado EAF (enteropathogenic E. coli adherence factor) (86) confere às bactérias que o produzem a capacidade de aderir às células HEp-2 e HeLa e às células epiteliais do intestino do homem e animal (3,13,16,66,78,86,105, (112,113). Scaletsky et al (112), em 1984, mostraram que as amostras de EPEC apresentavam "in vitro" pelo menos dois padrões distintos de aderência: uma aderência localizada (AL), que é caracterizada pela formação de microcolônias em certas áreas de células da linhagem HeLa e, aderência difusa (AD), onde as bactê

rias cobriam de maneira uniforme a superfície destas mesmas células. Nataro et al (86) mostraram que os dois tipos de aderência estudados em células HeLa, com algumas amostras de grupo EPEC, também podiam ser observados em experimentos com células HEp-2. Ainda, Baldini et al (3), Knutton et al (67), McNeish et al (75), Nataro et al (86) e Williams et al (138) observaram que a propriedade de aderência das amostras de EPEC era codificada por um plasmídeo de peso molecular entre 50 a 70 Mdal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAS BACTERIANAS

Quatro amostras de Escherichia coli verocitotoxigênicas (VTEC), por nós designadas 55/3, 494/2, 494/4 e 495/2 foram selecionadas dentre 70 amostras de VTEC de origem bovina (141), por demonstrarem capacidade de aglutinar hemácias humanas (tipo A) e não aglutinarem com os antissoros específicos anti-F4, anti-F5 "F41" e anti-"F42". As quatro amostras de VTEC estudadas foram classificadas pela Dra. H. Saridakis (Universidade Estadual de Londrina, PR) como pertencentes ao sorogrupo O125. O antígeno K não foi determinado.

Como padrões foram utilizadas as amostras de E. coli K12 1476 (F4⁺) e E. coli B41 (F5⁺ / "F41"⁺), ambas gentilmente cedidas pelo Dr. H. W. Moon, NADL, Ames, Iowa, EUA. As amostras de E. coli dos sorogrupos 08 e 055 nos foram fornecidas pelo Dr. L. R. Trabulsi, EPM, SP. e, as amostras 567/7 ("F42"⁺) e MS101 (E. coli K12) pertencem à coleção de bactérias do Departamento de Microbiologia e Imunologia, IB. UNICAMP. Todas as amostras de E. coli acima mencionadas foram mantidas a -70°C em meio de Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Difco Lab.), ao qual, após o cultivo, foi adicionado 15% de glicerol.

3.2. MEIOS DE CULTURA

Para todos os experimentos realizados neste trabalho, as amostras de VTEC em estudo foram cultivadas em meio mínimo sólido (MMS) (23). Observações preliminares, demonstraram ser este meio adequado para a produção do antígeno de aderência EAF44.

Para a obtenção do antígeno de aderência F4, a amostra de E. coli 1476 foi cultivada em ágar nutriente glicosado (58), enquanto que os antígenos de aderência F5 "F41" foram obtidos a partir da cultura da amostra de E. coli B41 em meio de Minca (47). Para o antígeno "F42" a cultura foi realizada em meio mínimo (19) suplementado com 0,5% da glicose, conforme descrito por Leite (71).

3.3. TESTE DE MICROHEMAGLUTINAÇÃO MANOSE-RESISTENTE (MHMR)

3.3.1. Coleta e Preparo de Hemácias

Hemácias de origem humana (tipo A), de cobaia e de galinha foram coletadas no dia do teste, utilizando-se solução de citrato de sódio a 3,8% como anticoagulante (99). As hemácias de cavalo, de carneiro e de boi foram coletadas assepticamente através de punção de veia jugular, em frascos estéreis, contendo solução de Alsever e mantidas a 4°C, por espaço não superior a 1 mês. Para o preparo das suspensões padronizadas de hemácias, as mesmas foram lavadas 3 vezes em salina fisio-

lógica e, em seguida, ressuspensas em salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01 M, pH 7,2, contendo 0,5% de D-manose. As suspensões de hemácias foram padronizadas de modo a conter 5×10^8 células/ml, seguindo-se a técnica utilizada por Pestana de Castro et al (104).

3.3.2. Preparo das Suspensões Bacterianas

O crescimento bacteriano obtido a partir de meio de cultura próprio para cada antígeno de aderência (ver item 3.2.), após 24 horas de incubação a 37°C, foi suspenso em PBS 0,01M, pH 7,2 contendo 0,5% de D-manose, ajustando-se o número de células totais para aproximadamente 9×10^9 bactéria/ml. Para tal utilizou-se o tubo 3 da Escala de MacFarland

3.3.3. Teste

Foram seguidas as recomendações de Jones e Rutter (59), utilizando-se placas de microtítulo (Falcon Plastics) de base côncava. Suspensões bacterianas ou antígeno de aderência semi-purificado (ver item 3.10) foram diluídos em série na razão de 2, diretamente nas placas, em volumes de 50 µl de PBS 0,01M, pH 7,2 contendo 0,5% de D-manose. Após diluição, adicionou-se o mesmo volume da suspensão de hemácias padronizadas. O teste foi realizado em banho de gelo e o resultado

foi lido após 2 horas de incubação.

Uma Unidade Microhemaglutinante Manose-Resistente (U-MHMR) foi definida como a maior diluição das suspensões bacterianas ou do antígeno de aderência semi-purificado que ainda era capaz de aglutinar as hemácias em teste, padronizadas conforme descrita em 3.3.1.

3.4. PREPARO DO ANTÍSSORO

O antissoro anti-EAF41 foi preparado com a amostra de E. coli 55/3, cultivada em MMS a 37°C por 24 horas. Suspensões bacterianas obtidas a partir deste cultivo foram suspensas em solução salina estéril e padronizada de acordo com o tubo 3 da Escala Mac Farland (9×10^9 bactérias/ml). Foram inoculados 2 coelhos albinos jovens através de injeções na veia marginal da orelha em intervalos de 3 a 4 dias, seguindo-se a recomendação de Edward e Ewing (28) para a obtenção de antissoro anti-OK, perfazendo um total de 5 injeções, cujos volumes foram, respectivamente, 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; e 4,0 ml. Sete dias após a última inoculação, foi feita a sangria dos animais através de punção cardíaca. O soro obtido foi então exaustivamente absorvido com suspensões bacterianas da cultura da mesma amostra de E. coli cultivada a 16°C, até que o soro não aglutinasse mais com a suspensão bacteriana obtida da amostra de E. coli 55/3, cultivada à mesma temperatura.

Testes de soroaglutinação em lâmina realizado com o soro assim absorvido e suspensões bacterianas da mesma amostra incubada a 37°C por 24 horas permitiu verificar que o soro foi capaz de aglutinar a amostra 55/3 até a diluição de 1:64.

3.5. TESTE DE INIBIÇÃO DE MICROHEMAGLUTINAÇÃO MANOSE-RESISTENTE (IMHMR)

Como está descrito no item 3.3., inicialmente, foi determinado o título de MHMR das suspensões bacterianas padronizadas das amostras de VTEC (55/3, 494/2, 494/4 e 495/2) e de ETEC (1476, B41 e 567/7). Para o teste de IMHMR foi seguida a seguinte técnica: a um volume de 25 µl de suspensão bacteriana de cada uma das amostras de E. coli contendo 3 U-MHMR foi adicionado o mesmo volume de diferentes diluições de antissoros anti-EAF44 ou anti-F4 ou anti-F5 "F41" ou anti-"F42". Após a incubação a 37°C por 1 hora, foram adicionados de acordo com a sequência dos antissoros, respectivamente, 50 µl de hemácias de origem humana, de cobaia, de cavalo e de galinha, mantendo-se as placas de microtítulo a 4°C por 2 horas, quando então foi observada a ocorrência ou não de inibição da capacidade de MHMR. O título de inibição da reação foi considerado como recíproco da maior diluição dos antissoros em estudo que inibiram a aglutinação de hemácias pelas amostras de VTEC e ETEC.

3.6. ESTUDOS DE FATORES QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO DO ANTÍGENO EAF44

3.6.1. Efeito da Temperatura

Procuramos verificar o efeito das temperaturas de 37°C e 16°C na produção do antígeno EAF44. Para tal, a amostra de E. coli 55/3 foi semeada em MMS, procedendo-se a incubação a 37°C por 24 horas e a 16°C por 72 horas. O crescimento bacteriano de cada uma das amostras foi suspenso em PBS contendo 0,5% de D-manose e, em seguida, padronizado e examinado pelo teste de MHMR frente a hemácias humanas.

3.6.2. Efeito da Glicose

Para verificar o efeito da concentração de glicose na produção do antígeno EAF44, utilizamos o MMS suplementado com diferentes concentrações de glicose (0; 0,1; 0,5; e 1,0%) onde foi semeada a amostra de VTEC 55/3. Suspensões bacterianas obtidas a partir do crescimento destas amostras, uma vez padronizadas, foram examinadas pela prova de MHMR frente a hemácias humanas.

3.6.3. Efeito da Alanina

A amostra de E. coli de origem bovina 55/3, foi cultivada em MMS contendo diferentes concentrações (10, 5 e 1 mM) do aminoácido D-L Alanina. As bactérias, após o cultivo a 37°C por 24 horas, foram suspensas em PBS contendo 0,5% de D-manose e examinadas através da prova de MHMR com hemácias humanas.

3.6.4. Efeito do Acetato de Sódio

Para verificar o efeito do acetato de sódio na produção do antígeno EAF44 a amostra de VTEC de origem bovina 55/3, foi cultivada em meio mínimo contendo diferentes concentrações deste sal (100, 50, 10 e 5mM). Após 24 horas a 37°C as bactérias foram suspensas em PBS com D-manose e ensaiadas pela prova de MHMR com hemácias de origem humana.

3.6.5. Efeito do pH do Meio Mínimo na Produção do Antígeno EAF44

A base do meio mínimo (MMS) foi ajustada em diferentes pHs (5,4; 6,3; 7,2; e 8,2). A amostra de VTEC foi então cultivada neste meio por 24 horas a 37°C e as suspensões bacterianas foram examinadas pelo teste de MHMR, frente a hemácias humanas.

3.7. TESTE DE ADERÊNCIA

O teste de aderência "in vitro" das células bacterianas da amostra de VTEC 55/3, cultivada em MMS a 37°C por 24 horas foi realizado em células HeLa, seguindo a técnica descrita por Scaletsky et al (112). Como controle negativo foi utilizada amostra MS 101 (E. coli K12). Como padrão de aderência localizada (AL) foi usada a amostra de E. coli 055 e para aderência difusa (AD), a amostra de E. coli 08.

3.8. TESTE DE INIBIÇÃO DE ADERÊNCIA

O teste para verificação de inibição da aderência das células bacterianas às células HeLa foi realizado do seguinte modo: 0,1 ml de suspensão bacteriana (9×10^8 UFC/ml) das amostras de VTEC 55/3 e de ETEC 1476(F4⁺), B41(F5⁺"F41"⁺) e 575/7("F42"⁺) foram pré-incubadas durante 30 minutos a 37°C com igual volume de antissoro anti-EAF44, diluído a um título subaglutinante (1:216) em relação à amostra de E. coli 55/3. Após essa incubação da suspensão bacteriana com antissoros, prosseguiu-se o teste de aderência como está descrito em 3.7.

3.9. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Células bacterianas da amostra de E. coli 55/3, cultivadas em MMS, incubada a 37°C por 24 horas e a 16°C por 72 horas, foram observadas em microscópio eletrônico (Zeiss) operado a 80 Kw, após a colora-

ção negativa com 1% de ácido fosfotungstico, pH 7,0.

3.10. EXTRAÇÃO E SEMI-PURIFICAÇÃO DO ANTÍGENO DE ADE-
RÊNCIA EAF44

Para este fim, a amostra de E. coli 55/3 foi cultivada no MMS, em garrafas de Roux, a 37°C por 24 horas e as culturas resultantes foram suspensas com auxílio de bastão de vidro, em tampão fosfato 0,05M, pH 7,2 contendo 1M de NaCl. A extração do antígeno foi feita por agitação em homogeneizador Sorvall (Sorvall Omni Mixer), na escala 7 por 15 minutos. Após esse tratamento, o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 5°C e o sedimento foi dispensado. O sobrenadante (extrato bruto), assim obtido, foi então precipitado com sulfato de amônio em concentrações crescentes de 25, 45, 65 e 80% de saturação. O material de cada saturação do sulfato de amônio foi centrifugado e o precipitado ressuspenso em tampão fosfato 0,05M, pH 7,2 e dialisado exaustivamente contra o mesmo tampão. De acordo com o observado por nós e, seguindo as recomendações de Korhonsen et al (70), o antígeno de aderência EAF44, precipitado com 25% de saturação do sulfato de amônio foi tratado por 72 horas a 4°C com tampão fosfato contendo 0,5% de desoxicolato de sódio (DOC). O material foi então re-centrifugado a 10.000 rpm a 5°C e o sobrenadante (DOC-solúvel) foi novamente dialisado contra o mesmo tampão fosfato. Este material foi considerado como antígeno de aderência EAF44 semi-purificado (EAF44-sp).

3.11. CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA

3.11.1. Imunodifusão Dupla

A técnica de imunodifusão dupla para o estudo sorológico comparativo com outros antígenos de aderência foi realizado seguindo as indicações de Ouchterlony (97). Os orifícios no gel foram feitos com molde próprio para este fim, sendo a distância entre os mesmos padronizada. Nesses orifícios foram aplicados 20 µl de antígenos F4, F5, "41", "F42" e EAF44-sp, cada um deles padronizados para as concentrações de 0,5 mg de proteína por ml. Cada um dos antígenos foi estudado frente aos antissoros homólogos e heterólogos (anti-EAF44, anti-F4, anti-F5 "F41" e anti-"F42"). As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 24 horas à temperatura ambiente, lavadas com salina fisiológica, secas, sendo em seguida coradas com solução de "Coomassie brilliant blue" (Merk).

3.11.2. Imunoeletroforese

Foram realizadas segundo as indicações de Grabar e Burtin (44). Uma camada de ágar "Noble" de 15 mm de espessura, a 1%, preparado em tampão veronal 0,05M, pH 8,6 foi solidificado sobre lâminas de

vidro (9 x 12 cm). Em orifícios escavadas no ágar foram aplicados 10 µl dos antígenos EAF44, "F41" e "F42" contendo 0,5 mg/ml de proteínas. Uma diferença de potencial de 6 volts/cm foi aplicada por 80 minutos. Em canaletas feitas no gel, foram aplicados em cada uma 100 µl de cada um dos antissoro anti-F5 "F41", anti-"F42" e anti-EAF44. Após incubação por 24 horas, em câmara úmida, a lâmina foi lavada várias vezes com salina fisiológica, seca e corada com "Coomassie brilliant blue" (Merk).

3.12. ESTUDOS HISTOLÓGICOS

O teste de alça ligada em coelhos (42) foi usada com a finalidade de estudar as alterações histológicas do intestino destes animais causadas pelas amostras de VTEC 55/3, cultivada a 37°C em TSB por 20 horas e padronizadas aproximadamente de acordo com o tubo 3 da Escala de Mac Farland (9×10^9 bactérias/ml). Os coelhos foram deixados em jejum durante 48 horas antes do teste recebendo apenas água "ad libitum". Os animais foram anestesiados por inalação com éter sulfúrico procedendo-se em seguida a tricotomia da parede abdominal. Após assepsia da parede abdominal com álcool iodado a 5%, foi feita uma incisão de aproximadamente 10 cm, na linha umbilical. Os intestinos delgado e grosso foram expostos e lavados intraluminalmente com solução fisiológica estéril, a partir do duodeno proximal,

procurando-se manipular o menos possível este órgão. Partindo-se de uma distância de 60 cm do duodeno foram feitas alças ligadas de aproximadamente 10 cm cada, sempre intercaladas por uma alça menor de 2 cm (inter-alças). Em seguida, cada alça foi inoculada com 1 ml de suspensão bacteriana padronizada.

Após as inoculações, os intestinos foram recolocados na cavidade abdominal, procedendo-se a sutura do peritônio, camada muscular e pele. Após 20 horas, os animais foram sacrificados sendo os intestinos delgado e grosso retirados para o estudo histológico. Secções transversais do intestino delgado e do intestino grosso, com largura não superior a 0,5 cm foram fixados em Bouin por 24 horas, e então incluídos em parafina, segundo técnica histológica rotineira. Cortes de 6 μ m de espessura foram obtidos e, após a desparafinização, foram corados pela Hematoxilina-Eosina. Uma vez coradas, as lâminas foram montadas em Bálsamo do Canadá, e examinadas a microscopia óptica comum.

4. RESULTADOS

4.1. TESTE DE MICROHEMAGLUTINAÇÃO MANOSE-RESISTENTE (MHMR)

Na Tabela 1 estão demonstrados os resultados dos testes de microhemaglutinação manose-resistente (MHMR) realizados com as hemácias de origem humana, de cobaia, de cavalo e de galinha, utilizando as suspensões bacterianas das amostras de E. coli 1476 ($F4^+$), B41 ($F5^+$ " $F41$ " $^+$), 567/7 (" $F42$ " $^+$), 55/3 (EAF44 $^+$), 494/2 (EAF44 $^+$), 494/4 (EAF44 $^+$) e 495/2 (EAF44 $^+$) assim como seus respectivos antígenos semi-purificados. Como pode-se observar nesta Tabela, o antígeno do tipo fímbria denominado EAF44, tanto em suspensões bacterianas quanto semi-purificados, foi capaz de aglutinar somente hemácias de origem humana. Observa-se na mesma Tabela que outros antígenos de aderência, presentes em amostras do grupo ETEC, apresentaram padrões diferentes, alguns bastante estritos como por exemplo, F4 e F5 semi-purificados que aglutinaram, respectivamente, apenas hemácias de cobaia e cavalo. Outros, como " $F42$ ", mostraram padrão de aglutinação mais amplo no caso específico deste antígeno, aglutinando hemácias humanas, cobaia, cavalo e galinha.

É importante ressaltar ainda que, as suspensões bacterianas das 4 amostras de VTEC por nós estudadas, todas, como já mencionamos, são pertencentes ao sorogrupo 0125 e apresentaram padrão de hemaglutinação idêntico, isto é, aglutinaram exclusivamente hemácias humanas (Tabela 1).

4.2. TESTE DE INIBIÇÃO DE MICROHEMAGLUTINAÇÃO MANOSE- -RESISTENTE (IMHMR)

A Tabela 2 mostra que, o antissoro anti-EAF44 específico, conforme descrito em Material e Métodos, foi capaz de inibir a atividade microhemaglutinante (MHMR) das amostras de VTEC 55/3, 494/2, 494/4 e 495/2. No entanto, este mesmo antissoro não inibiu as reações de microhemaglutinação que ocorrem com as amostras de ETEC produtoras dos antígenos de aderência F4, F5 "F41" e "F42".

4.3. FATORES QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO DO ANTÍGENO EAF44

A temperatura de incubação para cultivo da amostra de VTEC 55/3 interferiu na produção do antígeno EAF44, pois quando cultivada no MMS a 16°C por 72 horas não apresentou a capacidade de aglutinar hemácias de origem humana. Entretanto, quando essa amostra de VTEC foi cultivada no mesmo meio de cultura a 37°C por 24 horas apresentou capacidade de microhemaglutinação de hemácias humanas na presença de D-manose (Tabela 3).

Para verificar se a adição de glicose no MMS estimulava ou inibia a produção do antígeno EAF44, a amostra de VTEC 55/3 foi cultivada neste meio de cultura, suplementado com diferentes concentrações de glicose. Observou-se que a amostra em estudo, quando cultivada em meio sem glicose, não apresentou atividade microhemaglutinante. Por outro lado, a adição de glicose ao MMS em concentrações que variaram de 0 a 1%

tornaram a suspensão bacteriana da amostra de VTEC 55/3 capaz de aglutinar hemácias humanas na prova de MHMR. Se observa ainda na Tabela 3 que a variação de concentrações da glicose, no intervalo estudado, não ocasionou diferença significativa da atividade hema-glutinante da amostra de VTEC 55/3, com títulos que variaram entre 1/32 e 1/64. Também a adição DL - alamina não interferiu na expressão do antígeno EAF44, quando examinado pela MHMR, mesmo nos cultivos realizados na presença de 10 mM deste aminoácido (Tabela 3). A mesma Tabela mostra ainda que concentrações crescentes de acetato de sódio, que variaram de 5 a 100 mM, interferiram na expressão do antígeno EAF44, medida pela prova de MHMR. Assim, por exemplo, a concentração de 5 mM deste sal parece não ter tido nenhum efeito na capacidade da atividade MHMR da amostra de VTEC 55/3. Contudo, a partir das concentrações 25 mM deste sal, a atividade de MHMR da amostra de VTEC 55/3 começou a decrescer, para se tornar completamente negativo na concentração de 100 mM de acetato de sódio.

Tabela 3 mostra que amostra de E. coli 55/3, produtora de antígeno de aderência EAF44, não apresentou atividade MHMR quando cultivada em MMS em pH 5,4. Entretanto, quando cultivada em pH neutro ou em alcalino (pH 8,2) esta mesma amostra apresentou capacidade de aglutinar hemácias humanas.

4.4. TESTE DE ADERÊNCIA

A Figura 1a mostra que a amostra de E. coli VTEC 55/3 cultivada a 37°C apresentou "in vitro" a ca

pacidade de aderência do tipo difuso (AD) às células HeLa, mesmo na presença de D-manose. O pré-tratamento da mesma amostra de VTEC, cultivada a 37°C por 24 horas, com antissoro anti-EAF44 inibiu efetivamente a capacidade desta amostra em aderir às células HeLa (Figura 1b).

4.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Em microscopia eletrônica, a amostra de VTEC 55/3, quando incubada a 37°C por 24 horas, apresentou estruturas do tipo fímbria na periferia das células (Figura 2a), enquanto que nas células bacterianas da mesma amostra cultivada a 16°C não se observou a presença destas estruturas (Figura 2b).

4.6. EXTRAÇÃO E SEMI-PURIFICAÇÃO DO ANTÍGENO EAF44

O antígeno de aderência EAF44, em forma solúvel, livre de células bacterianas, foi obtido por agitação em homogeneizador, das células bacterianas em suspensão. Foi verificado que a fração obtida pela precipitação com 25% de saturação do sulfato de amônio apresentou maior atividade específica que fração obtida com saturação entre 25 a 45% do sulfato de amônio (Tabela 4). Em outras palavras, a fração obtida com 25% de saturação do sulfato de amônio necessita 0,4 µg de proteína para se obter uma unidade microhemaglutinante manose-resistente, enquanto que para fração obtida entre 25 a 45% de saturação do sulfato de amônio foi necessário 4,8 µg de proteína para se obter

o mesmo resultado. Na Tabela 4 estão demonstrados os passos da semi-purificação do antígeno de aderência EAF44. A atividade específica do material foi de 3.000 U-MHMR/mg de proteína e a atividade relativa aumentou 150 vezes em relação ao extrato bruto e sua recuperação foi de 53%.

4.7. CARACTERÍSTICA SOROLÓGICA

4.7.1. Imunodifusão Dupla

Por este teste constatamos que o antígeno EAF44 semi-purificado foi reconhecido pelo antissoro específico e não houve reações cruzadas com os antissoros anti-F4, anti-F5"F41" e anti-"F42". Do mesmo modo, o antissoro anti-EAF44 reconheceu somente o antígeno homólogo, não reagindo com os antígenos F4, F5, "F41" e "F42" semi-purificados (Figura 3a).

4.7.2. Imunoeletroforese

Na Figura 3b podemos observar que o antissoro anti-EAF44 não reconheceu os antígenos "F41" e "F42", reagindo apenas com o antígeno homólogo. Os antissoros anti-F5"F41" e anti-"F42" não reconheceram o antígeno EAF44 semi-purificado. Na mesma Figura observamos ainda que o antígeno EAF44 apresentou uma banda protéica a qual migrou ligeiramente para o

cátodo, apresentando pois mobilidade eletroforética semelhante a do antígeno "F42".

4.8. ESTUDOS HISTOLÓGICOS

Foram observadas diversas alterações morfológicas, tanto no intestino delgado (ID) quanto no intestino grosso (IG). A maioria delas estava relacionada com modificações de natureza necrótica da mucosa que, basicamente, consistiram seguinte:

- a) Hiperemia generalizada dos vasos.
- b) Resíduos hemorrágicos evidentes e grande quantidade de restos celulares indistintos, presentes na luz intestinal.
- c) Severa desorganização da estrutura histológica da vilosidade do ID, em especial do epitélio de revestimento, que ficou resumido a pequenos agrupamentos de células com padrão epitelióide, exibindo acidofilia citoplasmática, e núcleos com padrões cromatínicos alterados, tendendo à picnose e/ou fragmentação nuclear. As mesmas alterações foram também observadas nas células epiteliais de revestimento do IG (Figura 4a).
- d) No ID, as glândulas de Brunner apareceram pouco alteradas. As glândulas de Lieberkühn do ID e IG apresentaram profundas modificações organizacionais em seu terço superior, enquanto que no terço inferior as alterações foram praticamente inde-

tectáveis (Figura 4b) e,

- e) A lâmina própria da mucosa apresentou-se totalmente modificada, notadamente pela presença de restos nucleares. Estes são provavelmente resultantes da degeneração das células epiteliais sobrejacentes, porém, podem ter tido origem nas próprias células do conjuntivo.

TABELA 1. Resultados dos testes de MHMR^a realizados com diferentes tipos de hemácias e amostras de *E. coli* e seus respectivos antígenos de aderência semi-purificados

Hemácias	Antígenos de aderência ^b semi-purificados					Suspensão bacteriana ^c						
	F ₄	F ₅	"F ₄₁ "	"F ₄₂ "	EAF ₄₄	1476 ^d (F ₄ ⁺)	B41 ^e (F ₅ ⁺ "F ₄₁ " ⁺)	567/7 ^f ("F ₄₂ " ⁺)	55/3 ^g (EAF ₄₄)	494/2 ^g (EAF ₄₄)	494/4 ^g (EAF ₄₄)	495/2 ^g (EAF ₄₄)
Homem	_h	-	128	128	256	-	32	16	128	64	64	64
Cobaia	256 ⁱ	-	512	256	-	64	32	32	-	-	-	-
Cavalo	-	256	128	128	-	-	64	32	-	-	-	-
Galinha	-	-	-	512	-	-	-	128	-	-	-	-

a) Teste de microhemaglutinação manose-resistente.

b) Antígenos semi-purificados contendo 50 ug de proteína por ml.

c) Suspensão bacteriana contendo 9×10^8 UFC/ml.

d) Cultivada em agar nutriente glicosado (58).

e) Cultivada em meio de Minca (47).

f) Cultivada em meio mínimo (19) sólido suplementado com 0,5% de glicose.

g) Cultivadas em meio mínimo (23) sólido.

h) Negativo ou menor do que 4.

i) Os títulos são representados pelo recíproco da mais alta diluição das suspensões bacterianas ou antígenos semi-purificados que ainda mostravam MHMR positiva.

TABELA 2. Inibição da MMRH^a das amostras de *E. coli* com os antissoros anti-F₄, F₅"F₄₁", F₄₂ e EAF₄₄

Antissoros	Suspensão bacteriana contendo 3U MMR ^b							
	55/3 ^c	494/2 ^c	494/4 ^c	495/2 ^c	1476 ^d	B ₄₁ ^d	B ₄₁ ^e	567/7 ^f
	(EAF ₄₄ ⁺)	(EAF ₄₄ ⁺)	(EAF ₄₄ ⁺)	(EAF ₄₄ ⁺)	(F ₄ ⁺)	(F ₅ ⁺ "F ₄₁ " ⁺)	(F ₅ ⁺ "F ₄₁ " ⁺)	("F ₄₂ " ⁺)
EAF ₄₄ ^g	1024 ^k	512	512	512	-	-	-	-
F ₄ ^h	- ^l	-	-	-	1024	-	-	-
F ₅ "F ₄₁ " ⁱ	-	-	-	-	-	1024	2048	-
"F ₄₂ " ^j	-	-	-	-	-	-	-	2048

a) Teste de microhemaglutinação manose-resistente (MMHR).

b) Unidade de MMR (ver Material e Métodos).

c) Teste de MMR realizado com hemácias humanas.

d) Teste de MMR realizado com hemácias de cobaia.

e) Teste de MMR realizado com hemácias de cavalo.

f) Teste de MMR realizado com hemácias de galinha.

g) Antissoro preparado com amostra de *E. coli* 55/3 e absorvido com a mesma amostra cultivada a 16°C.

h) Antissoro preparado com amostra de *E. coli* 1476 e absorvido com a mesma amostra cultivada a 16°C.

i) Antissoro preparado com amostra de *E. coli* B₄₁ e absorvido com a mesma amostra cultivada a 16°C.

j) Antissoro preparado com amostra de *E. coli* 567/7 e absorvido com a mesma amostra cultivada a 16°C.

k) Os títulos são representados pelo recíproco da mais alta diluição de antissoros que ainda inibia a MMR.

l) Negativo ou menor do que 4.

TABELA 3. Fatores que afetam a expressão do antígeno de aderência EAF₄₄ no título de MHMR^a da amostra de VTEC 55/3

		Fatores estudados ^b																	
Temperatura		Glicose (%)				Alanina (mM)			Acetato de Sódio (mM)					pH					
37°C	16°C	0	0,1	0,5	1,0	0	5	10	0	5	25	50	100	5,4	6,3	7,2	8,2		
Título em MHMR		64°C	- ^d	-	32	64	64	32	32	32	64	64	16	8	-	-	32	64	64

a) Teste de microhemaglutinação manose-resistente realizado com hemácias do homem.

b) Os fatores foram estudados utilizando-se o meio mínimo (23) sólido.

c) Os títulos são representados pelo recíproco da maior diluição das suspensões bacterianas que ainda mostravam MHMR positiva.

d) Reação negativa.

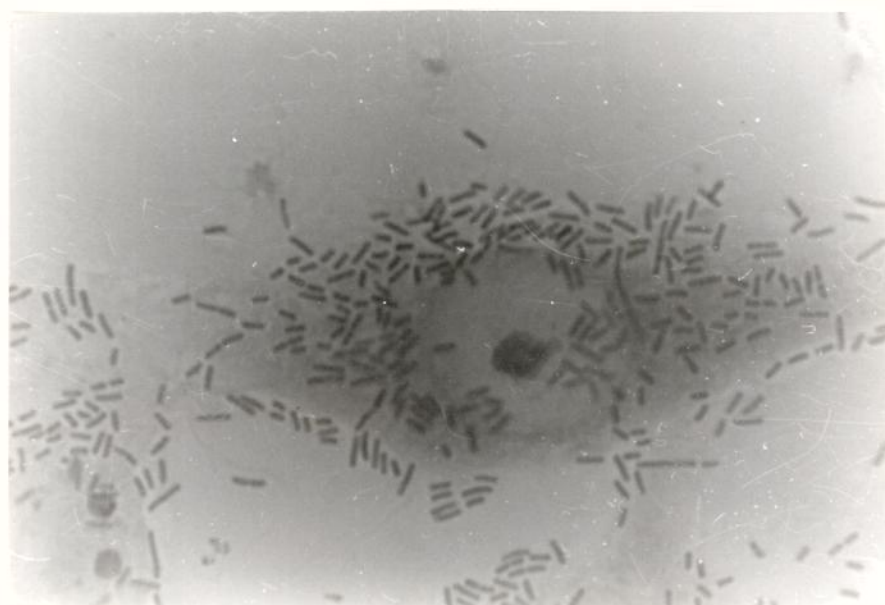


FIGURA 1a - Fotomicrografia de aderência às células HeLa da amostra de VTEC 55/3 cultivada a 37°C.

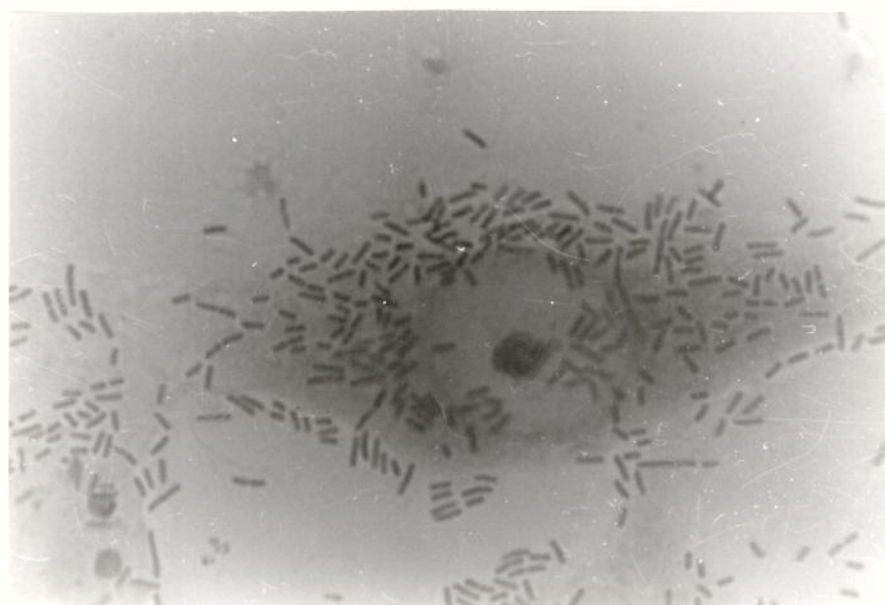


FIGURA 1a - Fotomicrografia de aderência às células HeLa da amostra de VTEC 55/3 cultivada a 37°C.

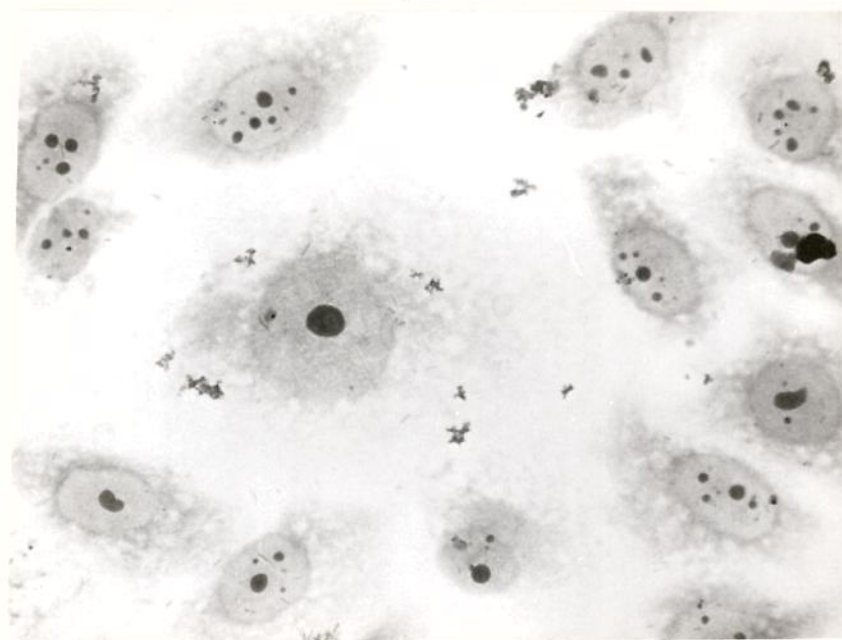


FIGURA 1b - Inibição da aderência às células HeLa da amostra de VTEC 55/3 por antissoro anti-EAF44.

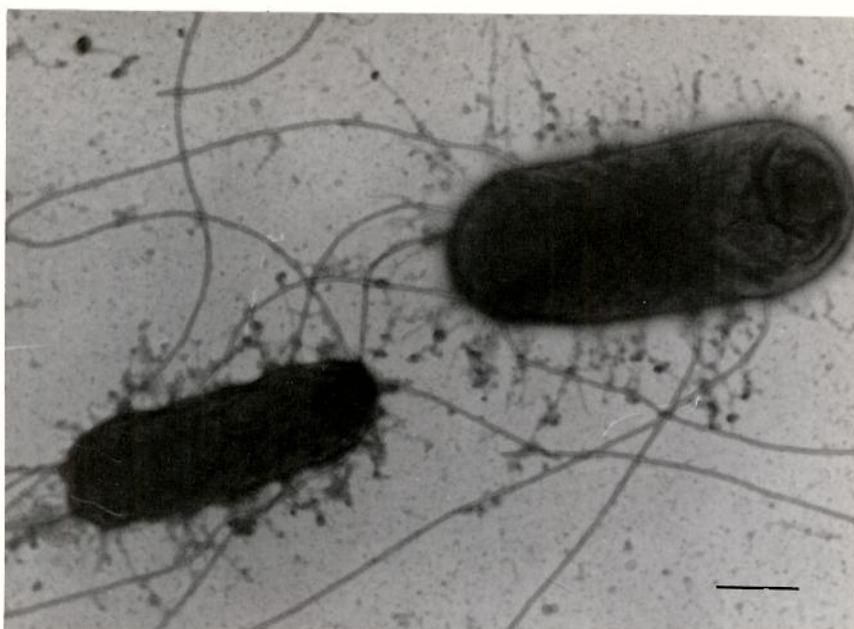


FIGURA 2a - Eletromicrografia da amostra de VTEC 55/3, cultivada a 37°C em MMS. As bactérias foram coradas negativamente com ácido fosfotungstico.



FIGURA 2b - Eletromicrografia da amostra de VTEC 55/3, cultivada a 16°C por 72 horas em MMS. As bactérias foram coradas negativamente com ácido fosfotungstico

TABELA 4. Semi-purificação do antígeno de aderência EAF44 da amostra de VTEC 55/3

	Proteína Total (mg) ^a	Atividade Total (U-MHMR) ^b	Atividade Específica (U-MHMR/mg)	Atividade Relativa	Recuperação (%)
Extrato Bruto ^c	960,0	19.200,0	20,0	1	100
Precipitação com (NH ₄) ₂ SO ₄ (saturação)					
0 - 25%	6,3	15.750,0	2.500,0	125	80,8
25 - 45%	18,5	3.862,5	208,3	(10,4)	
45 - 65%	25,3	960,4	38,0	(1,9)	
65 - 80%	5,9	60,0	10,1	(0,5)	
DOC solúvel ^d	3,4	10.240,0	3.012,0	150,6	53,3

a) Determinado por método descrito por Hartree (50).

b) Uma unidade é definida como maior diluição do material que ainda era capaz de aglutinar as hemácias humanas.

c) Sobrenadante obtido pela homogeneização de suspensões bacterianas.

d) O material precipitado com 25% de saturação do sulfato de amônio foi tratado com desoxicolato de sódio (DOC).

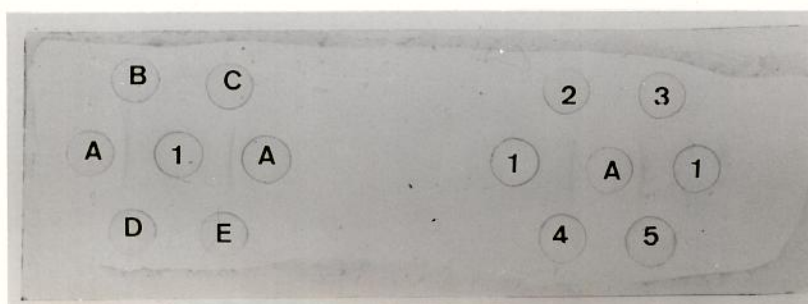


FIGURA 3a - Imunodifusão em gel dos antígenos de aderência EAF44 (1); F4(2); F5(3); "F41"(4) e "F42"(5), frente aos antissoros hólogo e heterólogos. antissoros anti-EAF44(a); anti-F4(b); anti-F5(c); anti-"F41" (d) e anti-"F42" (e).

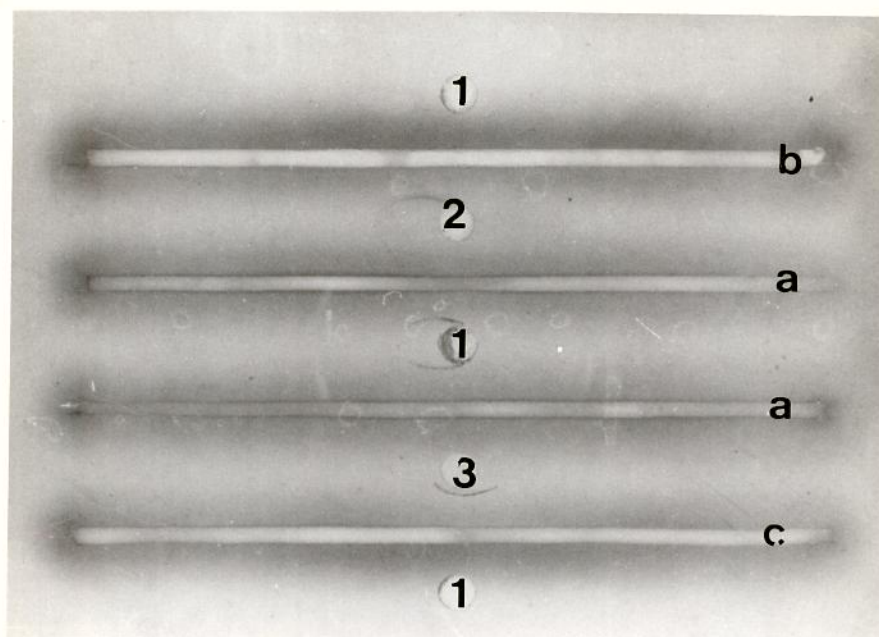


FIGURA 3b - Imunoeletroforese dos antígenos de aderência EAF44 (1); "F41" (2) e "F42" (3) frente antissoros homólogos e heterólogos: antissoros anti-EAF44 (a), anti-"F41" (b) e anti-"F42".

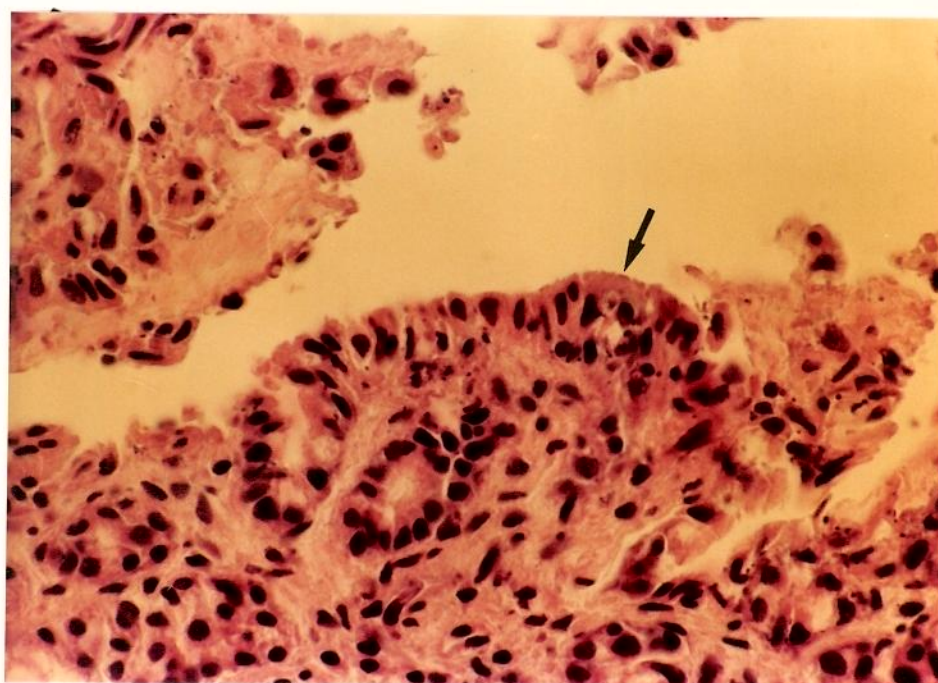


FIGURA 4a - Fotomicrografia de corte histológico do intestino grosso de coelho inoculado com amostra de VTEC 55/3 em alça ligada. Notar alterações do epitélio de revestimento, em especial picnose nuclear e degeneração celular (Seta). Coloração HE. Aumento 640 X

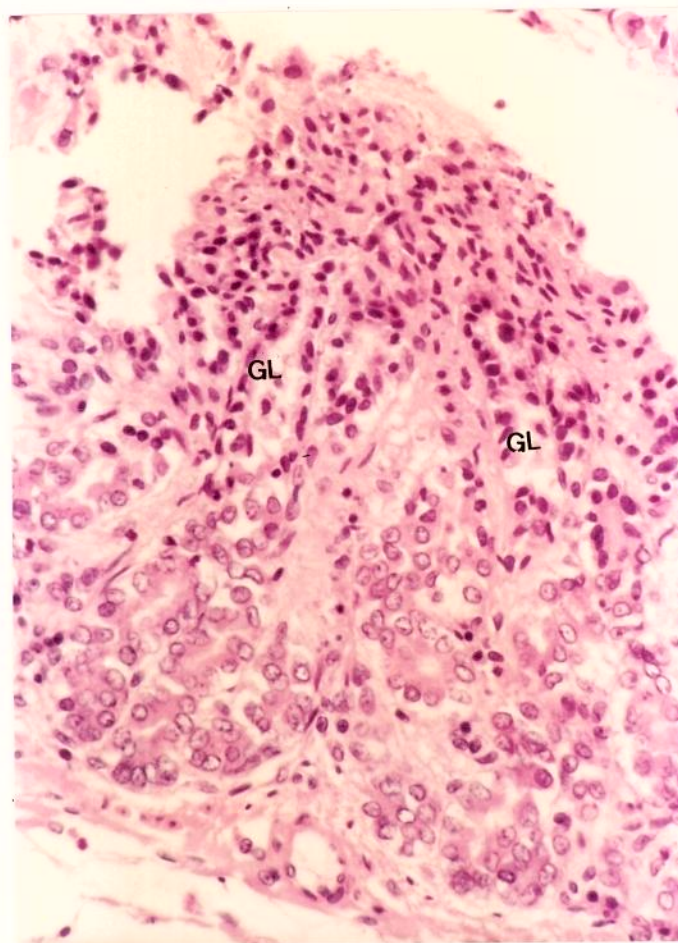


FIGURA 4b - Fotomicrografia de corte histológico do intestino grosso de coelho inoculado com amostra de VTEC 55/3, em alça ligada. Observar desorganização no epitélio de revestimento e terço superior das glândulas de Lieberkühn (GL). Coloração HE. Aumento 400 X.

5. DISCUSSÃO

Embora ainda não se disponha de uma evidência direta de que a VT seja um dos fatores responsáveis por doenças entéricas, tanto no homem como em animais, como já está estabelecido para as enterotoxinas STs e LTs de E. coli do grupo ETEC, vários estudos epidemiológicos e experimentais com amostras de VTEC de origem humana (13,14,54,67,100,105) e animais (10,11,55,56,67,69,101,102,103,107) sugerem, fortemente, de que a VT deva possuir uma função biológica análoga à da toxina de Shigella dysenteriae, ou seja, inibição da biossíntese de proteínas e degeneração de células da mucosa intestinal, com consequente inflamação e diarreia (87). A semelhança do que ocorre com os colibacilos do grupo ETEC, a aderência de amostras de VTEC às células epiteliais do intestino do homem e animais é provavelmente indispensável para que ocorra diarreia nos indivíduos susceptíveis.

Na atualidade, quando são estudados os diferentes mecanismos de patogenicidade, principalmente em bactérias gram-negativas, tem sido demonstrado que, na etapa inicial da relação parasito-hospedeiro, nos defrontamos sempre com o fenômeno da aderência da bactéria às células sensíveis (132). Na maior parte das vezes, esta adesão tem sido mediada, como já mencionamos anteriormente, por estruturas do tipo fímbria capazes de aglutinar em presença de D-manose hemácias humanas e/ou de animais. Em outros casos, como acontece com amostras de E. coli do grupo EPEC, esta aderência tem sido demonstrada não só "in vitro" como "in vivo" (13,27,72,78,105), embora não se conheça ainda, exatamente, que tipo de estrutura estaria envolvida neste processo.

De qualquer modo, alguns autores têm dado a esta adesina a designação de EAF (enteropathogenic E. coli adhesive factor) (86).

Levando-se em consideração estes fatos, bem como também, as observações de que algumas amostras do grupo EPEC produzem VT (27,67,69,72,87), adotamos como raciocínio a hipótese de que as amostras de VTEC, por nós isoladas de bezerros com diarreia, deveriam possuir uma adesina semelhante a encontrada em amostras do grupo EPEC.

Assim sendo, na presente investigação, 4 amostras de VTEC (55/3,494/2,494/4,495/2) entre 70 outras isoladas de bezerros com diarreia (141) foram selecionadas com base na sua capacidade de microhemaglutinação manose-resistente (MHMR).

Conforme verificamos em resultados (Tabela 1), as amostras de VTEC em questão aglutinaram somente hemácias humanas, demonstrando, portanto, um perfil de MHMR igual a V-A, da classificação feita por Evans et al (35) para as amostras de E. coli enteropatogênicas de origem humana. Esta adesina, provisoriamente por nós designada de EAF44, quando semi-purificada através de processo semelhante ao usado para o antígeno "F42" (71), demonstrou a mesma atividade de MHMR.

Estes resultados sugeriam a existência de alguma estrutura presente nos sobrenadantes das culturas por nós examinadas que, após o procedimento especificado em Material e Métodos para sua purificação, ainda mantinha a capacidade de MHMR frente a hemácias humanas, também observada nas suspensões bacterianas das culturas originais por nós

estudadas.

Diante destes achados parecia-nos, pois, admissível supor, como aliás foi demonstrado posteriormente, que atividade de MHMR presente nas amostras de VTEC pesquisadas era mediada por uma estrutura do tipo fímbria, com características diferentes das até então descritas em E. coli do grupo ETEC de origem animal. Mesmo em se considerando que as amostras de ETEC de origem animal, produtoras dos antígenos "F41" e "F42", também aglutinaram, em títulos elevados, hemácias de origem humana (Tabela 1), verifica-se que o perfil de MHMR destas amostras, e/ou seus antígenos semi-purificados, é completamente distintos do observado com o antígeno EAF44, reforçando pois a nossa suposição de estarmos diante de um novo tipo de adesina.

Os resultados da Tabela 2, ou sejam, aqueles referentes à inibição da MHMR (I-MHMR), mostraram que o antissoro anti-EAF44 inibiu especificamente apenas a MHMR das amostras de VTEC por nós estudadas. Por outro lado, os antissoros anti-F4, anti-F5 "F41" e anti-"F42" não inibiram a MHMR das amostras de EAF44⁺, embora o fizessem, respectivamente, com relação às suspensões bacterianas homólogas.

Sabe-se da literatura, que os fatores de colonização de amostras do grupo ETEC, em especial aqueles codificados por plamídios, têm a sua expressão "in vitro" influenciada por diferentes fatores, tais como: meio de cultura, temperatura, pH, presença de glicose, alanina e acetato de sódio (20,37,41,55,71,134).

Experimentos preliminares (dados não apresentados) mostraram que entre os diferentes meios de cultura por nós

analisados, o meio mínimo sólido, MMS, (23) e/ou o meio de CFA (32) se comportaram de modo semelhante na produção "in vitro" do antígeno EAF44, quando detectado pela prova de MHMR. Como o MMS utilizado tinha composição definida, foi o escolhido em todos os experimentos de nossa pesquisa, em especial aqueles referentes ao estudo dos fatores que poderiam interferir na expressão do antígeno EAF44. Em outras palavras, é sabido que apresentam resultados mais confiáveis, experimentos que avaliam a ação de substâncias na expressão de antígenos bacterianos, quando se utilizam para tal meios de composição definida.

Assim sendo, os resultados da Tabela 3 mostram a expressão do antígeno de aderência EAF44, medida pela capacidade de MHMR da amostra de VTEC 55/3 cultivada em MMS, sob a influência de variações dos fatores por nós estudados.

Deste modo, a temperatura de incubação da amostra de VTEC 55/3 influenciou decisivamente na expressão do antígeno EAF44. Mais especificamente, somente cultivos incubados a 37°C expressaram este antígeno, ao contrário das culturas crescidas a 16°C. É interessante chamar a atenção para o fato que vários fatores de colonização, codificados por plasmídeos, descritos em amostras de ETEC, quer de origem animal, quer de origem humana, têm mostrado comportamento semelhante quanto a influência da temperatura de incubação das culturas (41). Esta propriedade, aliás, foi por nós utilizada na obtenção de antissoro específico para o antígeno EAF44, a semelhança do que tem sido feito por outros pesquisadores no preparo, por exemplo, de antissoros anti-antígenos F4 e F5 (41,46).

Verifica-se na mesma Tabela, que o antígeno EAF44, detectável por prova de MHMR, não foi produzido em meio mínimo, quando o pH deste estava ao redor de 5,4. Em pH superior houve expressão do antígeno EAF44, sugerindo que quanto a influência do pH do meio de cultura, a produção de EAF44 deva comportar-se de modo semelhante ao já relatado por van Verseveld et al (134) e por Leite (71), respectivamente, para os antígenos F5 "F41" e "F42". Os mecanismos discutidos pelos primeiros autores (134) para explicar a influência do pH na expressão dos antígenos F5 "F41" envolvem conceitos sobre a concentração de biomassa bacteriana, sendo a produção destes antígenos favorecida quando os níveis intracelulares de polifosfato de guanósina e de AMP cíclico são baixos, sendo inibida em situação inversa. Sem querer detalhar em demasia nossos achados sobre influência do pH na expressão do antígeno EAF44, os resultados da presente pesquisa sugerem, mais uma vez, similaridades entre os antígenos de aderência das amostras do grupo ETEC de origem animal e do grupo VTEC, EAF44⁺.

Na Tabela 3, vemos ainda que no MMS sem glicose não houve produção do antígeno EAF44 pela amostra VTEC 55/3. Por outro lado, concentrações de glicose entre 0,1 a 1,0% promoviam a expressão do antígeno EAF44 pela mesma amostra de VTEC, cultivada em MMS incubada a 37°C por 24 horas. Se consultarmos a literatura sobre a influência da glicose na expressão, por exemplo, do antígeno F5 veremos que existem dados contraditórios. Assim sendo, Isaacson (55) relatou que 0,5% deste carboidrato inibia a produção do antígeno F5, enquanto Francis et al (37) verificaram que a expressão deste antígeno "in vitro", não era inibida por concentrações

de glicose de até 1,0%. Uma análise mais detalhada dos trabalhos desenvolvidos por Isaacson (55) e Francis et al (37) permite verificar que estas disparidades talvez possam ser explicadas pelo fato destes autores terem utilizados meios de cultura diferentes, em suas pesquisas. Na realidade, nossos resultados, quanto a influência da glicose na expressão do antígeno EAF44, se aproximam bastante dos achados de Francis et al (37) e Leite (71). Como nós, estes autores utilizaram o meio mínimo para estudar efeito da glicose respectivamente, na expressão dos antígenos F5 e "F42", obtendo dados semelhantes aos conseguidos com o antígeno EAF44.

De Graaf et al (20) e Contrepolis et al (15), confirmando trabalho anterior de Isaacson (55), relataram que a concentração de 1 mM de L-alanina adicionada ao MMS reprimia a biossíntese do antígeno F5. Recentemente, Leite (71) observou que este aminoácido também inibia a produção do antígeno "F42". Ao que tudo indica, é provável que inibição da produção "in vitro" dos antígenos F5 e "F42" pela L-alanina se dê por mecanismos semelhantes. Segundo Isaacson (55), a L-alanina não afetaria diretamente a regulação genética da síntese de F5, mas, atuaria, indiretamente, sobre a membrana bacteriana, a qual tem papel ativo na biossíntese deste antígeno.

No que tange ao antígeno EAF44, não conseguimos detectar nenhuma influência da adição de DL-alanina ao MMS. Nos estudos por nós realizados quanto aos fatores que afetam a produção "in vitro" de outros antígenos de aderência, em especial F4, F5 e "F41", esta foi, por assim dizer, a primeira e única discordância por nós observada. Em outras culturas, mesmo concentrações elevadas (10 mM) de DL-alanina

não tiveram nenhuma influência na produção do antígeno EAF44, detectável pela prova de MHMR. Provavelmente, a produção do antígeno EAF44 deva ocorrer por via metabólica diferente daquela citada para os antígenos F5 e "F42" (20,71).

Finalmente, ainda na Tabela 3, verificamos que a adição ao MMS de concentrações crescentes de acetato de sódio, que variaram entre 5 a 100 mM, foram capazes de inibir de modo inversamente proporcional a expressão do antígeno EAF44, que foi totalmente reprimida na concentração de 100 mM deste sal. Resultados semelhantes foram obtidos por Francis et al (37) e por Leite (71), respectivamente, para os antígenos F5 e "F42". O mecanismo pelo qual o acetato de sódio afeta biossíntese não só de F5 como também de "F42", e EAF44 é desconhecido. Embora no terreno especulativo, a hipótese lançada por Francis et al (37), em relação à influência do acetato de sódio na expressão do antígeno F5, não deixa de ser interessante e talvez aplicável aos demais antígenos de aderência em especial aos antígenos "F42" e EAF44. Segundo estes autores, a produção do antígeno F5 só é vantajosa para os colibacilos ETEC enquanto a bactéria estiver presente no intestino delgado de um animal. Provavelmente, por mecanismos de auto-regulação, estes colibacilos evoluíram no sentido de suprimir a biossíntese do F5 e, conseqüentemente, conservar energia e nutrientes quando a expressão do mesmo não fosse necessária. Assim sendo, quando fora do hospedeiro, uma redução da temperatura do ambiente ou o acúmulo de produtos da fermentação como por exemplo, o acetato de sódio, poderiam funcionar como um "sinal" para a bactéria no sentido de que ela não mais está em seu hospedeiro. Em outras palavras, a presença do acetato de sódio, provavelmente por um mecanismo do tipo "Feedback"

levaria os microrganismos a não mais sintetizarem este antígeno de aderência. Diferenças, de natureza quantitativa, por nós encontradas quanto a necessidade de uma maior quantidade de acetato de sódio para inibir a produção de EAF44, quando comparada com a de "F42" (71), são dignas de menção, uma vez que concentrações iguais ou inferiores a 5 mM de acetato de sódio inibiram a produção de "F42", ao passo que foram necessários pelo menos 25 mM do mesmo sal, para se observar um decréscimo na produção de EAF44 (Tabela 3). Na realidade, a concentração inibitória mínima de acetato de sódio para o antígeno EAF44 foi pelo menos 20 vezes maior do que aquela observada para o antígeno "F42" (71). Apesar das hipóteses levantadas sobre um provável mecanismo do tipo "Feedback" para explicar a influência do acetato de sódio na expressão do antígeno EAF44, não encontramos justificativas para as diferenças quantitativas acima citadas.

Os testes de aderência "in vitro", utilizando células HeLa e/ou HEp-2 têm sido intensamente usados para estudar as adesinas presentes em colibacilos do grupo ETEC (41,140) e mais recentemente, do grupo EPEC (3,13,16,67,75, 86,112,138). Assim sendo, Scaletsky et al (112) observaram que cultivos de colibacilos do grupo EPEC colocados em contatos com células HeLa apresentavam aderência, principalmente do tipo localizado (AL), formando microcolônias em certas áreas das células HeLa. Por outro lado, as amostras de E. coli de outros sorogrupos, ainda que pertencentes, por exemplo ao grupo ETEC, quando apresentavam o fenômeno de aderência as mesmas células, o faziam difusamente, isto é, se fixando em toda superfície da célula (AD) (112,132).

Considerando-se que as amostras do grupo EPEC, segundo alguns autores (27,67,72,87) teriam na produção de VT uma explicação para a etiopatogenia da diarreia por elas causadas e, lembrando que as 4 amostras de E. coli VT⁺ por nós isoladas de bezerro com diarreia foram classificadas como pertencentes ao sorogrupo 0125 (enquadrado no sorogrupo de EPEC), nossa expectativa era de que os testes de aderência às células HeLa, com as nossas amostras de VTEC, dessem uma aderência do tipo AL.

Contudo, nossos resultados referentes aos testes de aderência às células HeLa mostraram que essa era do tipo AD (Figura 1a), contrariando, portanto, pelo menos aparentemente, o exposto acima quanto a importância da aderência localizada para amostras de colibacilos do grupo EPEC. Uma análise mais detalhada do trabalho de Nataro et al (86), permite verificar que os mesmos, embora tenha trabalhado com apenas uma amostra de origem humana pertencente ao sorogrupo 0125, observaram também que a mesma era dotada de aderência do tipo AD. Este dado, ainda que obtido com apenas uma amostra do sorogrupo 0125, é compatível com os por nós conseguidos em relação à amostra de VTEC 55/3, os quais podem ser extrapolados com base nos resultados da MMR e I-MMR para os demais amostras, de VTEC estudadas. Por outro lado, apesar da maior importância que se tem atribuído a AL para amostras do grupo EPEC (132), é importante ressaltar que a AD continua sendo investigada, em amostras de EPEC, tão intensamente quanto a AL. Tanto isso é verdade, que já se sabe que estas propriedades (AL e AD) são provavelmente codificadas por plasmídios de peso molecular de 55 a 70 MDal (86). Knutton et al (66,67) recentemente confirmaram que a adesão às células HEp-2 por uma amostra de E. coli do so-

rogrupo 0127 era codificada por plasmídios de 60 MDal., cuja perda ocasionava a incapacidade desta bactéria aderir a células HEp-2.

Quer se trate de AL, quer AD, até recentemente, conforme já mencionamos, se desconhecia que estruturas poderiam estar envolvidas nestes fenômenos de aderência. Foi portanto, com alguma surpresa, que verificamos, conforme veremos a seguir, ser aderência difusa por nós observada em amostras de VTEC de origem bovina, mediada por uma estrutura do tipo fímbria cujas características preliminares tais como MHMR, I-MHMR por soro específico, influência da temperatura na expressão do antígeno EAF44, etc., sugeriam estar mos diante de uma nova adesina.

Esta hipótese foi ainda mais reforçada quando observamos que esta aderência, do tipo AD, às células HeLa era manose-resistente e que o antissoro anti-EAF44 a inibia especificamente (Figura 1b).

Contrariando o que se conhecia estruturas envolvidas na aderência do tipo AL, observada em amostras do grupo EPEC, Knutton et al (66,67) já citados, utilizando células HEp-2, descreveram um plasmídio (PMR2) que codifica um antígeno que promove a adesão da amostra E2348 (sorogrupo 0127) às células HEp-2, sugerindo, estes mesmos autores, o que em nossa opinião é importante, ser esta adesina possivelmente uma fímbria.

Em se admitindo esta possibilidade, isto é, da AL em amostra do grupo EPEC ser mediada por uma estrutura do tipo fímbria, não seria de se estranhar, como demonstramos em nossa pesquisa, que AD em amostras de VTEC, do sorogrupo

do 0125, isolada de bezerros, fosse também promovida por um antígeno com estrutura do tipo fímbria.

Os estudos realizados através de microscopia eletrônica, utilizando cultivos a 37°C da amostra de VTEC 55/3, em MMS, revelaram, conforme se pode verificar na Figura 2a, estruturas bem delicadas do tipo fímbria. As mesmas estruturas não foram observadas nas culturas desta amostra cultivadas a 16°C, por 72 horas. Estes resultados não deixam dúvidas, conforme já havíamos demonstrado através de provas de MHMR, que a expressão do antígeno EAF44 sofre influência da temperatura de incubação das culturas.

Estudos em andamentos, não apresentados (W.D. Silveira - Comunicação pessoal), sugerem fortemente que a expressão desta fímbria é provavelmente codificada por plasmídio. Em se confirmando esta pesquisa, os nossos achados nos estudos de microscopia eletrônica são compatíveis com o que se tem verificado para outras fímbrias também codificadas por plasmídios, que atuam como fatores de colonização, presentes em amostras de E. coli do grupo ETEC, quer de origem animal, quer de origem humana (41). Em outras palavras, a maioria destas fímbrias não é visualizada a microscopia eletrônica, em cultivos destas amostras incubadas a 16°C (41).

Não nos foi possível fazer um estudo comparativo sob ponto de vista estrutural, com base na microscopia eletrônica, entre o antígeno EAF44 e os antígenos de aderência presentes em amostras do grupo ETEC. Todavia, quando já havíamos terminado a parte experimental de nossa pesquisa, ao examinarmos em detalhe o trabalho de Knutton et al (67) sobre a presença de adesinas em amostras de E. coli do gru-

po EPEC (0127), percebemos uma certa analogia entre "as fímbrias" descritas por aqueles autores e o antígeno EAF44, isto é, em ambos os casos estas fímbrias não se distribuem de maneira muito uniforme ao redor das bactérias em estudo.

É importante ressaltar, contudo, que o trabalho de Knutton et al (67) se refere a uma amostra do grupo EPEC, do sorogrupo 0127 que apresenta aderência do tipo AL em células HEp-2. Em nosso caso, embora as amostras de VTEC EAF44⁺ tenham sido isoladas de bovino e pertença ao sorogrupo 0125, também enquadrado entre colibacilos do grupo EPEC, nos testes de aderência, em células HeLa, apresentaram aderência do tipo AD. Independentemente do tipo de aderência a ser considerado, levando-se em conta que amostras do grupo EPEC, segundo diversos relatos podem produzir VT (27,67,72,87), é lógico admitir-se que estas fímbrias, em particular nos estudos por nós realizados, tenham influência na colonização "in vivo" de animais susceptíveis.

A nossa suposição é reforçada pelo trabalho de Karch et al (60) que descreveram um novo antígeno de aderência do tipo fímbria, codificado por plasmídio, em amostras do grupo EHEC, do sorotipo 0157:H7, sabidamente produtora de VT (129).

Diante do exposto, os nossos estudos utilizando a microscopia eletrônica deixam evidente a provável importância do antígeno EAF44, identificado como uma estrutura do tipo fímbria, na etiopatogenia na diarreia em bezerros por amostras de VTEC do sorogrupo 0125.

A conduta utilizada para semi-purificação do antígeno EAF44 pode ser considerada como eficiente para os ob

jetivos a que nos propusemos. Assim sendo, conseguimos, partindo do extrato bruto (sobrenadante de cultura da amostra VTEC 55/3) um aumento da atividade relativa do antígeno EAF44 equivalente a 156 vezes a existente na preparação inicial, com uma porcentagem de recuperação correspondente a 53,3% (Tabela 4). Como veremos a seguir, o antígeno EAF44 semi-purificado, quando usado em provas sorológicas, ficou aparentemente livre de contaminantes que pudessem reagir cruzadamente com os antissoros preparados com os antígenos F4, F5 "F41" e "F42".

Os testes sorológicos por nós realizados, ou sejam, a imunodifusão dupla (Figura 3a) e a imunoeletroforese (Figura 3b), confirmam um fato que já havia se delineado quando, através das provas de inibição da MHMR, verificou-se que atividade hemaglutinante de suspensões bacterianas das amostras de VTEC produtoras do antígeno EAF44 só era inibida por antissoro homólogo, não se observando nenhuma inibição desta hemaglutinação quando foram utilizados os antissoros anti-F4, anti-F5 "F42" e anti "F42" (Tabela 2).

Pode-se concluir, portanto, que o antígeno EAF44 é distinto antigenicamente dos antígenos F4, F5, "F41" e "F42". A imunoeletroforese mostrou ainda, que a mobilidade do antígeno EAF44 era semelhante a do antígeno "F41", ou seja, migrou ligeiramente para o cátodo (Figura 3b).

Com base no trabalho de Pai et al (98) que estudaram a infecção experimental em coelhos com amostras de grupo EHEC (sorotipo 0157:H7), também produtora de VT, resolvemos utilizar com nossas amostras o mesmo modelo, através do teste convencional de alça ligada de coelho (42). Esta pesquisa teve como finalidade principal, não propriamente

verificar a colonização de nossas amostras de VTEC em intestino de coelho, mas, sim, pressupondo que esta colonização poderia ocorrer naturalmente "in vivo" nesses e em outros animais susceptíveis, averiguar qual seria o efeito da VT no epitélio intestino de coelhos, utilizando para tal técnicas histológicas.

Os resultados obtidos não deixam dúvidas quanto a profundas alterações na mucosa intestinal dos coelhos inoculados, causadas por culturas da amostra de VTEC 55/3 (Figuras 4a e 4b). Entre estas alterações, é importante ressaltar, que ocorreu como já mencionamos em resultados, uma severa desorganização da estrutura histológica da mucosa dos intestinos delgado e grosso, em especial no epitélio de revestimento, que ficou resumido a pequenos agrupamentos de células com padrão epitelióide. As glândulas de Lieberkühn também apresentaram modificação no seu terço superior e a lâmina própria mostrou-se também alterada, com a presença de restos nucleares.

De certo modo, as alterações histológicas por nós observadas foram bastante semelhantes às descritas por Moxley e Francis (83) que, trabalhando com bezerros gnotobióticos, verificaram que uma amostra de E. coli do sorotipo 05:H⁺, também produtora de VT, era capaz de aderir às microvilosidade do intestino destes animais, causando degeneração dos enterócitos bem como necrose e destruição do epitélio de revestimento do intestino grosso e do íleo.

Resultados semelhantes foram relatados recentemente por vários autores sobre aderência de amostras do grupo EPEC de origem humana à membrana de enterócitos causando destruição das microvilosidade do epitélio de revestimento

(78,105,108,133).

Em resumo, embora não tenhamos tido a oportunidade de realizar inoculação experimental em bezerros, com as amostras de VTEC produtoras do antígeno EAF44, todos os resultados por nós obtidos sugerem que, com as amostras por nós estudadas, a diarreia em bezerros deva ter ocorrido como consequência de: a) colonização do intestino destes animais pelos colibacilos em questão e b) produção "in vivo" da citotoxina VT. Mais especificamente, considerando-se que não nos foi possível, nestas mesmas amostras, detectar outro antígeno de aderência que não o EAF44, tal colonização deve ter sido mediada pelo antígeno EAF44. Como as amostras em questão não eram produtoras nem de LT nem de STa (141), diante dos nossos achados histológicos em coelhos e, levando-se em consideração outros relatos da literatura sobre atual importância da VT na etiopatogenia das diarreias em animais e no homem (12,14,27,72,74,76,78) é altamente provável que os casos de diarreia em bezerros por nós relatados (141) tenham tido como etapa inicial, a colonização dos intestinos desses animais mediada pelo antígeno EAF44, atuando como fator determinante da diarreia a produção de VT.

Estudos a serem levados a efeito posteriormente, envolvendo a purificação do antígeno EAF44, a natureza da sua codificação e provavelmente a infecção experimental em bezerros que não tenham mamado o colostro fornecerão, sem dúvida, subsídios para se esclarecer definitivamente a importância deste antígeno na etiopatogenia da diarreia de bezerros por amostras VTEC EAF44⁺.

Como conclusão, ficou evidente, na presente pesquisa, a descrição de um novo antígeno de aderência do tipo fímbria, biológica e sorologicamente diferente dos fatores de colonização F4, F5, "F41" e "F42". Por outro lado, tanto quanto saibamos, no que concerne as amostras de VTEC de origem bovina, a descrição deste antígeno é original, não se encontrando na literatura observações semelhantes quanto a presença de antígenos de aderência do tipo fímbria em amostras de VTEC de origem animal.

6. RESUMOS E CONCLUSÕES

Entre 70 amostras de Escherichia coli verocitotoxigênicas (VTEC) isoladas de bezerros com diarreia foram selecionadas 4 (55/3, 492, 494/4, 495/2), sorologicamente identificadas como pertencentes ao sorogrupo 0125, que, quando examinadas pela prova de microhemaglutinação manose-resistente (MHMR) foram capazes de aglutinar apenas hemácias humanas. Este dado sugeria a possibilidade de que tais amostras fossem produtoras de um antígeno de aderência, por nós designado provisoriamente de EAF44.

Suspensões bacterianas destas amostras cultivadas em meio mínimo sólido (MMS), incubado a 37°C, e/ou o antígeno EAF44 semi-purificado obtido a partir destes cultivos, foram estudados através de diferentes procedimentos que incluíram:

- a) Atividade MHMR comparada com a descrita para outros fatores de colonização tais como: F4, F5, "F41" e "F42";
- b) inibição da MHMR, usando-se antissoros homólogos e heterólogos para os antígenos acima mencionados;
- c) fatores que poderiam influenciar na expressão do antígeno EAF44 "in vitro", utilizando-se para tal, a prova de MHMR frente a hemácias humanas e/ou microscopia eletrônica. Entre esses fatores selecionamos: temperatura de incubação das culturas, variação de pH do meio de cultura (MMS) e, adição a este de, compostos tais como glicose, acetato de sódio e DL-alanina;

- d) teste de aderência às células HeLa em presença de D-manose da amostra de VTEC 55/3 cultivada a 37°C e a 16°C. Inibição desta aderência com antissoro anti-EAF44;
- e) estudo através da microscopia eletrônica da amostra de VTEC 55/3 produtora de antígeno EAF44, com a finalidade de identificar na mesma a presença de estruturas do tipo fímbria;
- f) semi-purificação do antígeno EAF44, usando-se técnicas semelhantes às descritas, com este objetivo, para outros antígenos de aderência;
- g) estudos das relações antigênicas entre o antígeno EAF44 e outros fatores de colonização (F4, F5, "F41" e "F42"), descritos em amostras E. coli enterotoxigênicas (ETEC) de origem animal;
- h) pesquisa, através de teste de alça ligada de coelho, de possíveis alterações histológicas causadas pelas amostras de E. coli 55/3, produtora do antígeno EAF44 e de verocitotoxina (VT).

Os principais resultados e conclusões decorrentes destes estudos podem ser assim resumidos:

- 1) As amostras de VTEC, isoladas de bezerros com diarreia e por nós estudadas, foram capazes de aglutinar, especificamente, na presença de D-manose, apenas hemácias humanas. Resultados semelhantes foram obtidos com o antígeno EAF44 semi-purificado. Este perfil de MHR mostrou ser totalmente distinto dos descritos para outros

fatores de colonização, mas especificamente F4,F5,"F41" e "F42".

- 2) Os testes de inibição de MHMR mostraram que apenas antissoro anti-EAF44 foi capaz de inibir efetivamente a hemaglutinação das amostras de VTEC (55/3,494/2,494/4,495/2), sugerindo, portanto, que o antígeno em questão era antigenicamente diferente dos demais fatores de colonização por nós estudados.
- 3) Entre os fatores que poderiam influenciar na expressão do antígeno EAF44 "in vitro" foi verificado que:

3.1. A produção do antígeno EAF44, quando medida por teste MHMR e verificada através da microscopia eletrônica, foi inibida quando cultura da amostra VTEC 55/3 era incubada a 16°C. Ao contrário, em cultivos incubados a 37°C houve produção do antígeno EAF44. Estes resultados são bastante semelhantes aos observados com outros fatores de colonização, codificados por plasmídios presentes em amostras de ETEC de origem animal.

3.2. A adição de glicose, ao MMS, a semelhança do que ocorre como antígeno "F42" é necessário para expressão deste antígeno, detectável pela prova de MHMR.

3.3. A adição de DL-alanina ao MMS não interferiu na produção do antígeno EAF44 em culturas da amostra de VTEC 55/3, quando examinada pela prova de MHMR. Estes resultados são contrários aos observados com

os antígenos F5, "F41" e "F42" cuja produção foi inibida por este aminoácido.

3.4. A produção do antígeno EAF44, mediada pela prova de MHMR, foi inibida por acetato de sódio adicionado ao MMS na concentração de 100mM. Estes resultados foram parcialmente semelhantes aos obtidos com relação ao antígeno "F42" que, cuja produção, embora inibida por este sal, ocorreu em concentrações menores.

3.5. Culturas da amostra de VTEC 55/3 cultivadas em MMS com pHs que variaram entre 5,4 a 8,2 mostraram, a semelhança do que já foi relatado para os antígenos F5 e "F42", que a produção do antígeno EAF44, também examinada pela prova de MHMR, não ocorreu em pH ácido.

4) Os resultados obtidos nos testes de aderência às células HeLa da amostra de E. coli 55/3 cultivada a 37°C, mostrou uma aderência do tipo difuso, mesmo na presença de D-manose. O teste de inibição de aderência frente a antissoro anti-EAF44 demonstrou que este fenômeno era efetivamente causado pelo antígeno EAF44.

5) Os estudos de microscopia eletrônica, aliados a outros dados referentes a MHMR e aderência à células HeLa e respectiva inibição destas propriedades por antissoro anti-EAF44, mostraram que este antígeno era constituído por uma estrutura do tipo fímbria, cuja expressão ocorria em cultivos incubados a 37°C, sendo porém, inibida

quando a temperatura de incubação era 16°C. Estes dados são semelhantes aos relatados para outros fatores de colonização, presentes em amostras de E. coli do grupo ETEC de origem humana e animal.

6. Os testes de imunodifusão dupla e imunoeletroforese provaram, que o antígeno EAF44 é antigenicamente diferente dos demais fatores de colonização incluídos na presente pesquisa, ou seja, F4, F5, "F41" e "F42".
7. A inclusão do teste de alça ligada em coelhos, no estudo da amostra de E. coli 55/3 produtora de VT e do antígeno EAF44, partiu do pressuposto de que este antígeno de aderência é na realidade, um provável fator de colonização para os bezerros susceptíveis. Este ensaio teve, portanto, como objetivo, pelas características do teste, averiguar uma ação direta da VT sobre o epitélio intestinal destes animais. Entre várias alterações observadas foi relevante o achado histológico de uma severa desorganização da estrutura da mucosa do intestino delgado e do intestino grosso, em especial no epitélio do revestimento. Foram observadas ainda alterações na lâmina própria da mucosa, caracterizados por restos nucleares. Estes achados foram semelhantes a outros relatos da literatura sobre experimentos "in vivo" realizados com amostras de VTEC de origem humana e animal.
8. Finalmente, diante de todos os resultados por nós obtidos, podemos afirmar que as amostras de VTEC, isoladas de bezerros com diarreia, pertencentes ao sorogrupo 0125 produzem um antígeno de aderência do tipo fímbria, semelhante em várias propriedades aos antígenos F5, "F41"

e "F42", porém, distinto destes, sob o ponto de vista antigênico. Ao que nos consta, é este o primeiro relato na literatura sobre a existência de um antígeno de aderência com estas características em amostras de E. coli do grupo VTEC isoladas de bezerros com diarreia.

7. BIBLIOGRAFIA

1. ALDERETE, J. F. and ROBERTSON, D. C. Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 19: 1021-1030, 1978.
2. ANING, K. G., THOMLINSON, J. K., WRAY, C., SOJKA, W. J. and COULTER, J. Adhesion factor distinct from K88,K99,F41, CFA/I and CFA/II in porcine Escherichia coli. Ver.Rec. 112:251, 1983.
3. BALDINI, M. M., KAPER, J. B., LEVINE, M. M., CANDY, D.C.A. and MOON, H. W. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic Escherichia coli. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2:534-538, 1983.
4. BEERY, J. T., DOYLE, M. P. and HIGLEY, N. A. Cytotoxic activity of Escherichia coli 0157:H7 culture filtrate on the mouse colon and kidney. Current Microbiol. 11:335-342, 1984.
5. BEERY, J. T., DOYLE, M. P. and SCHOENI, J. L. Colonization of chicken cecae by Escherichia coli associated with hemorrhagic colitis. Appl. Environ. Microbiol. 49:310-315, 1985.

6. BLUMENSTOCK, E. and JANN, K. Adhesion of pillated Escherichia coli strains to phagocytes: differences between bacteria with mannose-sensitive pili and those with mannose-resistant pili. *Infect. Immun.*, 35:264-269, 1982.
7. BRINTON, C. C. Jr. The structure, function, synthesis and genetic control of bacteria pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria. *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, 27:1003-1054, 1965.
8. BURGESS, M. N., BYWATER, R. J., COWLEY, C. M., MULLAN, N.A. and NEWSOME, P. M. Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable Escherichia coli enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits and calves. *Infect. Immun.*, 21: 526-531, 1978.
9. BURROWS, M. R., SELLWOOD, R., GIBBONS, R. A. Haemagglutinating and adhesive properties associated with the K99 antigen of bovine strains of Escherichia coli. *J. Gen. Microbiol.*, 96:269-75, 1976.
10. CANTEY, J. R. and BLAKE, R. K. Diarrhea due to Escherichia coli in the rabbit: a novel mechanism. *J. Infect. Dis.* 135:454-462, 1977.
11. CHANTER, N., MORGAN, J.H., BRIDGER, J.C., HALL, G. A. and REYNOLDS, D. J. Dysentery in gnotobiotic calves caused by an atypical Escherichia coli. *Vet.Rec.* 114:71, 1984.

12. CHEN, C., KUME, T., HOHDATSU, T. and TSUBAKI, S. Escherichia coli originated from diarrhea of suckling piglets in Taiwan. III. Ability to produce enterotoxin and Vero cytotoxin. *Kitasato Arch. Exp. Med.* 57:221-226, 1984.
13. CLAUSEN, C. R. and CHRISTIE, D. L. Chronic diarrhea in infants caused by adherent enteropathogenic Escherichia coli. *J. Pediatr.* 100:358-361, 1982.
14. CLEARY, T. G., MATHEWSON, J. J., FARIS, E. and PICKERING, L. K. Shiga-like cytotoxin production by enteropathogenic Escherichia coli serogroups. *Infect. Immun.*, 47:335-337, 1985.
15. CONTREPOIS, M., GIRARDEAU, J. P., DUBOURGUIER, H. C. and GOUET, P. Miss en evidence de quelques facteurs intervenant dans la biosynthese de l'ag K99, p. 206-227. In POHL, P. & LEUNER, J. (ed). Resistance and pathogenic plasmids. C.E.C. Seminar 1981, Brussels, National Institute for Veterinary Research, 1982.
16. CRAVIOTO, A., GROSS, R. J., SCOTLAND, S. M. and ROWE, B. An adhesive factor found in strains of Escherichia coli belonging to the traditional enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.*, 3:95-99, 1979.
17. DARFEUILLE-MICHAUD, A., FORESTIER, C., JOLY, B. and CLUZEL, R. Identification of a nonfimbrial adhesive factor of an enterotoxigenic Escherichia coli strains. *Infect. Immun.*, 52:468-475, 1986.

18. DARFEUILLE, A., LAFEUILLE, B., JOLY, B and CLUZEL, R.
A new colonization factor antigen (CFA/III) produced by enteropathogenic Escherichia coli 0128:B12. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 134 A, 53-64, 1983.
19. DAVIS, B. D. and MINGLIOLI, E. S. Mutants of Escherichia coli requiring methionine or vitamin B. J. Bact. 60:17-28, 1950.
20. de GRAAF, F. K., KLAASEN-BOOR, P. and van HEES, J. E.
Biosynthesis of the K99 surface antigen is repressed by alanina. Infect. Immun., 30:125-128, 1980.
21. de GRAAF, F. K., KLEMM, P. and GAASTRA, W. Purification, characterization and partial covalent structure of the adhesive antigen K99 of Escherichia coli. Infect. Immun., 33:877-883, 1981.
22. de GRAAF, F. K. and ROORDA, I. Production, purification and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from the calf enteropathogenic Escherichia coli strains B41M. Infect. Immun., 36:751-753, 1982.
23. de GRAAF, F. K., WIENTJES, F. B. and KLAASEN-BOOR, P.
Production of K99 antigen by enterotoxigenic Escherichia coli strains of antigen groups 08.09, 020, and 0101 grown at different conditions. Infect. Immun., 27:216-221, 1980.
24. DUGUID, J. P., SMITH, W., DEMPSTER, G. and EDMUNDS, P.N.
Nonflagellar filamentous appendages ("fimbriae") and haemagglutinating activity in Bacterium coli. J. Pathol. Bacteriol., 70:335-348, 1955

25. DUGUID, J. P., ANDERSON, E.S. and CAMPBELL, I. Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. J. Pathol. Bacteriol., 92:107-137, 1966.
26. DUGUID, J. P. and OLD, D. C. Adhesive properties of Enterobacteriaceae, p. 185-217. In: Beachey, E. H. (ed.) Bacterial adherence, receptor and recognition, series B, vol. 6. Chapman and Hall. London, 1980.
27. EDELMAN, R. and LEVINE, M. M. Summary of a workshop on enteropathogenic Escherichia coli. J. Infect. Dis., 147:1108-1118, 1983.
28. EDWARDS, P. R. and EWING, W. H. Identification of Enterobacteriaceae. Burgess Publishing Co., E.U.A.
29. EVANS, D. G., EVANS, D. J. and PIERCE, N. F. Differences in the response of rabbit small intestine to heat-stable enterotoxins of Escherichia coli. Infect. Immun., 7:873-880, 1973.
30. EVANS, D. G. and EVANS Jr., D. J. New surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic Escherichia coli of serogroups 06 and 08. Infect. Immun., 21:638-647, 1978.
31. EVANS Jr., D. J., EVANS, D. G. and DuPONT, H. L. Haemagglutination patterns of enterotoxigen and enteropathogenic Escherichia coli determined with human, bovine, and guinea pig erythrocytes in the presence and absence of mannose. Infect. Immun., 23:336-346, 1979.

32. EVANS, D. G., SILVER, R. D., EVANS Jr., D. J., CHASE, D. G. and GORBACH, S. L. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in Escherichia coli enterotoxigenic for humans. Infect. Immun., 12:656-667, 1975.
33. EVANS, D. G., EVANS Jr., D. J., TJOA, W. S., DuPONT, H. L. Detection and characterization of colonization factor of enterotoxigenic Escherichia coli isolated from adults with diarrhea. Infect. Immun., 19:727-36, 1978.
34. EVANS, D. G., EVANS Jr., D. J., CLEGG, S. and PAULEY, J. A. Purification and characterization of the CFA/1 antigen of enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun., 25:738-748, 1979.
35. EVANS Jr., D. J., EVANS, D. G., YOUNG, L. S. and PITT, J. Haemagglutination typing of Escherichia coli: Definition of seven haemagglutination types. J. Clin. Microbiol., 12:235-242, 1980.
36. FAIRBROTHER, J. M., LARIVIÈRE, S. and LALLIER, R. New fimbrial antigen F165 from Escherichia coli serogroup O115 strains isolated from piglets with diarrhea. Infect. Immun., 51:10-15, 1986.
37. FRANCIS, D. H., RYAN, C. J. and FRITZMEIR, J. D. Effect of sodium acetate on expression of pili K99 by Echerichia coli. Infect. Immun., 41:1368-1369, 1983.

38. FRANCIS, D. H., COLLINS, J. E. and DUIMSTRA, J. R.
Infection of gnotobiotic pigs with an Escherichia coli 0157:H7 strains associated with an outbreak of hemorrhagic colitis. *Infect. Immun.*, 51:953-956, 1986.
39. FREER, J. H., ELLIS, A., WADSTROM, T. and SMYTH, C. J.
Occurrence of fimbriae among enterotoxigenic intestinal bacteria isolated from cases of human infantile diarrhoea. *FEMS MICROBIOL. LETT.*, 3:277-281, 1978.
40. FUSCO, P., TO, A., TO, S., and BRINTON Jr., C. The purification and characterization of four types of Escherichia coli pili and the specificity of Escherichia coli for immunity, colonization and adhesion. In: MILLER, C. (ed), XIIIth U.S. - Japan Conference on Cholera, Atlanta, Ga., September, 1977, p. 60-70. National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1978.
41. GAASTRA, W. and de GRAAF, F. K. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic Escherichia coli strains. *Microbiol. Rev.*, 46:129-161, 1982.
42. GATTI, M. S. V. Fatores de virulência em amostras de colibacilos enteropatogênicos isolados no Brasil. Tese de Mestrado, EPM, S.P. 1983.
43. GONZÁLEZ, E. A. and BLANCO, J. Production of cytotoxin VT in enteropathogenic and non-enteropathogenic Escherichia coli strains of porcine origin. *FEMS-Microbiol. Letters*, 26:127-130, 1985.

44. GRABAR, P. and BURTIN, P. Imunoelektrophoretische analysis. Elsevier, Amsterdam, 1964.
45. GUINEE, P. A. M. and JANSEN, W. H. Behavior of Escherichia coli K antigens K88ab, K88ac, and K88ad in immunoelectrophoresis, double diffusion, and haemagglutination. Infect. Immun., 23:700-705, 1979.
46. GUINEE, P. A. M., JANSEN, W. H. and AGTERBERG, C. M. Detection of the K99 antigen by means of agglutination and immunoelectrophoresis in Escherichia coli isolates from calves and its correlation with enterotoxigenicity. Infect. Immun. 13:1369-1377, 1976.
47. GUINEE, P. A. M., VELTKAMP, J. and JANSEN, W. H. Improved Minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of Escherichia coli. Infect. Immun., 15:676-678, 1977.
48. GYLES, C. L. Heat-labile and heat-stable forms of the enterotoxin from Escherichia coli strains enteropathogenic for pigs. Ann. N.Y. Acad. Sci. 176:314-322, 1971.
49. HALL, G. A., REYNOLDS, D. J., CHANTER, N., MORGAN, J. H. PARSONS, K. R., DEBNEY, T. G., BLAND, A. B. and BRIDGER, J. C. Dysentery caused by Escherichia coli (S102-9) in calves: natural and experimental disease. Vet. Pathol. 22:156-163, 1985.
50. HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal. Biochem., 48:422-426, 1972.

51. HOLMES, R. K., TWIDDY, E. M. and PICKETT, C. L.
Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of Escherichia coli. Infect. Immun. 53:464-473, 1986.
52. HOLMGREN, J., FREDMAN, P., LINDBLAD, M., SVENNERHOLM, A. M., and SVENNERHOLM, L. Rabbit intestinal glyco-protein receptor for Escherichia coli heat-labile enterotoxin lacking affinity for cholera toxin. Infect. Immun. 38:424-433, 1982.
53. HONDA, T., ARITA, M. and MIWATANI, T. Characterization of new hydrophobic pili of human enterotoxigenic Escherichia coli: a possible new colonization factor. Infect. Immun. 43:959-965, 1984.
54. ISAACSON, R. E. K99 surface antigen of Escherichia coli purification and partial characterization. Infect. Immun., 15:272-279, 1977.
55. ISAACSON, R. E. Factors affecting expression of the Escherichia coli pilus K99. Infect. Immun., 28:190-194, 1980.
56. ISAACSON, R. E. and RICHTER, P. Escherichia coli 987P pilus: purification and partial characterization. J. Bacteriol., 146:784-789, 1981.
57. JONES, G. W. The attachment of bacteria to the surface of animal cells. In: REISSIG, J. L. (ed), Microbial Interactions, receptors and recognition, series B, vol. 3, p. 139-176, Chapman and Hall, London, 1977.

58. JONES, G. W. and RUTTER, J. M. Role of K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by Escherichia coli in piglets. *Infect. Immun.*, 6:918-927, 1972.
59. JONES, G. W. and RUTTER, J. M. The association of K88 antigen with haemagglutinating activity in porcine strains of Escherichia coli. *J. Gen. Microbiol.*, 84:135-144, 1974.
60. KARCH, H., HEESEMANN, J., LAUFS, R., O'BRIEN, A. D., TACKET, C. O. and LEVINE, M. M. A plasmid of enterohemorrhagic Escherichia coli 0157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. *Infect. Immun.* 55:455-461, 1987.
61. KARMALI, M. A., PETRIC, M., LIM, C., FLEMING, P. C., ARBUS, G. S. and LIOR, H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing Escherichia coli. *J. Infect. Dis.* 151:775-782, 1985.
62. KASHIWAZAKI, M., OGAWA, T., ISAYAMA, Y., AKAIKE, Y., TAMURA, K. and SAKAZAKI, R. Detection of Vero cytotoxic strains of Escherichia coli isolated from diseased animals. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)*, 20:116-117, 1980.

63. KASHIWAZAKI, M., OGAWA, T., NAKAMURA, K., ISAYAMA, Y., TAMURA, K. and SAKAZAKI, R. Vero cytotoxin produced by Escherichia coli strains of animal origin. Natl. Inst. Anim. Health A. (Jpn.). 21:68-72, 1980.
64. KAUFFMANN, F. and VAHLNE, G. Ueber die Bedeutung des serologischen Formenwechsels für die Bakteriophagen-wirkung in der Coli-Gruppe. Acta Patho. Microbiol. Scand. Sect. B2:119-137, 1945.
65. KLEMM, P. Fimbrial colonization factor CFA/I protein from human enteropathogenic Escherichia coli strains. FEBS Lett, 108:107-110, 1979.
66. KNUTTON, S., BALDINI, M.M., KAPER, J. B. and McNEISH, A. S. Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to HEp-2 cells. Infect. Immun., 55:78-85, 1987.
67. KNUTTON, S., LLOYD, D. R. and McNEISH, A. S. Adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. Infect. Immun., 55:69-77, 1987.
68. KNUTTON, S., LLOYD, D. R. and McNEISH, A. S. Identification of a new fimbrial structure in enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) serotype 0148:H28 which adheres to human intestinal mucosa: a potentially new human ETC colonization factor. Infect. Immun., 55:86-92, 1987.

69. KONOWALCHUK, J., SPEIRS, J. I. and STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of Escherichia coli. Infect. Immun., 18:775-779, 1977.
70. KORHONEN, T. K., NURMIAHO, E. L., RANTA, H. and SVANBORG-EDEN, C. New method for isolation of immunologically pure pili from Escherichia coli. Infect. Immun., 27:569-575, 1980.
71. LEITE, D. S. Isolamento, purificação e caracterização de um novo fator de colonização (F42) de Escherichia coli enterotoxigênica de origem suína. Tese de Mestrado, UNICAMP, 1986.
72. LEVINE, M. M. and EDELMAN, R. Enteropathogenic Escherichia coli of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. Epidemiologic Rev. 6:31-51, 1984.
73. LINDAHL, M., FARIS, A. WADSTROM, T. and HJERTEN, S. A new test based on salting out to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. Biochim. Biophys. Acta 677:471-476, 1981.
74. MARQUES, L. R. M., MOORE, M. A., WELLS, J. G., WACHSMUTH, I. K. and O'BRIEN, A. D. Production of Shiga-like toxin by Escherichia coli. J. Infect. Dis. 154:338-341, 1986.
75. McNEISH, A. S., TURNER, P., FLEMING, J. and EVANS, N. Mucosal adherence of human enteropathogenic Escherichia coli. Lancet ii:946-948, 1975.

76. MOHAMMAD, A., PEIRIS, J. S. M., WIJEWANTA, E. A.,
MAHALINGAM, S. and GUNASEKARA, G. Role of vero-
cytotoxigenic Escherichia coli in cattle and buffalo
calf diarrhoea. FEMS Microbiol. Lett. 26:281-283,
1985.
77. MOOI, F. R. and de GRAAF, F. K. Isolation and
characterization of K88 antigens. FEMS Microbiol.
Lett. 5:17-20, 1979.
78. MOON, H. W., WHIPP, S. C., ARGENZIO, R. A., LEVINE, M.
M. and GIANNELLA, R. A. Attaching and effacing
activities of rabbit and human enteropathogenic
Escherichia coli in pig and rabbit intestines. Infect.
Immun., 41:1340-1351, 1983.
79. MORRIS, J. A., STEVENS, A. E. and SOJKA, W. J.
Preliminary characterization of cell-free K99 antigen
isolated from Escherichia coli B41. J. Gen.
Microbiol., 99:353-357, 1977.
80. MORRIS, J. A., STEVENS, A. E. and SOJKA, W. J.
Isoelectric point of cell-free K99 antigen exhibiting
haemagglutinating properties. Infect. Immun.,
19:1097-1098, 1978.
81. MORRIS, J. A., THORNS, C., SCOTT, A. C., SOJKA, W. J.
and WELLS, G. A. Adhesion in vitro and in vivo
associated with an adhesive antigen (F41) produced by
a K99-mutant of the reference strains Escherichia coli
B41. Infect. Immun., 36:1146-1153, 1982.

82. MORRIS, J. A., THORNS, C. J. and SOJKA, W. J. Evidence for two adhesive antigens on the K99 reference strains Escherichia coli B41. J. Gen. Microbiol., 118:107-113, 1980.
83. MOXLEY, R. A. and FRANCIS, D. H. Natural and Experimental infection with an attaching and effacing strains of Escherichia coli in calves. Infect. Immun., 53:339-346, 1986.
84. NAGY, B., MOON, H. W. and ISSACSON, R. E. Colonization of porcine small intestine by Escherichia coli: ileal and adhesion by pig enteropathogens that lack K88 antigen and by some acapsular mutants. Infect. Immun., 13:1214-1220, 1976.
85. NAGY, B., MOON, H. W. and ISSACSON, R. E. Colonization of porcine intestine by enterotoxigenic Escherichia coli: selection of piliated forms in vivo, adhesion of piliated forms to epithelial cells in vitro, and insidence of a pilus antigen among porcine enteropathogenic Escherichia coli. Infect. Immun., 16:344-352, 1977.
86. NATARO, J. P., SCALETSKY, I. C. A., KAPER, J. B., LEVINE, M. M. and TRABULSI, L. R. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localizes adherence of enteropathogenic Escherichia coli. Infect. Immun., 48:378-383, 1985.

87. O'BRIEN, A. D. and LAVECK, G. D. Purification and characterization of a Shigella dysenteriae 1-like toxin produced by Escherichia coli. Infect. Immun., 40:675-683, 1983.
88. OFEK, I and BEACHEY, E. H. Mannose binding and epithelial cell adherence of Escherichia coli. Infect. Immun., 22:247-254, 1978.
89. OKERMANA, L. P., LINTERMANS, P., COUSSEMENT, W. and DEVRIESE, L. A. Escherichia coli ne produisant pas d'enterotoxine comme agent d'enterite chez le lapin avant le serrage. Recl. Med Vet.Ec.Alfort 158:467-472, 1982.
90. OLD, D. C. Inhibition of interaction between fimbrial haemagglutinin and erythrocytes by D-mannose and other carbohydrates. J. Gen. Microbiol., 71:149-57, 1972.
91. ØRSKOV, I., ØRSKOV, F., SOJKA, W. J. and LEACH, J. M. Simultaneous occurrence of Echerichia coli B and L antigens in strains from diseased swine. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica 53:404-422, 1961.
92. ØRSKOV, I, ØRSKOV, F., SOJKA, W. J., WITTIG, W. K. antigens K88ac(L) in Echerichia coli. A new O antigen: O147 and a new K antigen: K89(B). Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica 62:439-47, 1964.

93. ØRSKOV, I. and ØRSKOV, F. Epsisome-carried surface antigen K88 of Escherichia coli. J.Bact., 91:69-75, 1966.
94. ØRSKOV, I., ØRSKOV, F., SMITH, H. W. and SOJKA, W. J. The establishment of K99, a thermolabile, transmissible Escherichia coli K antigen, previously called "Kco", possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. Acta Pathol. Microbiol., Scand. Sect., 883:31-36, 1975.
95. ØRSKOV, I., ØRSKOV, F. Serology of Escherichia coli fimbriae. Prog Allergy 33:80-105, 1983.
96. OTTOW, J. C. G. Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili. Annu.Rev.Microbiol., 29:79-108, 1975.
97. OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Progs.Allerg., 5:78, 1958.
98. PAI, C. H., KELLY, J. K. and MEYERS, G. L. Experimental infection of infant rabbits with Verotoxin-producing Escherichia coli. Infect. Immun., 51:16-23, 1986.
99. PARRY, S. H. and PORTER, P. Immunological aspects of cell membrane adhesion demonstrated by porcine enteropathogenic Escherichia coli. Immunology, 34:41-49, 1978.

100. PEETERS, J. E., CHARLIER, G. J., and HALEN, P. H.
Pathogenicity of attaching effacing enteropathogenic Escherichia coli isolated from diarrheic suckling and weanling rabbits for new-born rabbits. Infect. Immun., 46:690-696, 1984.
101. PEETERS, J. E., CHARLIER, G. J., and RAEYMAKERS, R.
Scanning and transmission electron microscopy of attaching effacing Escherichia coli in weanling rabbits. Vet. Pathol., 22:54-59, 1985.
102. PEETERS, J. E., POHL, P., and CHARLIER, G. J. Infectious agents associated with diarrhea in commercial rabbits: a field study. Ann. Rech. Vet. 15:24-29, 1984.
103. PEETERS, J. E., POHL, P., OKERMAN, L, and DEVRIESE, L. A. Pathogenic properties of Escherichia coli strains isolated from diarrheic commercial rabbits. J. Clin. Microbiol., 20:34-39, 1984.
104. PESTANA de CASTRO, A. F., SERAFIM, M. B., GOMES, J. A., and GATTI, M. S. V. Improvements in the passive immune hemolysis test for assaying enterotoxigenic Escherichia coli. Clin. Microbiol., 12:714-717, 1980.
105. POLOTSKY, Y. E., DRAGUNSKAYA, E. M., SELIVERSTOVA, V. G., AVDEEVA, T. A., CHAKHUTINSKAYA, M. G., KET'YI, I., VERTINYI, A., RALOVICH, B., EMODY, L., MALOVIES, I., SAFONOVA, N. V., SNIGIREVSKAYA, E. S., and KARYAGINA, E. I. Pathogenic effect of enterotoxigenic Escherichia coli and Escherichia coli causing infantile diarrhea. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 24:221-236, 1977.

106. POTTER, M. E., KAUFMANN, A. F., THOMASON, B. M., BLAKE, P. A., and FARMER, J. J. III. Diarrhea due to Escherichia coli 0157:H7 in the infant rabbit. J. Infect. Dis. 152:1341-3434, 1985.
107. PRESCOTT, J. F. Escherichia coli and diarrhea in the rabbits. Vet. Pathol., 15:237-248, 1978.
108. ROTHBAUM, R., McADAMS, A. J., GIANELLA, R., and PARTIN, J. C. A clinicopathologic study of enterocyte-adherent Escherichia coli: a cause of protracted diarrhea in infantis. Gastroenterology 83:441-454, 1982.
109. REIS, M. H. L., AFFONSO, M. L. T., TRABULSI, L. R., MAZAITIS, A. J., MAAS, R. e MAAS, W. K. Transfer of a CFA/I-ST plasmid promoved by a conjungative plasmid in a strain of Escherichia coli of serotype 0128ca:H12. Infect. Immun., 29:140-143, 1980.
110. SACK, R. B. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic Escherichia coli. Ann. Rev. Microbiol., 29:333-353, 1975.
111. SALIT, I. E., and GOTSCHLICH, E. C. Haemagglutination by purified type 1 Escherichia coli pili. J. Exp. Med., 146:1169-1181, 1977.
112. SCALETISKY, I. C. A., SILVA, M. L. M., and TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic Escherichia coli to HeLa cells. Infect. Immun., 45:534-536, 1984.

113. SCOTLAND, S. M., DAY, N. P., and ROWE, B. Production of a cytotoxin affecting Vero cells by strains of Escherichia coli belonging to traditional enteropathogenic serogroups. FEMS. Microbiol., Lett. 7:15-17, 1980.
114. SHERWOOD, D., SNODGRASS, D. R., and O'BRIEN, A. D. Shiga-like toxin production from Escherichia coli associated with calf diarrhoea. Vet. Rec. 116:217-218, 1985.
115. SHIPLEY, P. L., GYLES, C. L., and FALCOW, S. Characterization of plasmids that encode for the K88 colonization antigen. Infect. Immun., 20:559-560, 1978.
116. SILVA, M. L. M., YAMAMOTO, M. A. e SEVERO, N. P. F. Resistência a drogas, lisogenia e produção de colicinas e hemolisinas em amostras de Escherichia coli enteropatogênicas. Rev. Microbiol. (S.Paulo), 14:254-258, 1983.
117. SILVEIRA, W. D. Estudo plasmidial em amostras enterotoxigênicas de Escherichia coli produtoras do novo fator de colonização F42. Tese de Doutorado, Fac. Med. R. Preto, USP, 1986.
118. SMITH, H. R., SCOTLAND, S. R., and ROWE, B. Plasmids that encode for production of colonization factor antigen II and enterotoxin production in strains of Escherichia coli. Infect. Immun., 40:1236-1239, 1983.

119. SMITH, H. R., WILLSHAW, G. A., and ROWE, B. Mapping of a plasmid, coding for colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin production, isolated from an enterotoxigenic strain of Escherichia coli. L. Bacteriol., 149:264-275, 1982.
120. SMITH, H. W., and LINGGOOD, M. A. Further observation on Escherichia coli enterotoxins with particular regard to those produced by atypical piglet strains and calf and lamb strains: the transmissible nature of these enterotoxins and of a K antigen possessed by calf and lamb strains. J. Med. Microbiol., 5:243-250, 1972.
121. SMITH, W. H., GREEN, P., and PARSELL, Z. Vero cell toxins in Escherichia coli and related bacteria: transfer by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens and pigs. J. Gen. Microbiol., 129:3121-3137, 1983.
122. SMYTH, C. J. Two mannose-resistant haemagglutinins on enterotoxigenic Escherichia coli of serotype 06:K15:H16 or H-isolated from travellers' and infantile diarrhoea. J. Gen. Microbiol., 128:2081-96, 1982.
123. SO, M., BOYER, H. W., BETLACH, M., and FALKOW, S. Molecular cloning of an Escherichia coli plasmid determinant that encodes for the production heat-stable enterotoxin. J. Bacteriol., 128:463-472, 1976.

124. SOJKA, W. J. *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. Review Series n 7. Commonwealth Agricultural Bureaux of Animal Health, Weybridge, England, 1965.
125. STAPLES, S. J., ASHER, S. E., and GIANNELLA, R. A. Purification and characterization of heat-stable enterotoxin produced by a strain of Escherichia coli pathogenic for man. *J. Biol Chem.*, 255:4716-4721, 1980.
126. STIRM, S., ØRSKOV, I., and ØRSKOV, F. K88 and episome-determined protein antigen of Escherichia coli. *Nature (London)*, 209:507-508, 1966.
127. STIRM, S., ØRSKOV, F. ØRSKOV, I., and BIRCH-ANDERSEN. Episome-carried surface antigen K88 of Escherichia coli. III-Morphology. *J. Bacteriol.*, 93:740-748, 1967.
128. STIRM, S., ØRSKOV, F., ØRSKOV, I., and MANSA, B. Episome-carried surface antigen K88 of Escherichia coli. II-Isolation and chemical analysis. *J. Bacteriol.*, 93:731-739, 1967.
129. STROCKBINE, N. A., MARQUES, L. R. M., NEWLAND, J. W., SMITH, H. W., HOLMES, R. K., and O'BRIEN, A. D. Two toxin-converting phages from Escherichia coli 0157:H7 strains 933 encode antigenically distinct toxins with similar biological activities. *Infect. Immun.*, 53:135-140, 1986.
130. TAKEDA, Y., TAKEDA, T., YANO, T., YAMAMOTO, K., and MIWATANI, T. Purification and partial characterization of heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic Escherichia coli. *Infect. Immun.*, 25:978-987, 1979.

131. THOMAS, L. V., CRAVIOTO, A., SCOTLAND, S. M., and ROWE, B. New Fimbrial antigenic type (E8775) that may represent a colonization factor in enterotoxigenic Escherichia coli in humans. *Infect. Immun.*, 35:1119-1124, 1982.
132. TRABULSI, L. R. *Microbiologia*. Livraria Atheneu-RJ, SP, 1986, p.355.
133. ULSHEN, M. N. and ROLLO, J. L. Pathogenesis of Escherichia coli gastroenteritis in man - another mechanism. *N. Engl. J. Med.*, 302:99-101, 1980.
134. van VERSEVELD, H. W., BAKKER, P., van der WOUDE, TERLETH, C., and de GRAAF. Production of fimbrial adhesins K99 and F41 by enterotoxigenic Escherichia coli as function of growth-rate domain. *Infect. Immun.*, 49:159-163, 1985.
135. WEIL, E., FELIX, A. Ueber die Doppelnatur der Rezeptoren beim Paratyphus. *Wien.Klin.Wochenschr.*, 36:986-988, 1918.
136. WEIL, E., FELIX, A. Untersuchungen über die gewöhnlichen Proteusstämme und Beziehungen zu den X-Stämme. *Wien.Klin.Wochenschr.*, 23:637-639, 1918.
137. WEVERS, P., PICKEN, R., SCHMIDT, G., JANN, B., GOLECKI, J. R. and KIST. Characterization of pili associated with Escherichia coli 018ac. *Infect. Immun.*, 29:685-691, 1980.

138. WILLIAMS, P. H., SEDGWICK, M. I., EVANS, N., TURNER, P. J., GEORGE, R. H., and McNEISH, A. S. Adherence of an enteropathogenic strain of Escherichia coli to human intestinal mucosa is mediated by a colicinogenic conjunctive plasmid. *Infect. Immun.*, 22:393-402, 1978.
139. WILLIAMS, G. A., SMITH, H. R., McCONNEL, M. M. and ROWE, B. Cloning and expression of plasmid regins encoding colonization factor antigen 1 and heat-stable enterotoxin in Escherichia coli. *FEMS Microbiology Letters* 16:101-106, 1983.
140. YANO, T., LEITE, D. S., CAMARGO, I. J. B., and PESTANA, de Castro, A. F. A probable new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic Escherichia coli isolated from pigs. *Microbiol. Immunol.* 30:495-508, 1986.
141. YANO, T., CUNHA, T., GARCIA, W. M. e CASTRO, A. F. P. Detecção de Vero citotoxina (VT) em amostras de Escherichia coli isoladas de bezerros com diarreia. *Rev. Microbiol. (S.P.)* 17(4):339-341, 1986.