

BC/15452
IB/80540



FABIANA FANTINATTI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À REDAÇÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA CANDIDATA FABIANA FANTINATTI E APROVADA
PELA COMISSÃO JULGADORA

[Signature] 03/01/92

ESTUDOS BIOLÓGICOS E GENÉTICOS DE AMOSTRAS
DE *Escherichia coli* DE ORIGEM AVIÁRIA.

2 m

Dissertação apresentada ao
Deptº de Genética e Evolução
do Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do
título de Mestre em Ciências
Biológicas.

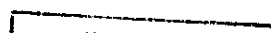
Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Campinas - SP

1991

T/UNICAMP

F219_e



IB
T/1104
F2192
EX
MBO BC 15452
DC 215/92
ECO 20.00.00
TA 22-1-92
CPD
A.000 19407-5

Aos meus pais, irmãs e sobrinhos

AGRADECIMENTOS

Ao Wanderley, pela orientação e incentivo na realização deste trabalho, além da amizade e carinho durante os anos que trabalhamos juntos.

A Cleide, ao Gilson e ao Marcelo, pelo carinho, amizade e diversão no laboratório.

Aos novos amigos - Eneida, Vanessa, Cris, Sérgio, Paulo I e Paulo II - que conquistei e que competiram comigo por um espaço de 1m² no nosso "imenso" laboratório.

A Silvana, Valéria e Mari, pela amizade e apoio nos momentos difíceis.

Ao Yano, pelo apoio, empréstimo do laboratório e equipamentos, além do bom humor dia após dia.

A Sílvia, pela inestimável ajuda na realização de alguns testes e também pelo incentivo nos momentos difíceis.

Ao Mingo, pelas sugestões e dicas nos momentos certos.

A Stella, pela amizade e carinho, além da inigualável ajuda com o material do laboratório.

Ao Sr. Manoel e Sr. Garcia pela ajuda com os animais.

A Beth e à Dirce pela orientação na cultura de células.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica, pelas facilidades na realização das micrografias eletrônicas e fotografias.

A Terezinha, pelo carinho e inestimável ajuda que prestou na execução das fotografias.

A Antônia e à Adriana, pela orientação e manipulação do Microscópio Eletrônico.

Ao Celso, pela disponibilidade e ajuda na extração de proteínas, além das dicas nos géis.

Ao Prof. Pestana, pelo incentivo e pela participação na pré-banca.

Ao Prof. Avelino, pelo empréstimo de seu laboratório, incentivo constante e pela participação na pré-banca.

Ao Prof. Sgarbieri, pelo empréstimo de seu laboratório e equipamentos.

Ao Prof. Vanderley Canhos pelo empréstimo da fantástica cuba de eletroforese.

Aos meus pais, Maria Zélia e Paulino, pelo apoio e compreensão desde o início.

A Salsbury e Rhodia, pelo fornecimento de material e animais.

A CAPES, pela concessão da Bolsa de Mestrado.

A FAPESP, pela concessão de auxílio financeiro que subsidiou este trabalho.

INDICE

1. Introdução	1
2. Material	13
2.1 Amostras Bacterianas	13
2.2 Linhagens Celulares	15
2.3 Animais de Laboratório	15
2.4 Meios de Cultura	16
2.4.1 Meio LB	16
2.4.2 Meio LA	16
2.4.3 Meio Citrato	17
2.4.4 Meio Mili	17
2.4.5 Meio EPM	18
2.4.6 Caldo Nutriente	19
2.4.7 Meio TSB	19
2.4.8 Meio TSA	20
2.4.9 Meio Agar Glicose	20
2.4.10 Meio CFA	21
2.4.11 Meio Minca	23
2.4.12 Meio Mínimo	24
2.4.13 Meio Mac Conkey	25
2.4.14 Meio Veal	25
2.4.15 Meio CAYE	26
2.4.16 Meio Agar Sangue	27
2.4.17 Meio de Eagle	28
2.4.18 Meio M 9	29

2.4.19	Meio Peptona - Glicose	29
2.5	Soluções de Estoque Antimicrobianos	30
2.6	Soluções de Uso Geral	31
2.6.1	Solução Salina 0,85 %	31
2.6.2	"Pool" de Soro de Galinha	32
2.6.3	Soro Fetal Bovino	32
2.7	Solução para Teste de ST I	32
2.7.1	Solução de Azul de Evans 2 %	32
2.8	Solução para Teste de Toxina LT	33
2.8.1	Solução Estoque de Tampão Trieta pH 7,4	33
2.8.2	Tampão Trieta pH 7,4	33
2.9	Solução para Teste de Hemaglutinação	33
2.9.1	Tampão PBS pH 7,2	33
2.9.2	Solução de Alsever	34
2.9.3	Solução de Citrato de Sódio 3,8 %	34
2.10	Soluções para Teste de Adesão e Invasão	34
2.10.1	Tampão PBS pH 7,4	34
2.10.2	Tampão Soresen 7,3	35
2.10.3	Solução Estoque de May Grunwald 2 %	35
2.10.4	Corante May Grunwald	36
2.10.5	Solução Estoque de Giemsa	36
2.10.6	Corante Giemsa	36
2.11	Soluções para Visualização de Fímbrias Através de Microscopia Eletrônica	37
2.11.1	Solução de Parlódio 0,5 %	37
2.11.2	Solução de PTA 1 %	37

2.11.3	Tampão PBS pH 7,2	38
2.12	Soluções para Extração de DNA Plasmidial	38
2.12.1	Solução I	38
2.12.2	Solução II	38
2.12.3	Solução de Acetato de Sódio 3M	39
2.12.4	Solução Estoque de RNase	39
2.12.5	Solução de Ressuspensão 6X	40
2.13	Soluções para Eletroforese de DNA Plasmidial em Gel de Agarose	40
2.13.1	Tampão TEB 5X pH 8,0	40
2.13.2	Tampão TBE 1X pH 8,0	41
2.14	Solução para Visualização de DNA em U.V.	41
2.14.1	Solução de Brometo de Etídio 1 %	41
2.15	Soluções para Extração de Proteínas Totais	41
2.15.1	Tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4	41
2.15.2	Tampão de Ressuspensão 2X	42
2.16	Soluções para Extração de Proteínas de Membrana	42
2.16.1	Tampão Tris-HCl 3,3 mM pH 7,4	42
2.16.2	Tampão Tris-HCl 0,1 M - EDTA 10 mM pH 7,2	43
2.16.3	Tampão Tris-HCl 0,1 M - MgCl ₂ 10 mM pH 7,2	43
2.16.4	Tampão Glicina 0,1 M - Sacarose 0,75 M pH 9,2	43
2.16.5	Tampão Tris-HCl 85 mM pH 6,8	44

2.16.6	Solução de Triton X 100 10 %	44
2.16.7	Tampão de Ressuspensão 2X	44
2.17	Soluções para SDS-PAGE	45
2.17.1	Solução de Monômero	45
2.17.2	Tampão para Gel de Separação 4X pH 8,8	45
2.17.3	Tampão para Gel de Empacotamento 4X pH 6,8	46
2.17.4	Persulfato de Amônio 10 %	46
2.17.5	Tampão de Corrida	47
2.18	Soluções para Coloração de Coomassie Blue	47
2.18.1	Solução Estoque de Coomassie Blue R - 250 1%	47
2.18.2	Solução Corante de Coomassie Blue	48
2.18.3	Solução de Descoloração I	48
2.19.3	Solução de Descoloração II	48
2.19	Soluções para Impregnação com Prata	49
2.19.1	Fixador	49
2.19.2	Solução de Etanol 50 %	50
2.19.3	Solução de Tiosulfato de Sódio 0,02 %	50
2.19.4	Solução de Nitrato de Prata 0,2 %	50
2.19.5	Solução Reveladora	50
2.19.6	Solução "Stop"	51
2.19.7	Solução de Metanol 50 %	51
2.20	Soluções para Secagem dos Géis	51

2.20.1	Solução de Preservação I	51
2.20.2	Solução de Preservação II	52
2.21	Marcadores de Peso Molecular para SDS-PAGE	52
3.	Métodos	54
3.1	Isolamento de Amostras Bacterianas	54
3.2	Teste de Patogenicidade	55
3.3	Determinação do Padrão de Hemaglutinação	55
3.3.1	Crescimento de Amostras Bacterianas	55
3.3.2	Lavagem dos Eritrócitos	56
3.3.3	Teste de Hemaglutinação em Lâmina	57
3.4	Teste de Produção de Toxina Termoe estável ST I ..	57
3.5	Teste de Produção de Verotoxina	58
3.6	Teste de Produção de Toxina Termolábil	59
3.7	Teste de Produção de Hemolisina	61
3.8	Teste de Sèreny	61
3.9	Teste de Produção de Aerobactina	62
3.10	Teste para Determinação de Resistência	
	Sérica	62
3.11	Teste de Adesão em Células HeLa	63
3.11.1	Crescimento de Amostras Bacterianas	63
3.11.2	Cultivo de Células HeLa	64
3.11.3	Teste de Adesão	64
3.12	Teste de Invasão em Células HeLa	66
3.12.1	Crescimento de Amostras Bacterianas	66
3.12.2	Cultivo de Células HeLa	66
3.12.3	Teste de Invasão	66

3.13 Determinação do Nível de Resistência a Drogas Antimicrobianas	67
3.14 Teste para Produção de Colicinas	68
3.15 Visualização de Fímbrias Através de Microscopia Eletrônica	69
3.15.1 Preparo das Telas de Microscopia Eletrônica	68
3.15.2 Preparo das Amostras Bacterianas, Coloração Negativa com PTA e Visualização de Fímbrias	70
3.16 Extração de DNA Plasmidial	71
3.17 Eletroforese de DNA Plasmidial em Gel de Agarose	72
3.18 Transferência de DNA Plasmidial por Conjugação	73
3.19 Mutação com Transposon Tnpho A	74
3.20 Cura de Plasmídios Através de Tratamento com SDS	75
3.21 Extração de Proteínas Totais	75
3.22 Extração de Proteínas de Membrana	76
3.23 Eletroforese de Proteínas em Gel de Poliacrilamida- SDS	79
3.24 Coloração de Géis de Proteínas Totais com Coomassie Blue	80
3.25 Impregnação de Géis de Proteínas de Membrana com Prata	81
3.26 Secagem dos Géis de Poliacrilamida - SDS	82

4. Resultados	83
4.1 Teste de Patogenicidade	83
4.2 Caracterização Biológica das Amostras de <i>Escherichia coli</i> de origem Aviária	85
4.2.1 Produção de Toxinas ST 1, VT e LT, Hemolisina, Aerobactina e Capacidade de Invasão	85
4.2.2 Padrão de Hemaglutinação	87
4.2.3 Resistência Sérica	89
4.2.4 Adesão em Células HeLa	94
4.2.5 Invasão em Células HeLa	96
4.2.6 Resistência a Drogas Antimicrobianas	98
4.2.7 Produção de Colicinas	100
4.2.8 Visualização de Fímbrias Através de Microscopia Eletrônica	102
4.3 Caracterização Eletroforética das Amostras de <i>Escherichia coli</i> de Origem Aviária	104
4.3.1 Perfil Eletroforético do DNA Plasmidial	104
4.3.2 Perfil Eletroforético das Proteínas Totais	108
4.3.3 Perfil Eletroforético das Proteínas de Membrana	111
4.4 Transferência de Plasmídios Através de Conjugação	114
4.5 Mutação com TnpH A	118

4.7	Análise das Características Biológicas dos	
	Tranconjugantes	122
5.	Discussão	131
6.	Conclusões	141
7.	Resumo	143
8.	Abstract	146
9.	Referências Bibliográficas	149

INDICE DE TABELAS

TABELA 1. Amostras de <i>Escherichia coli</i> utilizadas como controles nos testes biológicos e experimentos genéticos	14
TABELA 2. Concentração e diluentes dos estoques antimicrobianos utilizados	31
TABELA 3. Padrões de peso molecular de proteínas	53
TABELA 4. Soluções para gel de Poliacrilamida-SDS	79
TABELA 5. Soluções para impregnação com prata	81
TABELA 6. Teste de patogenicidade de amostras de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária	84
TABELA 7. Caracterização biológica de amostras de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária	86
TABELA 8. Padrão de hemaglutinação de amostras de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária	88
TABELA 9. Nível de resistência à drogas antimicrobianas das amostras de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária	99
TABELA 10. Produção de colicinas das amostras bacterianas de origem aviária frente às amostras indicadoras de colicinas	101
TABELA 11. Pesos moleculares de plasmídios das amostras de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária	105

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Curvas de resistência sérica das amostras de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária altamente resistentes ao soro de galinha	90
FIGURA 2. Curvas de resistência sérica das amostras de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária sensíveis ao soro de galinha	91
FIGURA 3a. Curvas de resistência sérica das amostras de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária com resistência intermediária ao soro de galinha	92
FIGURA 3a. Curvas de resistência sérica das amostras de <i>Escherichia coli</i> de Origem aviária com resistência intermediária ao soro de galinha	93
FIGURA 4. Adesão em células HeLa	95
FIGURA 5 Invasão de <i>Escherichia coli</i> (amostra 10) em células HeLa	97
FIGURA 6. Microscopia eletrônica de <i>Escherichia coli</i> amostra 5 crescida a 37° C, em coloração negativa com PTA	103
FIGURA 7. Perfil eletroforético de DNA plasmidial das amostras de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária em gel de agarose 0,6 %	106
FIGURA 8. Perfil eletroforético de DNA plasmidial das amostras de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária em gel de agarose 0,6 %	107

FIGURA 9. Perfil eletroforético de proteínas totais das amostras de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária em gel de Poliacrilamida-SDS 10 %	109
FIGURA 10. Perfil eletroforético de proteínas totais das amostras de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária em gel de Poliacrilamida-SDS 10 %	110
FIGURA 11. Perfil eletroforético de proteínas de membranas das amostras de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária em gel de Poliacrilamida-SDS 10 %	112
FIGURA 12. Perfil eletroforético de proteínas de membranas das amostras de <i>Escherichia coli</i> de origem aviária em gel de Poliacrilamida-SDS 10 %	113
FIGURA 13. Perfil eletroforético de DNA plasmidial dos transconjugantes resistentes a ampicilina em gel de agarose 0,6 %	115
FIGURA 14. Perfil plasmidial dos transconjugantes em gel de agarose 0,6 %	116
FIGURA 15. Perfil plasmidial dos transconjugantes resultantes da conjugação 17//MS101 em gel de agarose 0,6 %	117
FIGURA 16. Perfil eletroforético de DNA plasmidial em gel de agarose 0,4 %	119
FIGURA 17. Perfil eletroforético de DNA plasmidial em gel de agarose 0,6 %	121
FIGURA 18. Curvas de resistência sérica dos transconjugantes resultantes da conjugação 17//MS101	126

FIGURA 19. Curvas de resistência sérica dos mutantes de <i>Escherichia coli</i> da amostra 13	127
FIGURA 20. Perfil eletroforético de proteínas de membrana dos mutantes da amostra 13 em gel de Poliacrilamida-SDS 10 %	128
FIGURA 21. Perfil eletroforético de proteínas de membrana dos mutantes da amostra 13 tratadas com dipiridil em gel de Poliacrilamida-SDS 10 %	129
FIGURA 22. Perfil eletroforético de proteínas de membrana dos mutantes da amostra 17 tratadas com dipiridil em gel de Poliacrilamida-SDS 10 %	130

1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli é a espécie bacteriana predominante entre os anaeróbios facultativos da flora normal de mamíferos e aves, desempenhando um importante papel na manutenção e fisiologia intestinal (Drasar e Hill, 1974). Porém, dentro desta espécie existem linhagens patogênicas que, devido à aquisição de fatores de virulência, causam diferentes doenças: síndromes diarréicas e infecções extraintestinais (humanos, bovinos e suínos, etc), bem como doenças respiratórias em aves (galinhas, perús e patos).

As infecções por *E. coli* são resultantes de uma interação de fatores que dependem da amostra bacteriana e do organismo hospedeiro. Como exemplos, a existência de determinantes de superfície bacteriana capazes de reconhecer receptores específicos do epitélio do hospedeiro, permitindo a adesão, multiplicação da bactéria e colonização deste epitélio; a presença ou não de receptores para os determinantes bacterianos nas células do tecido-alvo; a capacidade do sistema imune do hospedeiro em evitar o estabelecimento de infecções.

Na avicultura, as infecções por *E. coli* acarretam grandes prejuízos econômicos para os produtores em todo o mundo (Gross, 1972). Tais infecções, geralmente, estão associadas com colisepticemia, onfalites e peritonites em

aves jovens; salpingites e infecções do saco aéreo (ou aerosaculites) em aves adultas (Srinivasan et al., 1979).

A diversidade de doenças infecciosas descritas na literatura médica e veterinária relacionando *E. coli* como o agente causal vem sofrendo atualizações cada vez mais frequentes com a descoberta de novos mecanismos de patogenicidade e também, com a elucidação dos processos infecciosos de doenças já descritas (Levine, 1987).

No trato respiratório de aves encontram-se vírus e micoplasma que causam infecções respiratórias danificando e destruindo os cílios da traquéia permitindo a colonização de *E. coli* patogênicas que levam a colisepticemia (Harry e Hemsley, 1965). Somente em frangos de corte na região de Delmarva (Delaware, Maryland e Virginia) nos Estados Unidos da América, as perdas anuais por problemas respiratórios foram estimados em 7,2 milhões de dólares. Na indústria norte americana de criação de perus, as infecções respiratórias foram responsáveis por 48% das perdas totais, sendo as infecções por *E. coli* responsáveis por 19% das perdas (Boletim do Departamento Técnico, CBM Laboratórios, Ltda.). No Brasil, o maior número de condenações por carcaças, nos abatedouros com inspeção federal são por aerosaculite causada por *E. coli* ocasionando perda total ou parcial das aves (Vidotto, 1988).

A maioria dos estudos epidemiológicos de *E. coli* patogênicas para aves indicam que 60% das amostras

analisadas pertencem aos sorotipos 01, 02 e 078 (Sojka e Carnaghan, 1961; Glantz et al., 1971). Entretanto, outros sorotipos também demonstraram ser patogênicos em diversas épocas e locais (Srinivasan et al., 1979; Vidotto, 1988; Kim e Tak, 1983; Barbour et al., 1985; Secher et al., 1981).

Os sorotipos 01, 02 e 078, como em *E. coli* do trato urinário e entérico, possuem pili ou fímbria que serve como adesinas que podem estar relacionadas com patogenicidade (Naveh, 1984). Da mesma maneira que em amostras patogênicas de *E. coli* de mamíferos a presença de fatores de colonização ou fímbrias está relacionada com patogenicidade, em amostras provenientes de aves as fímbrias desempenham um papel significativo neste processo (Nargaraja et al., 1983; Suwanichikul e Panigrahy, 1986; Suwanichikul e Panigrahy, 1988). Esta relação foi verificada por Dho e Lafont (1984), quando demonstraram que adesão em *E. coli* pode ser mediada por fímbrias.

Estudos das características químicas e biológicas das fímbrias de *E. coli* dos sorogrupos 01, 02 e 078 demonstram que as amostras provenientes destes sorogrupos possuem fímbrias tipo I (caracteristicamente identificada pela hemaglutinação-manose-sensível com eritrócitos de cobaio). Entretanto, Suwanichikul e Panigrahy (1986), demonstraram que em tais sorogrupos *E. coli* de origem aviária possuem três diferentes tipos de fímbrias. A fímbria do sorogrupo 078 é do tipo I, mas as fímbrias dos sorogrupos

O1 e O2 são de peso molecular diferente da fímbria tipo I (Suwanichikul e Panigrahy, 1986).

Da mesma maneira que as fímbrias ou adesinas, as endotoxinas estão associadas ao processo de patogenicidade e tem sido muito estudadas em suínos, bovinos e humanos. No caso de aves a presença de toxinas parece não ser o responsável pela mortalidade em infecções sistêmicas por *E. coli* (Truscott, 1973). Entretanto, Tsuji et al. (1988), estudando *E. coli* isoladas de galinhas com diarreia, verificaram a produção de enterotoxina termo-lábil (LT) que comparada com a toxina LT de origem humana mostrou-se imunológica e fisicoquimicamente semelhantes.

Vários determinantes de virulência, como produção de toxinas e expressão de fímbrias relacionadas com aderência ao epitélio do hospedeiro estão associados a plasmídios em amostras de *E. coli* que causam diarreia em humanos e animais (Orskov e Orskov, 1966; Shipley et al., 1978; Smith e Linggood, 1972; Evans et al., 1975; Reis et al., 1980; Gyles e Falkow, 1974; Smith e Halls, 1978).

Smith (1974), estudando fatores de virulência associados a plasmídios numa amostra isolada de frangos com bacteremia, verificou o plasmídio quando transferido por conjugação, tornava a amostra receptora não patogênica em patogênica quando testada em frangos e camundongos. Esta característica é devido à grande habilidade da amostra receptora em sobreviver no sangue e fluidos peritoniais dos

animais infectados, podendo estar ligada ao plasmídeo responsável pela expressão da colicina V.

Dentre as defesas do organismo frente às infecções bacterianas, está a baixa quantidade de ferro disponível no plasma sanguíneo, que não pode ser utilizado pela bactéria em seus processos metabólicos. Desta maneira, o ferro está fortemente associado com proteínas transportadoras de íons ferro; as transferrinas no soro e as lactoferrinas nas secreções corpóreas. Uma vez que os microrganismos utilizam ferro como elemento essencial para sua multiplicação no organismo do hospedeiro, torna-se necessário a utilização de um sistema de obtenção de ferro a partir dessas proteínas. Assim, as amostras de *E. coli* invasivas são capazes de competir com as transferrinas do hospedeiro e sequestrar ferro suficiente para seu crescimento, proporcionando a capacidade de provocar a doença (Bullen et al., 1978; Weinberg, 1984).

O mecanismo pelo qual os microrganismos obtêm ferro é a produção de sideróforos, as quais são proteínas de baixo peso molecular secretadas pelos microrganismos em resposta à deficiência de ferro (Willians e Roberts, 1989). Estas proteínas solubilizam o ferro livre ou captam-no de complexos tais como transferrinas ou lactoferrinas, promovendo a internalização do ferro, através da interação com receptores específicos do complexo sideróforo-ferro na superfície da célula bacteriana (Willians e Roberts, 1989).

Os sideróforos em geral são classificados quimicamente em dois tipos: os fenolatos (enteroquelina) e os hidroxamatos (aerobactinas). Sob condições de falta de ferro as amostras de *E. coli*, patogênicas ou não, secretam o sideróforo enteroquelina e sintetizam uma proteína de membrana receptora para enteroquelina-ferro, resultante da expressão do gene *fep A* (Williams e Roberts, 1989).

Amostras mutantes de *E. coli* deficientes na síntese de enteroquelina podem crescer somente em altas concentrações de ferro livre, os quais podem ser transportados através da membrana pela entrada passiva de ferro ou pela adição de compostos que solubilizam o ferro, tal como o citrato ou ferricromo. Entretanto, mutantes deficientes para enteroquelina que carregam o plasmídeo col V suprimem o requerimento de citrato ou ferricromo, indicando a atividade de um mecanismo de captação de ferro alternativo e eficiente. Tal mecanismo, é o sistema de captação de ferro mediado pela aerobactina (Frost e Rosenberg, 1973).

Aerobactina é um sideróforo hidroxamato descrito pela primeira vez em *Aerobacter aerogenes* (Gibson e Magrath, 1969) e depois encontrado em amostras de *Shigella* spp (Payne, 1980) e *Salmonella* spp (Bindereif, 1981). Este sideróforo é codificado pelo plasmídeo col V e está relacionado com a patogenicidade nas infecções por *E. coli*

em humanos e animais (Willians, 1979; Braun, 1981; Stuart et al., 1980).

A eliminação do plasmídeo col V das amostras patogênicas, reduzem a virulência em animais experimentais, sendo a virulência recuperada quando o plasmídeo col V é introduzido em amostras que não possuem plasmídios. No entanto, não há correlação entre a produção de colicina V e virulência, como foi verificado por Quackenbusch e Falkow (1979), uma vez que inativando-se a produção de colicina V através de mutagênese com transposon a virulência não é alterada.

Milch et al. (1984), também verificaram que a produção de colicina não é essencial para o aumento da virulência, no entanto, demonstraram que a perda do plasmídeo col V resulta na diminuição da mesma.

Willians e Warner (1980), confirmaram o fato de que a captação de ferro mediada pela aerobactina é independente da síntese e atividade da colicina V através da obtenção de mutantes que deixaram de produzir colicina V e permaneceram com o sistema de captação de ferro mediado pelo plasmídeo col V. Estes mutantes não perderam a patogenicidade em infecções experimentais em camundongos. Por outro lado, mutantes defectivos no sequestro de ferro, devido a mutações no plasmídeo col V, não deixaram de produzir a colicina e tornaram-se menos virulentas do que a amostra parental.

Experimentos utilizando estes mutantes permitiram a identificação de dois componentes mediados por plasmídios. Um deles o sideróforo aerobactina, codificado pelo gen *iuc*, é um composto difusível transportado através da membrana nas amostras portadoras do plasmídio col V (Stuart et al., 1980) e o outro, refere-se a um componente não difusível, que é um receptor de membrana para o complexo aerobactina-ferro e para a bacteriocina identificada como cloacina DF 13 sintetizada por amostras de *Enterobacter cloacae* (Grewal et al., 1982; van Tiel-Menkveld et al., 1981). Este receptor é uma proteína de membrana externa cujo peso molecular é de 74 Kda, codificada pelo gen *iut* presente no plasmídio col V sendo sua síntese regulada pela disponibilidade de ferro (Bindereif et al., 1982; Grewal et al., 1982).

Griffiths et al. (1983), verificaram que amostras patogênicas de *E. coli* produzem proteínas de membrana externa que são induzidas pela limitação de ferro "in vitro", pela utilização de transferrina e "in vivo" durante a infecção.

Clancy e Savage (1981) descreveram, também, uma outra propriedade do plasmídio col V relacionado ao aumento da virulência. Refere-se ao fato de que, as amostras que carregam o plasmídio col V aderem "in vitro" ao epitélio intestinal de camundongos duas a três vezes mais que as amostras que não possuem o plasmídio col V, sendo que a introdução do plasmídio col V nestas amostras, aumenta a

capacidade de adesão nas células epiteliais "in vitro". Também foi verificado através de microscopia eletrônica, em amostras que carregam o plasmídeo col V, a presença de pili e as amostras que perderam este plasmídeo não possuem tal estrutura (Clancy e Savage, 1981).

Associada à capacidade do hospedeiro em limitar a quantidade de ferro disponível no plasma sanguíneo está a atividade bactericida do soro, que contém agentes inespecíficos, tais como, complemento e fagócitos; e agentes específicos como anticorpos, que sozinhos ou em conjunto, lisam ou impedem o crescimento da maioria das bactérias que chegam à circulação sanguínea (Bitter-Suermann et al., 1984). As amostras de *E. coli* invasivas são altamente resistentes às atividades letais do soro devido à presença de componentes de superfície, tais como, proteínas de membrana externa e antígeno capsular, que parecem inibir a ativação ou a função do complemento (Taylor, 1976). Tais alterações na superfície podem resultar na síntese de novos componentes estruturais da membrana celular que: (a) Protegem os antígenos de superfície e previnem sua interação com anticorpos específicos, impedindo a ativação do complemento via clássica; (b) Protegem os lipopolissacarídeos e os previnem da ativação direta do complemento via alternativa ou; (c) Interfere com um ou mais passos da ação do complemento na superfície da bactéria. A resistência sérica pode também resultar na síntese de

produtos que diretamente inativam os componentes do complemento (Moll et al., 1980).

Moll et al. (1980), verificaram que o plasmídio conjugativo R6-5 pode conferir resistência sérica para *E. coli*. Através de técnicas de clonagem molecular, foi possível a obtenção de plasmídios recombinantes com fragmentos que codificam a resistência sérica e, a utilização do transposon Tn 3 permitiu a obtenção de plasmídios derivativos sensíveis ao soro. A análise das proteínas de membrana destes dois grupos de mutantes (os plasmídios recombinantes e os derivativos) mostrou que o produto do gene *tra T* é o responsável pela resistência sérica.

A proteína codificada pelo gene *tra T* do plasmídio R6-5 tem peso molecular de aproximadamente 25 Kd e localiza-se na superfície da membrana externa, de maneira semelhante às proteínas de membrana dos plasmídios F e R100 (Manning et al., 1980; Ferraza & Levy, 1980). Os genes *tra T* e *tra S* do operon *tra* são responsáveis pelo fenômeno de exclusão de superfície devido à inibição da formação de agregados estáveis de células na conjugação e a inibição da transferência do DNA entre as células do agregado estável (Achtman et al., 1977; Kennedy et al., 1977).

Os plasmídios R aumentam a resistência sérica em *E. coli*, sendo discutível se estes aumentam a virulência das amostras de *E. coli*. Entretanto, Binns et al. (1979),

verificaram que o determinante de resistência sérica aumenta a virulência de *E. coli*, causando uma redução de aproximadamente 100 vezes a DL50 para pintos.

Binns et al. (1982), verificaram que a resistência sérica em *E. coli* conferida pelos genes *tra* T do plasmídeo R100 e *iss* do plasmídeo col V,I-K94, são semelhantes e bloqueiam a ação do complexo terminal do complemento e não a formação deste. Por outro lado, estes genes são distintos uma vez que a sonda molecular do gene de resistência sérica do plasmídeo R100 não hibridiza com o gene *iss* do plasmídeo col V,I-K94 (Ogata et al., 1982).

Nillius & Savage (1984), estudaram a relação entre as funções de transferência de vários plasmídios col V e a resistência sérica. Dos 8 plasmídios col V transferidos por conjugação para *E. coli* K12, apenas 3 conferiram resistência sérica para a célula hospedeira. Estes dados confirmam o que foi verificado por Hugles (1982), isto é, a resistência não é um fenótipo universal e codificado por todos os plasmídios col V. Entretanto, os resultados indicaram que a resistência sérica está relacionada com o sistema de transferência plasmidial. Duas amostras de *E. coli* K12 que adquiriram plasmídios col V diferentes, e que tiveram o operon de transferência reprimido, não expressaram a resistência sérica. Quando o sistema de transferência foi desreprimido por mutação, as bactérias portadoras destes plasmídios expressaram pili sexuais e resistência sérica. Assim,

Nililius & Savage (1984), sugeriram que a resistência sérica codificada pelos plasmídios col V não está relacionado a um único gene do sistema de transferência, como ocorre nos plasmídios R6-5 e R100 anteriormente descritos e que, existe uma relação complexa entre resistência sérica e as funções da conjugação.

Dentre os inúmeros trabalhos realizados com as amostras de *E. coli* invasivas de origem aviária, até agora não foi possível compreender os vários fatores envolvidos no processo de patogenicidade. Assim, no presente trabalho foram investigadas algumas características envolvidas com *E. coli* invasivas, tais como: presença de fímbria de aderência, toxinas e colicinas, produção de hemolisina, resistência à antimicrobianos, caracterização de plasmídios e de proteínas de membrana externa, visando uma correlação de tais aspectos com a patogenicidade. Este estudo tem por finalidade a melhor compreensão dos mecanismos de patogenicidade em amostras de *E. coli* de origem aviária, que são essenciais e necessários para o desenvolvimento de vacinas, as quais poderão atenuar ou controlar as infecções que provocam grandes prejuízos no plantel aviário do país.

2. MATERIAL

2.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

As amostras bacterianas de *Escherichia coli* de origem aviária (de 1 à 17) estudadas no presente trabalho foram cedidas pelo Departamento de Microbiologia e Imunologia (DMI) do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Nos testes biológicos e nos experimentos genéticos foram utilizadas como controles as amostras relacionadas na tabela 1.

Todas as amostras bacterianas foram conservadas em meio em LB contendo 15% de glicerol e -20° C e em meio LA semisólido à temperatura ambiente.

TABELA 1. Amostras de *Escherichia coli* utilizadas como controles nos testes biológicos e genéticos.

Amostras Bacterianas	Fenótipo	Origem
<i>E. coli</i> MS101	tipo 1+, Nalr, lac- hospedeira de plasmídio	Silveira, 1986.
<i>E. coli</i> B41	K99+, F41+, ST 1, O101:K-	Girardeau et al, 1988.
<i>E. coli</i> 195/1/7	K88+	
<i>E. coli</i> H-30	Padrão de VT	DMI*
<i>E. coli</i> AD	Padrão de Adesão Difusa	DMI*
<i>E. coli</i> AL	Padrão de Adesão Localizada	DMI*
<i>E. coli</i> 40 T	Padrão de LT	DMI*
<i>E. coli</i> V517	8 plasmídios de referência PM (1,36 a 35,8 Md)	Macrina et al., 1978.
<i>E. coli</i> 711 F-	lac+, hospedeira do plasmídio p307 cujo PM é 54 Md.	Souza, UFMG†.
<i>E. coli</i> SM10	Ap, KM, hospedeira do plasmídio pRT 733	Taylor et al., 1989.
<i>E. coli</i> 22R80	K-12 RCW*	Souza, UFMG.
<i>E. coli</i> 22R81	K-12 Col I*	Souza, UFMG.
<i>E. coli</i> 22R82	K-12 Col Ia*	Souza, UFMG.
<i>E. coli</i> 22R83	K-12 Col Ib*	Souza, UFMG.
<i>E. coli</i> 22R675	K-12 Col E1*	Souza, UFMG.
<i>E. coli</i> 22R676	K-12 Col E2*	Souza, UFMG.
<i>E. coli</i> 22R914	K-12 ROW-K*	Souza, UFMG.
<i>E. coli</i> 22R915	K-12 Col V*	Souza, UFMG.
<i>E. coli</i> 22R996	K-12 ROW-B*	Souza, UFMG.
<i>Shigella sonnei</i>	Padrão de Invasão	DMI*

* = sensível à todas as colicinas

s = sensível à colicina correspondente

DMI* = Depto de Microbiologia e Imunologia

UFMG† = Universidade Federal de Minas Gerais

2.2 LINHAGENS CELULARES

As linhagens celulares de HeLa e Vero, para cultura "in vitro", foram adquiridas no Banco de Células do Instituto Adolfo Lutz e Salsbury Laboratórios Ltda, respectivamente, e mantidas no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia, UNICAMP.

2.3 ANIMAIS DE LABORATORIO

Os pintos de um dia de idade utilizados para determinação da DL50 das linhagens bacterianas e testes de patogenicidade foram fornecidos pela Salsbury Laboratórios Ltda. e pela Rhodia S/A . Durante os experimentos os animais foram alojados em gaiolas, mantidos sob aquecimento constante e alimentados com ração para crescimento.

Os cobaios utilizados para realização do teste de Sèreny foram cedidos pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Unicamp. Os camundongos recém-nascidos utilizados para verificação da produção da toxina termoestável ST I foram fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP.

2.4 MEIOS DE CULTURA

Todos os meios utilizados para manutenção, cultivo e ensaio das amostras bacterianas foram preparados com reagentes de grau P.A. e água destilada e esterilizados por autoclavagem a 121° C por 20 min..

2.4.1 MEIO LB (Luria - Bertani Medium)

O meio LB foi utilizado para o crescimento de amostras bacterianas em pré-inóculos, em extração de DNA plasmidial e extração de proteínas de membrana. Este meio foi preparado segundo a formulação de Miller (1972).

Triptona	10,0 g
Extrato de Levedura	5,0 g
NaCl	5,0 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0 ml
pH final	7,2

2.4.2 MEIO LA (Luria - Bertani Agar)

O meio LA foi utilizado para o crescimento de amostras bacterianas nos experimentos de conjugação, resistência a diferentes drogas antimicrobianas, produção de colicinas e resistência sérica.

Agar bacteriológico	15,0 g
Meio LB pH 7,2	1000,0 ml

2.4.3 MEIO CITRATO

O meio Citrato (Difco) foi utilizado na caracterização bioquímica das amostras bacterianas. Este meio foi preparado segundo as especificações do fabricante.

2.4.4 MEIO MILI

O meio Mili foi utilizado na caracterização bioquímica das amostras bacterianas.

Extrato de Levedura	3,0 g
Triptona	10,0 g
Peptona	10,0 g
L- lisina	10,0 g
Dextrose	1,0 g
Agar bacteriológico	2,0 g
Bromocresol púrpura	20,0 mg
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0 ml
pH final 6,5	

2.4.5 MEIO EPM (Rugai Modificado)

O meio EPM foi utilizado na caracterização bioquímica das amostras bacterianas.

a) Base A

Extrato de Carne	2,0 g
Triptona	10,0 g
NaCl	5,0 g
NaHPO ₄ · 5H ₂ O	2,0 g
L- Triptofano	1,0 g
Solução de azul de bromotimol (1,5%)	2,0 ml
Agar bacteriológico	11,0 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0 ml
pH final 7,4	

b) Base B

Citrato de Ferro	2,0 g
Tiossulfato de Sódio	2,0 g
Glicose	10,0 g
Uréia	40,0 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0 ml

Esta solução foi aquecida em banho maria a 65° C com agitação e esterilizada à mesma temperatura por 1 hora.

14 ml da Base B foram adicionados em 800 ml da Base A e então distribuídos em tubos esterilizados que foram inclinados deixando uma base de 3,5 cm.

2.4.6 CALDO NUTRIENTE

O meio de caldo nutriente foi utilizado para o crescimento das amostras bacterianas a serem usadas nos testes de patogenicidade em pintos de um dia de idade.

Extrato de Carne	10,0 g
Peptona	10,0 g
Glicose	1,0 g
NaCl	5,0 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0 ml
pH final 7,5	

2.4.7 MEIO TSB (Trypticase Soy Broth)

O meio TSB (Difco) foi utilizado no crescimento das amostras bacterianas para os testes de adesão em células HeLa, segundo determinado por Scaletsky et al. (1984). Este meio foi reconstituído dissolvendo-se 50,0 g do meio preparado em 1000 ml de H₂O destilada.

2.4.8 MEIO TSA (Trypticase Soy Agar)

O meio TSA foi utilizado no crescimento das amostras bacterianas para os testes de invasão em células HeLa, segundo determinado por Scaletsky et al. (1984).

Agar bacteriológico	15,0 g
TSB q.s.p.	1000,0 ml

2.4.9 MEIO AGAR GLICOSE

O meio de agar glicose foi utilizado no crescimento das amostras bacterianas para o teste de hemaglutinação e foi preparado segundo a formulação de Jones & Rutter (1972).

a) Caldo Simples

Extrato de Carne	1,0 g
Peptona	10,0 g
NaCl	5,0 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0 ml

b) Solução estoque de glicose 20 %

Glicose	20,0 g
H ₂ O destilada q.s.p.	100,0 ml

A solução de glicose foi esterilizada por filtração em membrana Millipore 0,22 um (Swinex 0,47 mm) e mantida a 4° C.

c) Meio Base

KH ₂ PO ₄	0,45 g
Na ₂ HPO ₄	0,81 g
Agar bacteriológico	12,00 g
Caldo simples	1000,00 ml

A glicose foi adicionada para uma concentração final de 0,1 % ao meio base depois de frio.

2.4.10 MEIO CFA (Colonization Factor Agar)

O meio CFA foi utilizado para o crescimento de amostras bacterianas que foram ensaiadas para a capacidade de hemaglutinação com hemácias de diferentes origens, para a extração de proteínas totais e de membrana e para visualização de fímbrias através de microscopia eletrônica.

O meio foi preparado segundo a formulação de Evans et al. (1980).

a) Solução A

MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5 g
H ₂ O destilada q.s.p.	50,0 ml

b) Solução B

MnCl ₂ . 7H ₂ O	0,39 g
H ₂ O destilada q.s.p.	50,00 ml

As soluções A e B foram esterilizadas por filtração em membrana Millipore 0,22 um (Swinex 0,47 mm) e mantida a 4° C.

c) Meio Base

Extrato de Levedura	1,5 g
Casaminoácidos	10,0 g
Agar bacteriológico	20,0 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0 ml
pH final 7,4	

1 ml das soluções de sais foi adicionado a cada 100 ml de meio base esterilizado.

2.4.11 MEIO MINCA

O meio MINCA foi utilizado no crescimento de amostras bacterianas que foram ensaiadas para a capacidade de hemaglutinação com hemácias de diferentes origens e para visualização de fímbrias através de microscopia eletrônica. O meio foi preparado segundo Guiné et al. (1977), com modificações.

a) Solução de Sais

MgSO ₄ . 7H ₂ O	1,0 g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,1 g
FeCl ₃ . 6H ₂ O	13,0 mg
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,04 g
H ₂ O destilada q.s.p.	100,0 ml

Esta solução foi esterilizada por filtração em membrana Millipore 0,22 µm (Swinex 0,47 µm) e mantida a 4° C.

b) Meio Base

Extrato de Levedura	1,00 g
Casaminoácidos	1,00 g
KH_2PO_4	1,36 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10,10 g
Agar bacteriológico	12,00 g
H_2O destilada q.s.p.	1000,00 ml

1 ml da solução de sais foi adicionado a cada 100 ml de meio base depois de frio.

2.4.12 MEIO MINIMO

O meio mínimo foi utilizado para o crescimento de amostras bacterianas que foram ensaiadas para a capacidade de hemaglutinação com hemácias de diferentes origens, para verificação da produção de toxinas no teste de alça ligada em coelhos e para visualização de fímbrias através de microscopia eletrônica.

a) Solução Estoque M.M. 20X

KH_2PO_4	60,0 g
K_2HPO_4	140,0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20,0 g

Citrato de Sódio	10,0 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	2,0 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0 ml
pH final 7,4	

O meio mínimo foi preparado adicionando-se 2 g de agar bacteriológico em 100 ml de H₂O destilada q.s.p. e autoclavado a 121° C por 20 min.. Após resfriamento a 60° C o agar foi suplementado com 5 ml de solução estoque de M.M. 20X e 2,5 ml de glicose 20 %.

2.4.13 MEIO MAC CONKEY

O meio Agar Mac Conkey foi utilizado como meio seletivo no reisolamento das amostras bacterianas. Este meio foi reconstituído dissolvendo-se 50,0 g do meio preparado em 1000 ml de H₂O destilada.

2.4.14 MEIO VEAL

O meio veal foi utilizado para o crescimento de amostras bacterianas nos testes de hemaglutinação com hemácias de diferentes animais.

Extrato de carne	10,0 g
Proteose peptona	10,0 g

NaCl	5,0 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0 ml

2.4.15 MEIO CAYE (Casaminoacids - Yest Extract)

O meio caye foi utilizado para o crescimento de amostras bacterianas que foram testadas para a produção de toxina termoestável ST I em camundongos recém-nascidos e de verocitotoxina (VT) em cultura de células Vero "in vitro". O meio foi preparado segundo a formulação de Evans et al. (1973).

a) Solução de Sais

MgSO ₄	5,0 g
FeCl ₃	0,5 g
MnCl ₂	0,5 g

A solução de sais foi preparada dissolvendo-se todas as substâncias em H₂SO₄ 0,001 M. Esta solução foi esterilizada por filtração em membrana Millipore 0,22 µm (Swinex 0,47 µm) e mantida a 4° C.

b) Meio Base

Extrato de Levedura	6,00 g
Casaminoácidos	20,00 g
NaCl	2,50 g
K ₂ HPO ₄	8,75 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,00 ml
pH final 8,2	

1 ml da solução de sais foi adicionado para cada 100 ml de meio base depois de frio.

2.4.16 MEIO AGAR SANGUE

O meio agar sangue foi utilizado no ensaio das amostras bacterianas para a verificação da produção de hemolisina.

a) Sangue de Carneiro Desfibrinado

O sangue de carneiro foi retirado em condições de assepsia em recipiente esterilizado contendo pérolas de vidro, sob agitação constante, sendo a seguir deixado em repouso por 12-18 h a 4° C.

b) Meio Base

Extrato de Carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
NaCl	8,0 g
Agar bacteriológico	15,0 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0 ml

O sangue de carneiro desfibrinado foi adicionado ao meio base esterilizado e resfriado a 60° C para uma concentração final de 5 %. As placas contendo agar sangue foram incubadas a 37° C por 12-18 h para teste de esterilidade.

2.4.17 MEIO DE EAGLE

O meio de Eagle foi utilizado para o crescimento de células HeLa e Vero em cultura de tecido para os testes de adesão e invasão (Scaletsky et al., 1984) e produção de verocitotoxina (Yano et al., 1988), respectivamente.

Este meio foi preparado segundo as especificações do fabricante. O pH foi ajustado com uma solução de bicarbonato de sódio a 10 %, esterilizado em filtro SARTORIUS e mantido a 4° C.

Para o cultivo celular o meio de Eagle foi suplementado com soro fetal bovino (Cultilab) em concentrações de 2 % ou 10 %.

2.4.18 MEIO M 9

O meio M 9 foi utilizado no teste de produção de aerobactina das amostras bacterianas.

Na_2HPO_4	6,0 g
KH_2PO_4	3,0 g
NaCl	0,5 g
NH_4Cl	1,0 g
H_2O destilada q.s.p.	1000,0 ml

10 ml da solução de CaCl_2 foram adicionados ao meio depois de autoclavado.

2.4.19 PEPTONA-GLICOSE

O meio peptona-glicose foi utilizado no crescimento de amostras bacterianas para teste de resistência sérica.

a) Peptona 1 %

Peptona	1,0 g
H ₂ O destilada q.s.p.	100,0 ml

b) Solução estoque de glicose 20 %

A solução de glicose foi preparada segundo descrito no item 2.4.9.

5 ml da solução estoque de glicose foram adicionados a 100 ml de peptona 1 % depois de resfriada.

2.5 SOLUÇÕES ESTOQUE DE ANTIMICROBIANOS

Os agentes antimicrobianos utilizados foram: ácido nalidíxico, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, canamicina, gentamicina e tetraciclina.

As concentrações utilizadas no preparo dos estoques antimicrobianos e os diluentes empregados encontram-se na tabela 2. As soluções foram armazenadas a -20° C no escuro.

TABELA 2. Concentrações e diluentes dos estoques de antimicrobianos utilizados.

Drogas	Concentração
Ap (ampicilina)	25 mg/ml em H ₂ O mili Q
Cm (cloranfenicol)	25 mg/ml em etanol
Gm (gentamicina)	8 mg/ml em H ₂ O mili Q
Km (kanamicina)	25 mg/ml em H ₂ O mili Q
Nal (ácido nalidíxico)	25 mg/ml em NaOH 0,2 N
Sm (estreptomicina)	20 mg/ml em H ₂ O mili Q
Tc (tetraciclina)	12,5 mg/ml em metanol

2.6 SOLUÇÕES DE USO GERAL

2.6.1 SOLUÇÃO SALINA 0,85 %

A solução salina foi utilizada para a diluição das amostras bacterianas em diversos protocolos.

NaCl	8,5 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0 ml

2.6.2 "POOL" DE SORO DE GALINHA

Soro de galinha foi utilizado nos testes de resistência sérica das diferentes amostras bacterianas. Sangue de 6 a 8 galinhas foi coletado sob condições de assepsia e mantido à temperatura ambiente por 1 a 2 h e, a seguir, mantido a 4° C até a formação do coágulo. O soro coletado foi centrifugado a 4° C por 10 min e distribuído em frascos com 20 ml cada os quais foram armazenados a -20° C.

2.6.3 SORO FETAL BOVINO

O soro fetal bovino (Cultilab) foi utilizado como complemento do meio de cultura para crescimento de células HeLa e Vero in vitro.

2.7 SOLUÇÃO PARA TESTE DE TOXINA ST I

2.7.1 SOLUÇÃO AZUL DE EVANS 2 %

Azul de Evans	2,0 g
Solução salina 0,85 %	100,0 ml

2.8 SOLUÇÕES PARA TESTE DE TOXINA LT

2.8.1 SOLUÇÃO ESTOQUE DE TAMPÃO TRIETA pH 7,4

MgSO ₄ . 7H ₂ O	1,2 g
CaCL ₂ . 2H ₂ O	0,2 g
NaCl	75,0 g
Trietanolamina	34,7 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0 ml

2.8.2 SOLUÇÃO TAMPÃO TRIETA PH 7,4

Solução estoque tampão trieta	100,0 ml
Gelatina	0,5 g
H ₂ O destilada	900,0 ml
pH final 7,4	

2.9 SOLUÇÕES PARA TESTE DE HEMAGLUTINAÇÃO

2.9.1 TAMPÃO PBS PH 7,2

Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O	1,15 g
KCl	0,20 g
NaCl	8,00 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,00 ml
pH final 7,2	

2.9.2 SOLUÇÃO DE ALSEVER

Glicose	20,5 g
Citrato de Sódio	8,0 g
NaCl	4,2 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0 ml
pH final 6,5	

A solução de Alsever foi esterilizada por filtração em membrana Millipore 0,22 um (Swinex 0,47 mm) e mantida a 4° C.

2.9.3 SOLUÇÃO DE CITRATO DE SÓDIO 3,8 %

Citrato de Sódio	3,8 g
H ₂ O destilada q.s.p.	100,0 ml

2.10 SOLUÇÕES PARA TESTE DE ADESAO E INVASÃO DE CÉLULAS HELA IN VITRO

2.10.1 TAMPÃO PBS pH 7,4

O preparo do tampão PBS pH 7,4 seguiu a mesma formulação do Tampão PBS pH 7,2, exceto no ajuste do pH para 7,4 com HCl 1 N.

2.10.2 TAMPÃO DE SORENSEN pH 7,3

O Tampão Soresem foi utilizado para a diluição dos corantes May Grunwald e Giemsa.

a) Solução A

KH_2PO_4	9,08 g
H_2O destilada q.s.p.	1000,00 ml

b) Solução B

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	17,87 g
H_2O destilada q.s.p.	1000,00 ml

Aproximadamente 236 ml da Solução A foram misturados gradualmente com 764 ml da Solução B até atingir-se o pH 7,3.

2.10.3 SOLUÇÃO ESTOQUE DE MAY GRUNWALD 2 %

May Grunwald	2,0 g
Metanol	100,0 ml

O corante May Grunwald (Reagen) foi dissolvido em metanol e mantido em banho maria a 60° C por 30 min.. A

solução foi filtrada em papel Whatman nº 3 e armazenada em frasco escuro a 4° C.

2.10.4 CORANTE MAY GRUNWALD (1:2)

Solução Estoque May Grunwald 2 %	10,0 ml
Tampão Sorensem pH 7,3	10,0 ml

2.10.5 SOLUÇÃO ESTOQUE DE GIEMSA

Giemsa	1,0 g
Glicerina	54,0 ml
Metanol	86,0 ml

O corante Giemsa (Reagen) foi dissolvido em glicerina e mantido em banho maria a 60° C por 1 hora e 30 min.. Depois de frio, adicionou-se o metanol e a solução foi filtrada em papel Whatman nº 3, sendo armazenada em frasco escuro a 4° C.

2.10.6 CORANTE GIEMSA (1:5)

Solução Estoque Giemsa	4,0 ml
Tampão Sorensem pH 7,3	16,0 ml

2.11 SOLUÇÕES PARA VISUALIZAÇÃO DE FIMBRIAS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA

2.11.1 SOLUÇÃO DE PARLÓDIO 0,5%

Parlódio	0,25 g
Acetato de Amila q.s.p.	50,00 ml

O parlódio (Sigma) foi dissolvido no acetato de amila em um frasco escuro e mantido a 4° C.

2.11.2 SOLUÇÃO DE PTA 1% (Ácido Fosfotúngstico)

Ácido fosfotúngstico	0,5 g
H ₂ O Milli-Q esterilizada q.s.p.	50,0 ml

O ácido fosfotúngstico (Sigma) foi dissolvido em 40 ml de H₂O Milli-Q esterilizada e o pH da solução foi ajustado para pH 7,2 com KOH 10 N sendo, a seguir, o volume completado. A solução foi filtrada em membrana Millipore 0,22 µm (Swinex 13 mm) diretamente em frascos esterilizados e armazenada a 4° C.

2.11.3 TAMPÃO PBS pH 7,2

O tampão PBS pH 7,2 foi o mesmo utilizado para o teste de hemaglutinação como especificado no item 2.9.1.

2.12 SOLUÇÕES PARA EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

2.12.1 SOLUÇÃO I (Tris 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM)

Tris	0,30 g
EDTA	0,37 g
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	100,00 ml

Esta solução foi autoclavada a 121° C por 20 min e mantida a 4° C.

2.12.2 SOLUÇÃO II (NaOH 0,2 N; SDS 1%)

a) Solução de NaOH 10 N

NaOH	40,0 g
H ₂ O Milli-Q esterilizada	100,0 ml

b) Solução de SDS 10%

SDS	10,0 g
H ₂ O Milli-Q esterilizada	100,0 ml

A solução II foi preparada com a mistura de 200 µl da solução de NaOH 10 N e 100 µl da solução de SDS 10%, completando-se o volume para 1,0 ml com H₂O destilada. Esta solução foi homogeneizada e mantida à temperatura ambiente por no máximo 2 semanas.

2.12.3 SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO 3 M

14,31 g de acetato de sódio foram dissolvidos em aproximadamente 30 ml de água destilada e o pH ajustado para 4,8 com ácido acético glacial concentrado. O volume foi completado com água destilada e a solução foi mantida a 4° C.

2.12.4 SOLUÇÃO-ESTOQUE DE RNase (RNase 10 mg/ml;
NaCl 15 mM; Tris 15 mM pH 7,5)

RNase	100,0 mg
Tris	18,2 mg
NaCl	8,8 g
H ₂ O Milli-Q esterilizada	10,0 ml
pH final	7,5

A solução estoque RNase foi fervida em banho-maria a 100° C por 15 min, armazenada em alíquotas de 1,0 ml e mantida a -20° C.

2.12.5 SOLUÇÃO DE RESSUSPENSÃO 6X (Ficoll 400 15%; azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol FF 0,25%; RNase 0,1 mg/ml)

Ficoll 400	7,5 g
Azul de bromofenol	125,0 mg
Xileno cianol FF	125,0 mg
Solução-estoque de RNase	500,0 µl
H ₂ O Milli-Q esterilizada q.s.p.	50,0 ml

A solução foi mantida à temperatura ambiente.

2.13 SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE

2.13.1 TAMPÃO TEB 5X

Tris	54,0 g
Acido bórico	27,5 g
Solução de EDTA 0,5 M	20,0 ml
H ₂ O Milli-Q esterilizada	1000,0 ml
pH final 8,0	

2.13.2 TAMPÃO TEB 1X

O tampão TBE 1X foi utilizado no preparo de géis de agarose e como tampão de corrida para eletroforese de DNA

Tampão TEB 5X	200,0 ml
H ₂ O destilada	800,0 ml
pH final 8,0	

2.14 SOLUÇÕES PARA VISUALIZAÇÃO DE DNA EM LUZ ULTRA-VIOLETA

2.14.1 SOLUÇÃO DE BROMETO DE ETÍDIO 1%

Brometo de etídio	1,0 g
H ₂ O destilada q.s.p.	100,0 ml

Esta solução foi armazenada em frasco escuro e mantida a 4° C.

2.15 SOLUÇÕES PARA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

2.15.1 TAMPÃO TRIS HCl 50 mM pH 7,4

Tris	0,6 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0 ml

O pH foi ajustado com HCl para 7,4 e o volume completado para 1000,0 ml. Este tampão foi mantido a 4° C.

2.15.2 TAMPÃO DE RESSUSPENSÃO 2X (Tris HCl 100 mM pH 6,8; glicerol 20%; SDS 4%; azul de bromofenol 0,2%; 2-mercaptoetanol 10%)

Tris	0,12 g
SDS	0,40 g
Azul de bromofenol	0,02 g
Glicerol	0,20 ml
2-mercaptoetanol	0,10 ml
H ₂ O destilada q.s.p.	10,00 ml
pH final 6,8	

2.16 SOLUÇÕES PARA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA

2.16.1 TAMPÃO TRIS HCl 3,3 mM pH 7,4

Tris	0,4 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0 ml

O pH foi ajustado com HCl para 7,4 e o volume completado para 1000,0 ml. O tampão foi mantido a 4° C.

2.16.2 TAMPÃO TRIS HCl 0,1 M; EDTA 10 mM pH 7,2

Tris	12,11 g
EDTA	3,72 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,00 ml

O pH foi ajustado com HCl para 7,2. O tampão foi mantido a 4° C.

2.16.3 TAMPÃO TRIS HCl 0,1 M; MgCl₂ 10 mM pH 7,2

Tris	12,11 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	2,03 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,00 ml

O pH foi ajustado com HCl para 7,2. O tampão foi mantido a 4° C.

2.16.4 TAMPÃO GLICINA 0,1 M; SACAROSE 0,75 M pH 9,2

Glicina	7,34 g
Sacarose	256,73 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,00 ml

O pH foi ajustado com NaOH para 9,2. O tampão foi mantido a -20° C.

2.16.5 TAMPÃO TRIS HCl 85 mM pH 6,8

Tris	1,03 g
H ₂ O destilada q.s.p.	100,00 ml

O pH foi ajustado com HCl para 6,8. O tampão foi mantido a 4° C.

2.16.6 SOLUÇÃO TRITON X 100 10%

Triton X 100	5,0 ml
H ₂ O destilada q.s.p.	50,0 ml

A solução foi mantida a 4° C.

2.16.7 TAMPÃO DE RESSUSPENSÃO 2X

O tampão de ressuspensão foi o mesmo utilizado no protocolo para extração de proteínas totais como especificado no item 2.10.2.

2.17 SOLUÇÕES PARA SDS-PAGE

A formulação das soluções e tampões utilizados no preparo dos géis de poliacrilamida-SDS descontinuos, segundo o sistema de Laemmli (1970), seguiu as especificações do "Hoefer Electroforesis Catalog and Exercises (1990-1991)".

2.17.1 SOLUÇÃO DE MONÔMERO (30% T; 2,7% C₁₂)

Acrilamida	58,4 g
Bis-acrilamida	1,6 g
H ₂ O Milli-Q esterilizada q.s.p.	200,0 ml

A solução foi filtrada em papel Whatmann nº 3 e armazenada a 4° C.

2.17.2 TAMPÃO PARA GEL DE SEPARAÇÃO 4X (Tris HCl 1,5 M pH 8,8)

Tris	36,33 g
H ₂ O Milli-Q esterilizada q.s.p.	200,00 ml

O pH da solução foi ajustado com HCl para 8,8 e o volume foi completado para 200 ml. O tampão foi filtrado em papel Whatmann nº 3 e armazenado a 4° C.

**2.17.3 TAMPÃO PARA GEL DE EMPACOTAMENTO 4X (Tris
HCl 0,5 M pH 6,8)**

Tris	3027,5 mg
H ₂ O Milli-Q esterilizada q.s.p.	50,0 ml

O pH da solução ajustado com HCl para 6,8 e o volume completado para 200 ml. O tampão foi filtrado em papel Whatmann nº 3 e armazenado a 4° C.

2.17.4 PERSSULFATO DE AMÔNIO 10%

Perssulfato de amônio	5,0 g
H ₂ O Milli-Q esterilizada q.s.p.	50,0 ml

A solução foi filtrada em papel Whatmann nº 3 e distribuída em Eppendorffs (500 µl por tubo), e a seguir, armazenada a -20° C. Um tubo foi descongelado à temperatura ambiente imediatamente antes da sua utilização.

2.17.5 TAMPÃO DE CORRIDA (Tris 0,025 M pH 8,3; glicina 0,192 M; SDS 0,1%)

Tris	12,11 g
Glicina	57,60 g
SDS 10%	40,00 ml
H ₂ O destilada q.s.p.	4000,00 ml

O pH deste tampão não precisa ser ajustado. Este tampão foi mantido à temperatura ambiente.

2.18 SOLUÇÕES PARA COLORAÇÃO DE GÉIS DE PROTEÍNAS TOTAIS COM COOMASSIE BLUE

O preparo das soluções para coloração de Coomassie Blue seguiu o "Hoefer Electroforesis Catalog and Exercises (1990-1991)".

2.18.1 SOLUÇÃO-ESTOQUE DE COOMASSIE BLUE R-250 1%

Coomassie blue R-250	1,0 g
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	100,0 ml

A solução foi filtrada em papel Whatmann nº 3 e armazenada em frasco escuro à temperatura ambiente.

2.18.2 SOLUÇÃO CORANTE DE COOMASSIE BLUE R-250

(Coomassie blue R-250 0,125%; metanol 40%; Ácido acético 7%)

Solução-est. de coomassie blue	62,5 ml
Metanol	400,0 ml
Ácido acético glacial	70,0 ml
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,0 ml

A solução foi filtrada em papel Whatmann nº 3 e armazenada em frasco escuro à temperatura ambiente.

2.18.3 SOLUÇÃO DE DESCOLORAÇÃO I (Metanol 50%;

Ácido acético 10%)

Metanol	500,0 ml
Ácido acético glacial	100,0 ml
H ₂ O destilada	400,0 ml

A solução foi armazenada em frasco escuro hermeticamente fechado e mantida à temperatura ambiente.

2.18.4 SOLUÇÃO DE DESCOLORAÇÃO II (Metanol 5%;

ácido acético 7%)

Metanol	50,0 ml
Ácido acético glacial	70,0 ml
H ₂ O destilada	880,0 ml

A solução foi armazenada em frasco escuro hermeticamente fechado e mantida à temperatura ambiente.

As soluções de descoloração I e II foram reutilizadas removendo-se o corante com carvão ativado. As soluções foram mantidas no carvão ativado por alguns segundos e a seguir, filtradas em papel de filtro duplo.

2.19 SOLUÇÕES PARA IMPREGNAÇÃO DOS GÊIS DE PROTEINAS DE MEMBRANA COM PRATA

O preparo das soluções para impregnação com prata seguiu formulação de Blum et al (R66).

2.19.1 FIXADOR (Metanol 50%; ácido acético 12%; formaldeído 37% 0,5 ml/l)

Metanol	500,0 ml
Acido acético glacial	120,0 ml
Formaldeído 37%	0,5 ml
H ₂ O destilada	380,0 ml

A solução armazenada em frasco hermeticamente fechado e mantida à temperatura ambiente.

2.19.2 SOLUÇÃO DE ETANOL 50%

Etanol	500,0 ml
H ₂ O destilada	500,0 ml

A solução foi armazenada em frasco escuro hermeticamente fechado e mantida à temperatura ambiente.

2.19.3 SOLUÇÃO DE TIOSSULFATO DE SÓDIO 0,02%

Na ₂ S ₂ O ₃ . 5H ₂ O	0,06 g
H ₂ O destilada	300,00 ml

2.19.4 SOLUÇÃO DE NITRATO DE PRATA (Nitrato de prata 0,2%; formaldeído 37% 0,75 ml/l)

AgNO ₃	0,6 g
Formaldeído 37%	225,0 ul
H ₂ O destilada	300,0 ml

2.19.5 SOLUÇÃO REVELADORA (Carbonato de sódio 6%; tiossulfato de sódio 4 mg/ml; 0,5 ml/l de formaldeído 37%)

Na ₂ CO ₃	18,0 g
Sol. de tiossulfato de sódio	6,0 ml
Formaldeído 37%	150,0 ul
H ₂ O destilada	300,0 ml

2.19.6 SOLUÇÃO "STOP" (Metanol 50%; ácido acético 12%)

Metanol	150,0 ml
Acido acético	36,0 ml
H ₂ O destilada	114,0 ml

A solução foi armazenada em frasco escuro hermeticamente fechado e mantida à temperatura ambiente.

2.19.7 SOLUÇÃO DE METANOL 50%

Metanol	150,0 ml
H ₂ O destilada	150,0 ml

A solução foi armazenada em frasco escuro hermeticamente fechado e mantida à temperatura ambiente.

**2.20 SOLUÇÕES PARA SECAGEM DOS GÉIS DE POLIACRILAMIDA-
SDS**

2.20.1 SOLUÇÃO DE PRESERVAÇÃO I (Metanol 30%)

Metanol	90,0 ml
H ₂ O destilada	210,0 ml

A solução foi armazenada em frasco escuro hermeticamente fechado e mantida à temperatura ambiente.

2.20.2 SOLUÇÃO DE PRESERVAÇÃO II (Glicerol 3%)

Glicerol	9,0 ml
H ₂ O destilada	291,0 ml

A solução foi armazenada em frasco escuro hermeticamente fechado e mantida à temperatura ambiente.

2.21 MARCADORES DE PESO MOLECULAR PARA SDS-PAGE

Foi utilizado o Kit de marcadores de peso molecular para géis de poliacrilamida-SDS de procedência da Sigma (MW - SDS-70).

TABELA 3 Padrões de peso molecular de proteínas.

Proteínas	Peso Molecular
Lisozima	14.300
Beta-lactoglobulina	18.400
Tripsinogênio	24.000
Pepsina	34.700
Albubina de Ovo	45.000
Albumina Bovina	66.000

3. MÉTODOS

3.1 ISOLAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras bacterianas utilizadas no presente trabalho foram testadas quanto à pureza através do inóculo em tubo contendo 3,0 ml de meio LB e incubado por 12-18 h a 37° C. O crescimento bacteriano foi semeado por esgotamento de alça em placas contendo agar Mac Conkey e incubadas por 12-18 h a 37° C.

Uma colônia isolada, característica, foi transferida para tubos contendo meios LB, Citrato, EPM e Mili para confirmação das características bioquímicas e a seguir incubados por 12-18 h a 37° C.

Após a confirmação das características bioquímicas (nos meios Citrato, Mili e EPM), o crescimento bacteriano em meio LB foi transferido para tubos contendo meio LA semi-sólido e LB para manutenção das amostras de *E. coli*. Os tubos com LA semi-sólido foram incubados por 12-18 h a 37° C e, a seguir, fechados com rolha de borracha e mantidos à temperatura ambiente no escuro. Aos tubos com LB foram adicionados glicerol para uma concentração final de 15 % e mantidos a -20° C.

3.2 TESTE DE PATOGENICIDADE

As amostras bacterianas de origem aviária foram semeadas em tubos contendo 3,0 ml de caldo nutriente e incubadas a 37° C por 16 h. 0,1 ml deste crescimento bacteriano foram transferidos para erlenmeyers contendo 10 ml de caldo nutriente, os quais foram incubados sob agitação a 37° C por 4 h. Após este período de tempo, para cada amostra, foram efetuadas diluições de -1 a -5 e 0,4 ml de cada diluição foram inoculados em 4 ou 5 pintos de um dia de idade.

Paralelamente, o número de unidades formadoras de colônias (UFC), para cada amostra, foi determinado através da diluição destas amostras em solução salina 0,85% seguido do plaqueamento em meio LA. Estas placas foram incubadas a 37° C por 18 h.

A amostra foi considerada patogênica quando no período de 4 dias de observação matou mais da metade dos pintos.

3.3 DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE HEMAGLUTINAÇÃO

3.3.1 CRESCIMENTO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS

As amostras bacterianas foram crescidas em 3,0 ml de meio LB e incubadas por 12-18 h a 37° C. As culturas

foram semeadas por esgotamento com alça de platina em placas de Petri contendo diferentes meios de cultura (M.M., TSA, LA, CFA, A.G., MINCA, Mac Conkey) sendo as mesmas, a seguir, invertidas e incubadas a 37° C por 12-18 h. Para os meios mínimo e Minca o tempo de incubação foi de 36 h. O mesmo procedimento foi realizado com o meio Veal (líquido) e o tubo foi mantido a 37° C por 72 h.

3.3.2 LAVAGEM DOS ERITROCITOS

Sangue de boi, cavalo e carneiro foram coletados sob condições de assepsia e homogeneizados com igual volume de solução de Alsever. As suspensões, assim obtidas, foram a seguir, distribuídas em tubos de ensaio esterilizados e mantidas a 4° C.

Sangue de cobaio, humano, coelho e galinha foram coletados com igual volume de solução de citrato de sódio 3,8% e imediatamente utilizados para teste de hemaglutinação.

Para o preparo das suspensões de eritrócitos nos tubos estocados a 4° C, o sobrenadante foi removido por aspiração antes do processo de lavagem, então, adicionou-se solução salina 0,85 % (1V/1V) aos tubos, os quais foram homogeneizadas suavemente. A solução foi, então, centrifugada a 1400 g por 10 min. e o sobrenadante foi

aspirado. A seguir, o sedimento foi ressuspenso em 10 ml de PBS pH 7,2 e novamente centrifugado.

Para o teste de hemaglutinação em lâmina foi preparada uma solução a 10 % de "papa" de hemácias em 20 ml de Tampão PBS pH 7,2 adicionando-se 1 % de D-manose.

3.3.3 TESTE DE HEMAGLUTINAÇÃO EM LAMINA

Um pequeno raspado do crescimento bacteriano, obtido a partir da superfície das placas incubadas a 37° C, foi homogeneizado delicadamente em 20 ul de PBS pH 7,2 com D-manose 1 % , em uma placa de vidro colocado sobre gelo. Como controle para a verificação da presença de fímbrias tipo I, o mesmo procedimento foi efetuado com eritrócitos de cobaia preparados com PBS pH 7,2 sem manose.

Na hemaglutinação, foram adicionados sobre as suspensões bacterianas 20 ul de suspensão de hemácias a 10 % em PBS pH 7,2 com D-manose e os resultados foram observados após 3 min. de homogeneização das suspensões.

3.4 TESTE DE PRODUÇÃO DE TOXINA TERMOESTÁVEL (ST I)

A verificação da produção de STI foi feita através do teste do camundongo recém-nascido (Dean et al., 1973).

As amostras bacterianas foram inoculadas em 10 ml de meio de CAYE e incubadas sob agitação (140 rpm) a 37° C

por 14 h. Após este período de tempo, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 3000 g por 40 min., separando-se o sobrenadante. Um volume de 1,5 ml deste sobrenadante foi transferido para um Eppendorff esterilizado e o mesmo centrifugado a 12000 g por 5 min.. Este sobrenadante foi, novamente, transferido para outro Eppendorff, sendo adicionados 5 ul de uma solução estoque de gentamicina (8 mg/ml) e a seguir mantido a -20° C.

Para o teste da produção de toxina STI em camundongos recém-nascidos (acúmulo de fluídos a nível intestinal) foram adicionados ao sobrenadante, preparado como descrito anteriormente, 100 ul da solução de azul de Evans 1 %. Esta solução foi homogeneizada e alíquotas de 0,1 ml inoculadas, via intragástrica, em 3 camundongos com tres dias de idade.

Os animais foram sacrificados pela inalação de éter, 2 h após a inoculação e os intestinos e carcaças de cada animal foram pesados separadamente e uma relação peso dos intestinos/peso das carcaças superior a 0,085 foi considerada positiva quanto a produção de ST I.

3.5 TESTE DE PRODUÇÃO DE VEROTOXINA (VT)

A verificação da produção de VT foi feita em cultura de células Vero, segundo a metodologia de Yano et al. (1986).

As amostras bacterianas foram preparadas como descrito anteriormente para o teste de ST I, no item 3.4.

As placas de cultura de tecido com 96 orifícios (fundo chato) contendo células Vero foram fornecidas pela Companhia Salsbury Laboratórios Ltda, sendo incubadas a 37° C em atmosfera de CO₂ por 24 h.

O meio de cultura das placas foi removido e 100 ul de meio Eagle com 20 ul de sobrenadante das culturas bacterianas foram adicionados sobre as células. Para cada amostra 3 repetições foram realizadas.

As placas foram incubadas a 37° C em atmosfera de CO₂ e a leitura dos resultados foi efetuada, com auxílio de microscópio óptico invertido, após 24 e 48 h de incubação.

As amostras foram consideradas positivas para a produção de verotoxina, quando mais de 50 % das células Vero apresentavam-se arredondadas e/ou em suspensão no meio de cultura.

3.6 TESTE DE PRODUÇÃO DE TOXINA TERMOLÁBIL (LT)

A verificação da produção de LT foi feita através do teste de imuno-hemólise radial, descrita por Yano et al. (1982).

As amostras bacterianas foram preparadas como descrito anteriormente para o teste de ST I, segundo o item 3.4.

A imuno-hemólise radial consiste na preparação de um gel de imunodifusão radial preparado com hemácias de carneiro. Para o preparo do gel, as hemácias de carneiro foram lavadas com tampão Trieta pH 7,4 e padronizadas para uma suspensão de 5 %. O gel de imunodifusão radial foi preparado com agarose 1 % e quando estava com aproximadamente a 45° C, acrescentou-se a suspensão de hemácias padronizadas para uma concentração final de 6 %. O gel foi vertido sobre uma placa de acrílico e resfriado. Após gelificação, orifícios de 4 mm de diâmetro foram feitos no gel e 20 ul do sobrenadante de cada cultura bacteriana foram aplicados nos orifícios individuais.

Após este procedimento, o gel foi incubado à temperatura ambiente durante a noite em câmara úmida e 20 ul de uma solução de antitoxina colérica diluída 1:10 foram adicionados em cada orifício. O gel foi, a seguir, incubado à temperatura ambiente por 4 h em câmara úmida e 4 ml de soro de cobaio (complemento) diluído 1:10 foi vertido sobre o gel de imunodifusão. A placa, contendo o gel, foi incubada a 37° C por 2 h e a seguir o complemento retirado para a leitura do resultado.

O resultado foi considerado positivo para produção de toxina LT quando formava-se um halo de lise ao redor dos orifícios.

3.7 TESTE PARA PRODUÇÃO DE HEMOLISINA

As amostras bacterianas foram semeadas, com auxílio de uma multialça, em placas contendo agar sangue, a partir de um pré-inóculo em meio LB incubado a 37° C por 12-18 h. Após a absorção das colônias pelo meio de cultura, as placas foram invertidas e incubadas a 37° C por 18 h.

A produção de hemolisina foi evidenciada pela formação de halo de hemólise ao redor das colônias.

3.8 TESTE DE SERENY

As amostras bacterianas foram semeadas em placas com meio LA, a partir de um pré-inóculo em meio LB incubado por 12-18 h a 37° C. O crescimento bacteriano foi ressuscitado em solução salina 0,85% e então diluído para uma concentração correspondente à turvação do tubo nº 9 da Escala Mac Farland. Uma suspensão de 50 ul foi inoculada no olho direito de cada cobaio albino e observações foram feitas durante 7 dias a partir do dia da inoculação.

A formação de uma ceratoconjutivite no olho do animal indicou que a amostra era do tipo invasiva. Como controle positivo, uma suspensão contendo uma linhagem de *Shigella sonnei* também foi inoculada em olho de cobaio albino.

3.9 TESTE PARA PRODUÇÃO DE AEROBACTINA

A produção de aerobactina pelas diferentes amostras bacterianas seguiu a metodologia descrita por Carbonetti et al. (1984), utilizando-se como indicadora de produção de aerobactina a linhagem LG 1522.

A linhagem LG 1522, crescida em meio LB por 12-18 h a 37° C, foi semeada sobre placa de Petri contendo meio M9 suplementado com 0,4 % de glicose e - dipiridil para uma concentração final de 200 µM e a mesma deixada à temperatura ambiente até estar seca. Sobre a amostra indicadora, as amostras bacterianas a serem testadas foram inoculadas com o auxílio de alça múltipla a partir de um pré-inóculo crescido em meio LB por 12-18 h a 37° C. A seguir, as placas foram incubadas por 12-18 h a 37° C.

A formação de um halo de crescimento da linhagem indicadora ao redor das amostras a serem testadas indicou a produção de aerobactina.

3.10 TESTE PARA DETERMINAÇÃO DE RESISTENCIA SÉRICA

As amostras bacterianas foram inoculadas em tubos contendo 3,0 ml de meio peptona-glicose a partir de um pré-inóculo em meio LB incubado a 37° C por 12-18 h. Os tubos contendo meio peptona-glicose foram incubados a 37° C por 3 h.

3.11.2 CULTIVO DE CÉLULAS HeLa

As células HeLa (Instituto Adolfo Lutz, SP) foram mantidas em garrafas de cultura com meio Eagle suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (SFB) as quais foram incubadas a 37° C por 72 h. Após a formação da monocamada celular, o meio de Eagle foi removido e as células lavadas com 5,0 ml de PBS pH 7,4. A seguir, as células foram tripsinizadas e diluídas para uma concentração de aproximadamente 1.10^6 células/ml com meio Eagle suplementado com SFB.

Aliquotas de 1,0 ml da suspensão de células foram transferidas para tubos de Leighton contendo uma laminula (11x24 mm), sendo os mesmos incubados a 37° C em atmosfera de CO₂ por 24 h.

3.11.3 TESTE DE ADESAO

O teste de adesão em células HeLa seguiu a metodologia descrita por Scaletsky et al. 1984.

Para a realização do teste de adesão o meio de cultura dos tubos de Leighton foi descartado, as células foram lavadas com 1,0 ml de PBS pH 7,4 e a seguir, 1,0 ml de Meio Eagle suplementado com 2 % de SFB foi acrescentado a estes tubos. 50 ul da suspensão bacteriana foram adicionados aos tubos de Leighton, os quais foram incubados a 37° C por 30 min. (período de infecção). Após esse período, o meio de

cultura foi descartado e as células lavadas 6 vezes com 1,0 ml de PBS pH 7,4. Em seguida, adicionou-se 1,0 ml de meio Eagle contendo 2 % de SFB e 1 % de D-manose e incubou-se novamente os tubos a 37° C por 3 h (período de multiplicação).

Após este período de tempo, o meio de cultura foi descartado, as células lavadas 3 vezes com 1,0 ml de PBS pH 7,4 e as lâminulas fixadas com metanol durante 30 min., sendo as mesmas a seguir, coradas com corante May Grunwald por 5 min..

Após a coloração com o corante May Grunwald adicionou-se o corante Giemsa por 10 min.. As lâminulas foram lavadas várias vezes com PBS pH 7,4 e montadas com Bálsamo do Canadá sobre lâmina de microscopia óptica.

A adesão bacteriana nas células HeLa foi visualizada em microscopia ótica comum sob aumento de 400x e 1000x e fotografada com filme Kodak Panatomic-X (32 ASA) em fotomicroscópio com filtro azul. O filme e as fotografias em papel F3 (Kodak) foram processados segundo as instruções do fabricante.

3.12 TESTE DE INVASÃO EM CÉLULAS HeLa

3.12.1 CRESCIMENTO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS

As amostras bacterianas foram inoculadas em tubos com 3,0 ml de meio TSA inclinado a partir de um pré-inóculo em TSB o qual foi incubado a 37° C por 12-18 h. Os tubos foram incubados a 37° C por 18 h. O crescimento bacteriano foi ressuspendido em 1,0 ml de PBS pH 7,4 e 100 ul desta suspensão foram adicionados em 2,0 ml de meio Eagle com 1 % de D-manose e os mesmos mantidos a 37° C por 2 h.

3.12.2 CULTIVO DE CÉLULAS HeLa

As células HeLa utilizadas no teste de invasão foram cultivadas como descrito para o teste de adesão no item 3.11.2.

3.11.3 TESTE DE INVASÃO

O teste de invasão em células HeLa seguiu a metodologia descrita por Scaletsky et al. 1984.

Para a realização do teste de invasão em células HeLa, o meio de cultura que estava nos tubos de Leighton com as referidas células foi descartado e as mesmas lavadas com 1,0 ml de PBS pH 7,4 e em seguida com 1,0 ml de Meio Eagle

com 2 % de SFB . 100 ul da suspensão bacteriana obtida como descrito no item 3.14.1 foram adicionados nos tubos de Leighton contendo as células HeLa e, em seguida, incubados a 37° C por 90 min. (período de infecção). Após este período de tempo, o meio de cultura foi descartado, as células lavadas 10 vezes com 1,0 ml de PBS pH 7,4. A seguir, adicionou-se, ao tubo, 1,0 ml de meio Eagle suplementado com 2 % de SFB, 1 % de D-manose e 10 ul de antibióticos (10.000 U. de Penicilina e 10 mg de Estreptomicina por ml) e incubou-se novamente o mesmo tubo a 37° C por 3 h (período de multiplicação).

O meio de cultura foi descartado e as células lavadas 3 vezes com 1,0 ml de PBS pH 7,4. As lamínulas foram fixadas, retiradas dos tubos e coradas como descrito, anteriormente, para o teste de adesão.

A invasão bacteriana foi visualizada em microscopia ótica comum sob aumento 1000x e fotografada com filme Kodak Panatomic-X (32 ASA) em fotomicroscópio com filtro azul. O filme e as fotografias em papel F3 (Kodak) foram processados segundo as instruções do fabricante.

3.13 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE RESISTENCIA A DROGAS ANTIMICROBIANAS

Para a determinação do nível de resistência a drogas antimicrobianas (ampicilina-Ap, cloranfenicol-Cm,

canamicina-Km, estreptomicina-Sm, tetraciclina-Tc e ácido nalidíxico-Nal), as amostras bacterianas foram inoculadas com auxílio de uma multi-alça, a partir de um pré-inóculo em 3,0 ml de meio LB incubado a 37° C por 12-18 h, em placas de Petri contendo 20,0 ml de meio LA contendo diferentes concentrações dos antibióticos.

As concentrações antimicrobianas ensaiadas foram: 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 350, 500 e 1000 ug/ml. As placas foram invertidas e incubadas a 37° C por 18 h. Considerou-se o nível de resistência, de uma determinada amostra bacteriana, como sendo aquela concentração máxima em que a referida amostra ainda apresentou crescimento.

3.14 TESTE PARA PRODUÇÃO DE COLICINAS

A produção de colicinas pelas diferentes amostras bacterianas seguiu a metodologia descrita por Silveira, (1986) utilizando-se como indicadoras as amostras descritas na tabela 2.

As amostras bacterianas foram inoculadas, com auxílio de uma multialça, em placas de Petri contendo meio LA a partir de um pré-inóculo em tubo com 3,0 ml de meio LB crescidos a 37° C por 12-18 h. A seguir, as placas foram incubadas a 37° C por 18 h e então invertidas sobre uma superfície plana. Nas tampas das placas foram colocados 3,0 ml de clorofórmio e estas foram mantidas fechadas por

30 min.. Após este período de tempo, as placas foram entreabertas dentro de uma estufa a 37° C por cerca de 45 min. para que o resíduo de clorofórmio evaporasse. 100 ul de cada cultura bacteriana indicadora crescida a partir de um pré-inóculo em meio LB, foram misturados com 4,0 ml de meio LB semi-sólido e vertidos sobre as placas, sendo estas a seguir incubadas a 37° C por 18 h.

A formação de um halo de inibição da colônia indicadora ao redor da colônia a ser testada indicou a produção de colicinas.

3.15 VISUALIZAÇÃO DE FIMBRIAS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA

3.15.1 PREPARO DAS TELAS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA

As telas de cobre com diâmetro de 400 "Mesh" utilizadas para microscopia eletrônica foram preparadas através da deposição de uma película de parafina e, a seguir, metalizadas com carbono, segundo as especificações do Centro de Microscopia Eletrônica da UNICAMP.

3.15.2 PREPARO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS, COLORAÇÃO NEGATIVA COM PTA E VISUALIZAÇÃO DE FIMBRIAS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA

As amostras bacterianas foram semeadas em placas contendo os meios CFA, Minca e M.M., a partir de um pré-inóculo em 3,0 ml de meio LB o qual foi incubado por 12-18 h a 37° C. As placas foram invertidas e incubadas por 18 h a 37° C.

Com o auxílio de palitos achatados de madeira, um raspado do crescimento bacteriano foi delicadamente ressuspendido em 100 ul de PTA 1 % e mantido a 4° C.

Uma tela de cobre utilizada em microscopia eletrônica foi colocada sobre papel Parafilm e uma gota da suspensão de bactérias foi depositada sobre a mesma. Após 2 min. o excesso foi removido com papel absorvente e a tela colocada em um porta telas para secagem.

As telas secas foram visualizadas em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss Modelo EM-9, sob aumentos de 9.460x e 27.777x . As fotomicrografias eletrônicas foram feitas em filme Kodalite (Kodak) e ampliadas em papel fotográfico Kodak F3.

3.16 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

O método utilizado para extração do DNA plasmidial foi baseado na técnica de lise alcalina de Birboim & Doly (1979) com modificações.

As amostras bacterianas foram inoculadas em 3,0 ml de meio LB e incubadas a 37° C por 12-15 h. 1,0 ml do crescimento bacteriano foi transferido para um tubo de Eppendorff e, então, centrifugado a 12000 g por 2 min.. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuscitado em 100 ul de solução I gelada. Este tubo foi mantido em banho de gelo por 5 min., sendo a seguir, 200 ul de solução II adicionados e o conteúdo do tubo misturado por inversão suave e vagarosa dos mesmos. Após o tubo ter sido mantido em banho de gelo por não mais que 5 min., 150 ul da solução III foram acrescentados ao conteúdo do mesmo e então, novamente, invertidos suavemente e mantidos em banho de gelo por 15 min.. A suspensão foi centrifugada a 12000 g por 6 min. e 400 ul do sobrenadante transferido para outro tubo de Eppendorff. A este volume, adicionou-se 1,0 ml de etanol 100 % gelado (- 20° C) e o tubo foi invertido várias vezes para a mistura das soluções. Após este procedimento, o tubo foi mantido a -20° C por pelo menos 1 hora.

O DNA plasmidial foi precipitado por centrifugação a 12000 g por 6 min., ressuscitado com 50 ul de solução I gelada e mantido a -20° C até o momento de uso.

Para uso, alíquotas da suspensão de DNA plasmidial com volumes de 10 ul ou 15 ul foram transferidas para tubos de Eppendorff contendo 5 ul de solução de ressuspensão 6X, homogeneizadas com auxílio de uma micropipeta e então aplicadas em canaletas de géis de agarose.

3.17 ELETROFORESE DE DNA PLASMIDIAL EM GEL DE AGAROSE

DNA plasmidial foi visualizado através do sistema de eletroforese horizontal com gel de agarose submerso. A concentração do gel de agarose utilizada foi de 0,4 % e 0,6 % variando conforme o tamanho do DNA plasmidial a ser visualizado. A agarose foi fundida em tampão TBE 1X, resfriada e vertida sobre uma placa de vidro selada lateralmente com auxílio de fita adesiva contendo sobre a mesma um pente de acrílico para a formação das canaletas.

Após a gelificação, o gel foi transferido para cuba de eletroforese horizontal submarina contendo tampão TEB 1X e as amostras de DNA plasmidial aplicadas nas canaletas. Como pré-corrida, aplicou-se inicialmente uma amperagem de 10 a 15 mA até que todo o corante azul penetrasse no gel. Após este procedimento a voltagem foi aumentada para 100 V até que o marcador azul alcançasse a extremidade oposta do gel.

Após o término da corrida, o gel foi transferido para cuba contendo solução de coloração de brometo de etídio

e a visualização das bandas foi feita no transiluminador de luz ultra violeta no escuro.

Para registro dos resultados os géis foram fotografados com filme preto e branco ASA 100 Kodak ou Fuji com o auxílio de um filtro vermelho.

3.18 TRANSFERENCIA DE DNA PLASMIDIAL POR CONJUGAÇÃO

As amostras bacterianas a serem conjugadas foram inoculadas em meio LB e incubadas a 37° C por 15 h em presença dos antimicrobianos para os quais as mesmas eram resistentes. Uma diluição 1:20 da amostra doadora foi transferida para um tubo contendo meio LB mais antimicrobianos e incubado a 37° C até alcançar a fase exponencial de crescimento. Após este procedimento, 100 ul de amostra doadora e 300 ul de receptora foram centrifugadas a 12000 g por 2 min. e os precipitados, lavados com meio LB para completa retirada dos antimicrobianos e a seguir, ressuspensos delicadamente em 100 ul de meio LB.

As duas amostras foram misturadas e depositadas sobre uma membrana de filtro (0,2 um) e incubadas a 37° C durante a noite. Após este período de tempo, o crescimento bacteriano sobre o filtro foi ressuspensionado em 1,0 ml de salina 0,85 % esterilizada. Esta suspensão foi então diluída até 10⁻³ e as diluições foram semeadas em placas contendo meios seletivos.

Como controle as amostras parentais foram semeadas nos meios seletivos para verificar a ocorrência de mutantes resistentes.

3.19 MUTAÇÃO COM TRANSPOSON Tnpho A

As amostras bacterianas 362 e SM10 pir (pRT733:: Tnpho A) foram crescidas em meio LB, incubadas a 37° C por 15 h e a seguir, conjugadas conforme metodologia descrita no item 3.20. A seleção dos mutantes foi feita em placas contendo meio LA adicionado de 40 ug/ml de XP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) e os antibióticos Km (50 ug/ml) e Ap (200 ug/ml). Colônias azuis obtidas neste meio de cultura foram estriadas em placa contendo LA adicionado com XP, Km e Ap e incubados a 37° C por 18 h. As colônias azuis isoladas, indicando a produção de fosfatase alcalina, foram estocadas em meio LA semi sólido para análise dos perfis eletroforéticos de proteínas de membrana, plasmídios e experimentos biológicos (teste de patogenicidade em pintos de um dia de idade, testes de adesão e invasão em células HeLa, resistência sérica e produção de colicinas).

3.20 CURA DE PLASMÍDIOS ATRAVÉS DE TRATAMENTO COM SDS

A eliminação de plasmídios das amostras bacterianas seguiu a metodologia descrita por Tomoeda et al. (1968), com modificações.

A amostra bacteriana foi inoculada em 3,0 ml de meio LB e incubada a 37° C por 12-18 h. A seguir, uma alíquota com 100 µl dessa cultura foi transferida para tubos contendo meio LB e concentrações de 2 %, 5 % e 10 % de SDS sendo os mesmos incubados a 37° C por 12-18 h. Do tubo contendo 10 % de SDS, 100 µl da cultura bacteriana foram transferidos para outro tubo com meio LB com 10 % de SDS e este incubado a 37° C por 12-18 h. Este processo foi repetido por mais 2 vezes e a bactéria inoculada por estria em placas contendo meio LA. Estas placas foram incubadas a 37° C por 12 -18 h e as colônias isoladas analisadas quanto ao perfil plasmidial e a produção de bacteriocina.

3.21 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A extração de proteínas totais das amostras bacterianas seguiu a metodologia descrita por Jackman & Whiley (1990).

As amostras bacterianas foram semeadas em meio CFA a partir de um inóculo em 3,0 ml de meio LB o qual foi incubado a 37° C por 12-18 h. As placas foram incubadas a

37° C por 18 h e o crescimento bacteriano foi raspado com auxílio de palitos esterilizados e a seguir ressuspendido em tubo Eppendorff contendo 0,5 ml de Tris HCl 50 mM pH 7,4 gelado. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 12000 g por 2 min. e o sedimento obtido ressuspendido em 100 µl de H₂O Milli Q. A esta suspensão, adicionaram-se 100 µl de tampão de ressuspensão 2x homogeneizando-se com auxílio de uma micropipeta, a seguir, a suspensão foi fervida em banho-maria por 5 min. e, então, centrifugada por 5 min. a 12000 g. Após este procedimento, o sobrenadante foi transferido para outro tubo Eppendorff e o mesmo mantido a -20° C.

Para a maioria das amostras bacterianas 10 µl da suspensão de proteínas foi utilizada no gel de poliacrilamida-SDS.

3.22 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA

A extração de proteínas de membrana das amostras bacterianas seguiu a metodologia descrita por Benedetti (1991), com modificações.

As amostras bacterianas foram semeadas em placas contendo meio CFA a partir de um inóculo em 3,0ml de meio LB incubado a 37° C por 12-18 h. A seguir, estas placas foram incubadas a 37° C por 18 h.

As amostras bacterianas quando tratadas com dipiridil, foram inoculadas em erlenmeyres com 50 ml de meio LB e, a seguir, incubadas com agitação (150 rpm) a 37° C por 12-18 h. Após este procedimento, a cultura bacteriana foi centrifugada a 3000 1400 g por 10 min., o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensionado em 10 ml de meio LB. Este volume foi dividido entre 2 erlenmeyers contendo 50 ml de LB e 50 ml de LB suplementado com 200 uM de dipiridil, respectivamente, e os mesmos, incubados sob agitação a 37° C por 4 h.

As culturas foram centrifugadas e ressuspensionadas em 10 ml de tampão Tris HCl 3,3 mM pH 7,4 gelado. Esta suspensão bacteriana foi homogeneizada em OmniMixer (Sorval) por 1 min., na velocidade 4, em banho de gelo e a seguir, foi centrifugada a 8000 g a 4° C por 5 min.. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 10 ml de tampão Tris HCl 0,1 M-EDTA 10 mM pH 7,2 gelado. Esta suspensão foi centrifugada a 8000 g a 4° C por 5 min. e o precipitado obtido ressuspensionado em 10 ml de Tris HCl 0,1 M ; MgCl₂ 10 mM pH 7,2.

A suspensão bacteriana, foi então centrifugada e o precipitado ressuspensionado em 10 ml de tampão glicina sacarose pH 9,2 suplementado com lisozima 0,1 mg/ml. Após 30 min. em banho de gelo, a suspensão bacteriana foi sonicada por 4 ciclos de 30 seg. a 20 Hz, 70-90 W. Este

procedimento foi sempre realizado em banho de gelo com intervalos de 1 min. entre cada ciclo de sonicação.

Após o processo de sonicação, a suspensão foi centrifugada por 8000 g por 5 min. e o sobrenadante transferido para tubos limpos os quais foram novamente centrifugados a 37000 g por 20 min.. O sedimento obtido foi ressuspendido em 10 ml de tampão Tris HCL 3,3 mM pH 7,4 e centrifugado nas mesmas condições.

As proteínas de membrana obtidas, após a centrifugação, foram ressuspendidas em 400 ul de tampão Tris HCL 85 mM pH 6,8, solubilizadas com 100 ul de Triton X 100 a uma concentração de 10% e a seguir transferidas para tubos de Eppendorff. Estes tubos foram agitados por 20 min. à temperatura ambiente e centrifugados a 12000 g por 5 min.. O sobrenadante foi recuperado e 500 ul de tampão de tratamento 2x foi adicionado ao mesmo. A solução obtida foi fervida por 5 min. em banho maria e a seguir mantida a -20° C.

O volume de proteína aplicado no gel de poliacrilamida-SDS variou de 5 ul a 30 ul para as diferentes amostras.

3.23 ELETROFORESE DE PROTEINAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS.

As eletroforeses de proteínas totais e de membrana foram realizadas utilizando-se sistema descontínuo dissociante de Laemli (1970). A montagem do gel seguiu as especificações do "Hoefer Electroforesis Catalog and Exercises (1990-1991)".

A montagem do gel de separação (10%) e de empacotamento (4%) seguiu a tabela 4.

TABELA 4. Soluções para gel de Poliacrilamida-SDS.

	Gel de Separação	Gel de Empacotamento
	10 % T , 2,7 % C	4 % de T , 2,7 % C
Solução de Monômero	20 ml	2,66 ml
Tris-HCl (1,5 M) pH 8,8	15 ml	-
Tris-HCl (0,5 M) pH 6,8	-	5,0 ml
SDS 10 %	0,6 ml	0,2 ml
H ₂ O	24,1 ml	12,2 ml
Persulfato de Amônio	300 ul	100 ul
TEMED	20 ul	10 ul

A amperagem aplicada para a realização da corrida de eletroforese de proteínas foi de 10-15 mA/gel por um período de 10-12 h até o azul de bromofenol atingir o final do gel de separação.

3.24 COLORAÇÃO DE GÉIS DE PROTEÍNAS TOTAIS COM COOMASSIE BLUE

A coloração de géis de proteínas totais com Coomassie Blue seguiu a metodologia descrita no "Hoefer Electroforesis Catalog and Exercises (1990-1991)".

Após a corrida, o gel de poliacrilamida-SDS foi colocado em um recipiente com solução corante de Coomassie Blue e mantido na mesma por 12-18 h sob agitação ocasional. Após este período de tempo, a solução de coloração foi removida e o gel imerso na solução de descoloração I e mantido sob agitação constante por 1 hora. A seguir, a solução de descoloração I foi trocada pela solução de descoloração II e o gel permaneceu sob agitação constante durante aproximadamente 2 h. O procedimento foi repetido com a solução de descoloração II até a completa remoção da coloração de fundo existente no gel de poliacrilamida-SDS.

3.25 IMPREGNAÇÃO DOS GÉIS DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA COM PRATA

A impregnação por prata das proteínas de membrana seguiu as especificações descritas por Blum et al. (1987).

A sequência da técnica de impregnação por prata encontra-se na tabela 5. Os tempos em cada solução foram mantidos estritamente e a revelação interrompida quando todas as bandas tornaram-se bem visíveis. O gel foi mantido sob constante agitação durante todos os passos da impregnação por prata.

TABELA 5. Soluções para impregnação com prata.

Soluções	Tempo
Fixador	> 1 hora
Etanol 50 %	3x de 20 seg.
Tiossulfato de Sódio 0,02 %	1 min.
H ₂ O destilada	3x de 20 seg.
Nitrato de Prata 0,2 %	20 min.
H ₂ O destilada	2x de 20 seg.
Solução Reveladora	+/- 10 min.
H ₂ O destilada	2x de 2 min.
Solução "Stop"	10 min.
Metanol 50 %	> 20 min.

3.26 SECAGEM DOS GÉIS DE POLIACRILAMIDA-SDS

Para secagem e preservação, o gel foi removido da solução de metanol 50 %, mantido num recipiente com metanol 30 % por 30 min. e a seguir, mantido em um recipiente com glicerol 3 % por mais 30 min..

Após este procedimento, o gel foi colocado entre duas folhas de papel celofane, apoiado sobre uma placa de vidro e mantido à temperatura ambiente por 3 a 4 dias até completa secagem.

4. RESULTADOS

4.1 TESTE DE PATOGENICIDADE

Os resultados do teste de patogenicidade em pintos de um dia de idade, segundo a metodologia descrita no item 3.2, encontram-se na tabela 6. Das 17 amostras inoculadas, 3 (5, 6 e 14) foram consideradas não patogênicas, uma vez que inoculando-se um número elevado de bactérias ($> 10^{12}$ bact/ml), tais amostras mataram 1 ou 2 pintos no período de 4 dias.

A maioria das amostras foi considerada patogênica, matando de 3 a 4 pintos no período de observação. 3 amostras (3, 13 e 15) foram consideradas altamente patogênicas, uma vez que mataram todos os pintos inoculados, mesmo quando o nº de bactérias por inóculo foi pequeno ($< 10^7$ bact/ml).

TABELA 6 Teste de patogenicidade de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária em pintos de um dia de idade.

Amostras	nº de mortos/ nº de inoculados	UFC
1	3/4	$3,2 \cdot 10^8$
2	2/4	$1,6 \cdot 10^9$
3	4/4	$2,4 \cdot 10^7$
4	2/4	$3,2 \cdot 10^{10}$
5	1/5	$1,2 \cdot 10^{12}$
6	2/5	$4,2 \cdot 10^8$
7	3/4	$3,2 \cdot 10^8$
8	3/4	$7,2 \cdot 10^9$
9	4/4	$1,7 \cdot 10^9$
10	4/4	$3,0 \cdot 10^{11}$
11	4/4	$2,2 \cdot 10^{10}$
12	4/4	$2,0 \cdot 10^{12}$
13	5/5	$4,3 \cdot 10^6$
14	2/5	$8,6 \cdot 10^{11}$
15	4/5	$2,0 \cdot 10^7$
16	5/5	$1,8 \cdot 10^{10}$
17	3/4	$1,2 \cdot 10^9$

4.2 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE *E. coli* DE ORIGEM AVIARIA.

4.2.1 PRODUÇÃO DE TOXINAS STI, VT E LT; HEMOLISINA; AEROBACTIANA E CAPACIDADE DE INVASÃO.

Os resultados obtidos com os testes para produção de toxinas STI, VT e LT, hemolisina, aerobactina e capacidade de invasão verificada através do teste de Sèreny das amostras de *E. coli*, encontram-se na tabela 7.

Nenhuma das amostras bacterianas estudadas apresentou a produção de toxina termoestável STI, avaliada segundo a metodologia descrita no item 3.6.

A toxina VT (Verotoxina ou Shiga-Like Toxin) foi detectada somente em 3 amostras (3, 13 e 15) de *E. coli*.

A toxina termolábil LT, avaliada segundo a metodologia descrita no item 3.8 não foi detectada nas amostras bacterianas estudadas.

Nenhuma das amostras bacterianas estudadas apresentaram produção de hemolisina e aerobactina, segundo as metodologias descritas nos itens 3.9 e 3.11, respectivamente.

O teste de Sèreny, utilizado para caracterizar amostras enteroinvasivas foi negativo para as amostras testadas.

TABELA 7 Caracterização biológica de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária.

Amostras Bacterianas	Produção de Toxinas			H	A	TS	AD	IN
	STI	VT	LT					
1	-	-	-	-	-	-	+	-
2	-	-	-	-	-	-	+	-
3	-	+	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	ND	+	-
5	-	-	-	-	-	-	+	-
6	-	-	-	-	-	ND	+	+
7	-	-	-	-	-	ND	+	-
8	-	-	-	-	-	ND	+	+
9	-	-	-	-	-	ND	-	+
10	-	-	-	-	-	-	+	+
11	-	-	-	-	-	ND	-	-
12	-	-	-	-	-	ND	+	-
13	-	+	-	-	-	-	+	-
14	-	-	-	-	-	-	+	-
15	-	+	-	-	-	ND	+	-
16	-	-	-	-	-	ND	+	-
17	-	-	-	-	-	ND	-	-

ND= não determinado

TS= Teste de Sèreny

H= Hemolisina

AD= Adesão

A= Aerobactina

I= Invasão

4.2.2 PADRAO DE HEMAGLUTINAÇÃO

Os resultados do teste de hemaglutinação das amostras bacterianas ensaiadas com hemácias de carneiro, cavalo, boi, humano, coelho, galinha e cobaio encontram-se na tabela 8.

A maioria das amostras apresentaram hemaglutinação com eritrócitos de cobaio sem D-manose, indicando a possível ocorrência de fímbria tipo I.

Os meios de cultura agar glicose, meio mínimo e MINCA, foram os mais indicados para o cultivo de amostras bacterianas quando testadas com hemácias de animais na presença de D-manose, indicando a ocorrência de outros tipos de adesinas.

TABELA 8 Padrão de hemaglutinação de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária.

Amostras Cobaio Coelho Galinha Boi Carneiro Humano Cavalo
 Bacterianas S/M C/M

1	+	-	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-	-	MI
3	+	MI	-	-	-	-	-	-
4	+	-	AG	-	MI	MI	-	-
					AG			
5	+	-	MM	-	AG	MM	-	MM
			AG		MM,MI	MI		MI
6	+	MI	AG	AG	-	-	-	-
			V,T L,C	MM				
7	-	-	-	-	AG	-	-	-
					MI			
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	-	AG	-	-	-	-	-
			MM,L					
11	-	-	-	MM	MI	-	-	-
					AG,C			
12	+	-	AG	-	-	-	-	-
13	+	MI	AG	-	-	-	-	-
			MM					
14	+	MI	AG	-	MI	-	-	-
			V					
15	+	-	-	-	MI	-	-	-
16	+	-	-	-	-	-	-	-
17	+	-	AG	-	-	-	-	-
			T,L,C					

MM= Meio mínimo

MI= Minca

T= TSA

L= LA

AG= Agar glicose

V= Veal

C= CFA

4.2.3 RESISTENCIA SÉRICA

O teste de resistência sérica, segundo a metodologia descrita no item 3.12, permitiu a verificação da sensibilidade das amostras de *E. coli* de origem aviária ao soro de galinha.

Das 17 amostras estudadas quanto à resistência sérica, 5 (1, 9, 10, 11 e 16) foram altamente resistentes, quando comparadas com a amostra 13, sendo capazes de crescer no soro de galinha (Figura 1); 2 (2 e 6) foram sensíveis (Figura 2) e 7 (3, 4, 5, 7, 8, 12, 13, 14, 15 e 17) apresentaram resistência intermediária com uma queda no crescimento bacteriano após 1 h na presença do soro de galinha. (Figuras 3a. e 3b.).

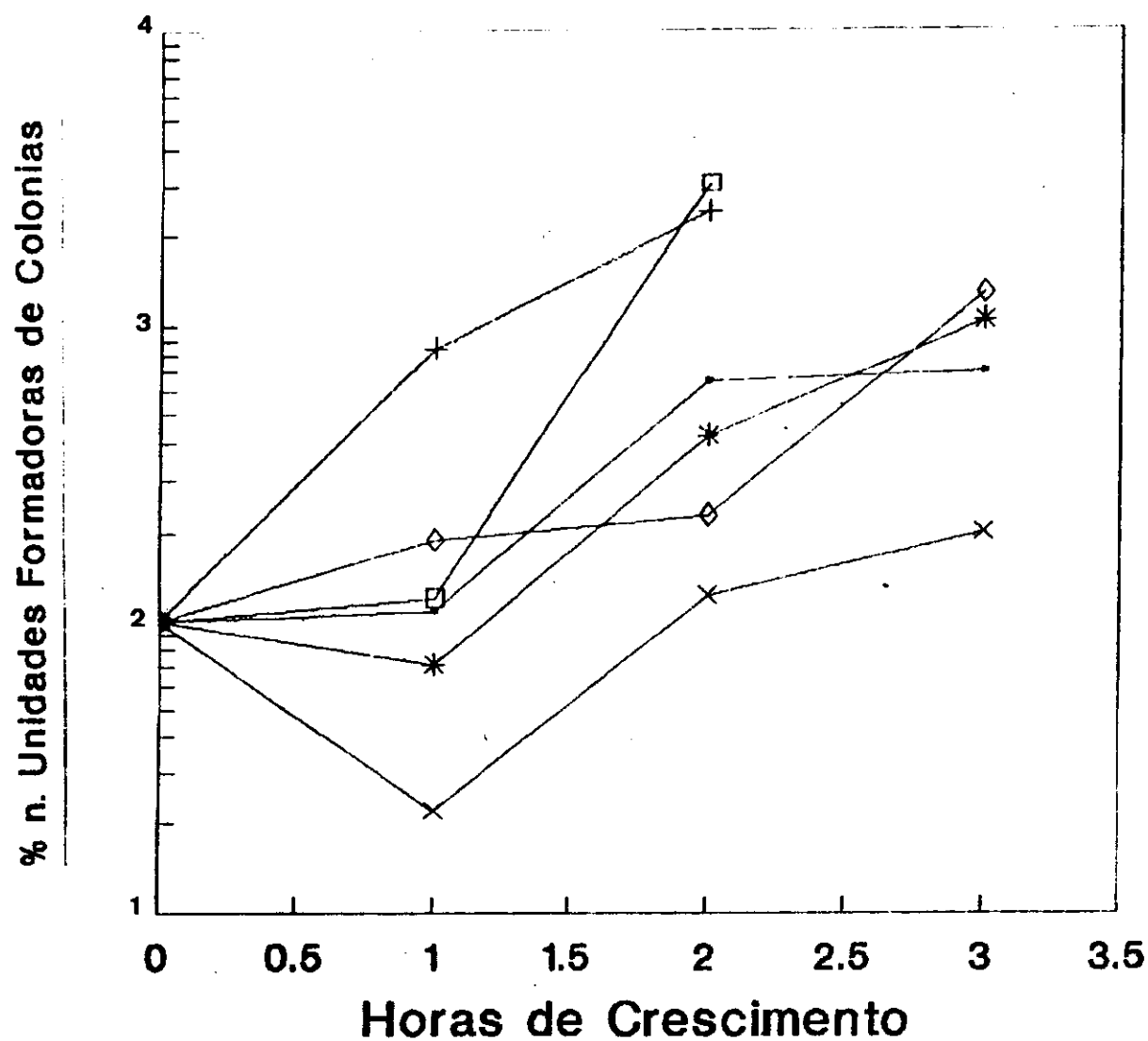


FIGURA 1 Curvas de resistência sérica das amostras de *Escherichia coli* de origem aviária altamente resistentes ao soro de galinha.

—●— 01

—+— 09

—*— 10

—□— 11

—x— 13

—◇— 16

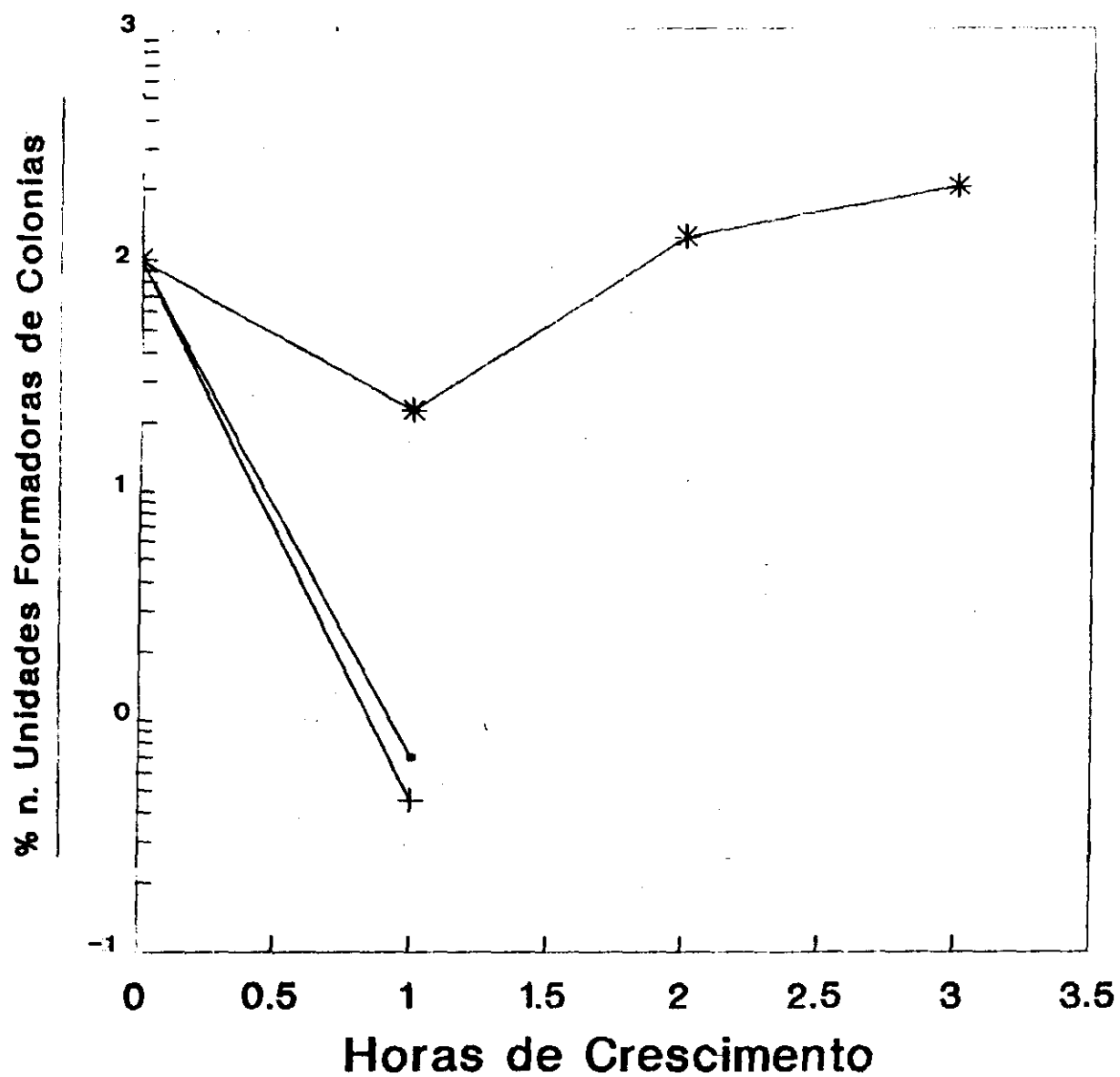


FIGURA 2 Curvas de resistência sérica das amostras e *Escherichia coli* de origem aviária sensíveis ao soro de galinha.

—•— 02 —+— 06 —*— 13

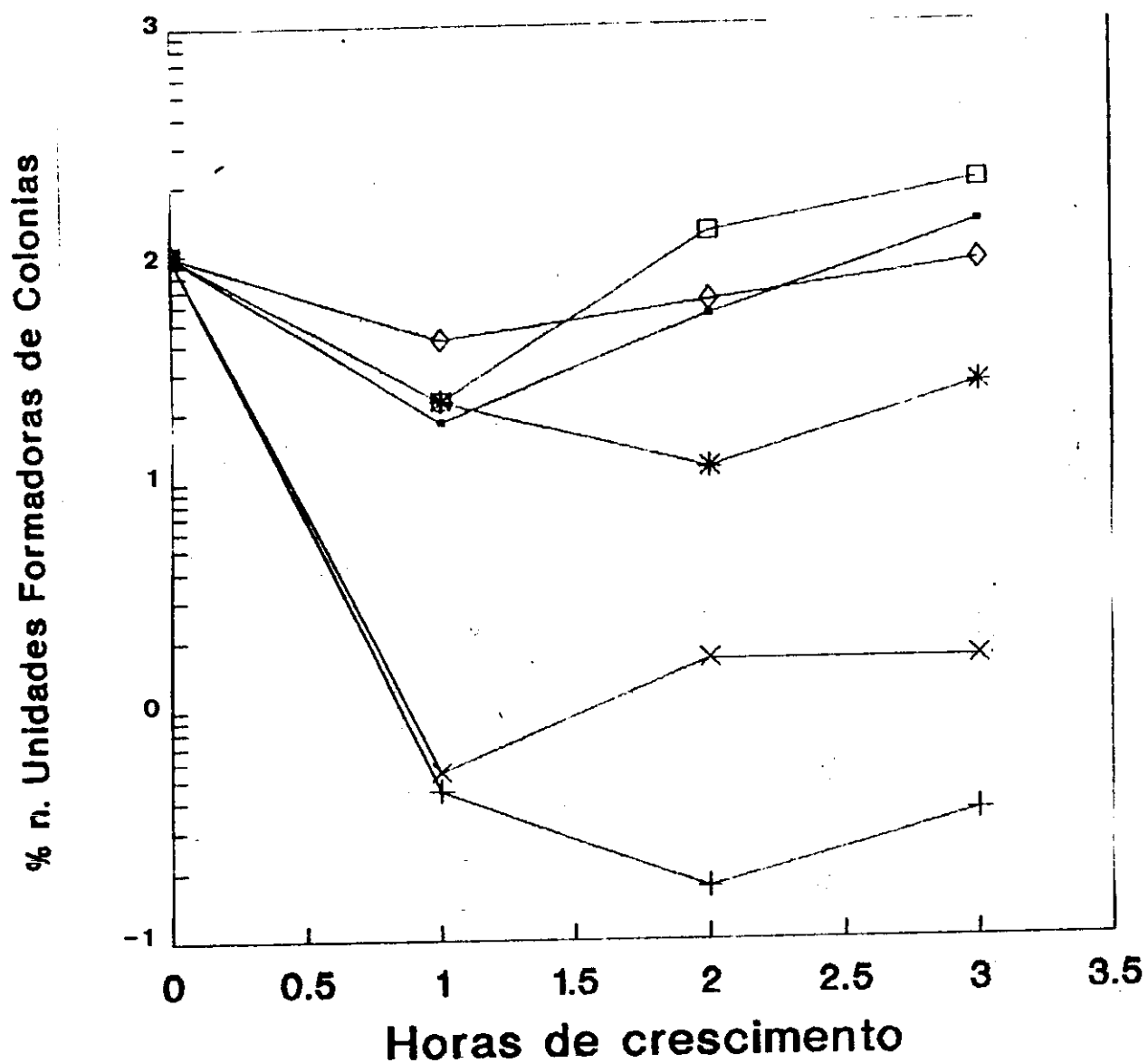


FIGURA 3a Curvas de resistência sérica das amostras de *Escherichia coli* de origem aviária com resistência intermediária ao soro de galinha.

—●— 03 —+— 04 —*— 12 —□— 13 —x— 14 —◇— 17

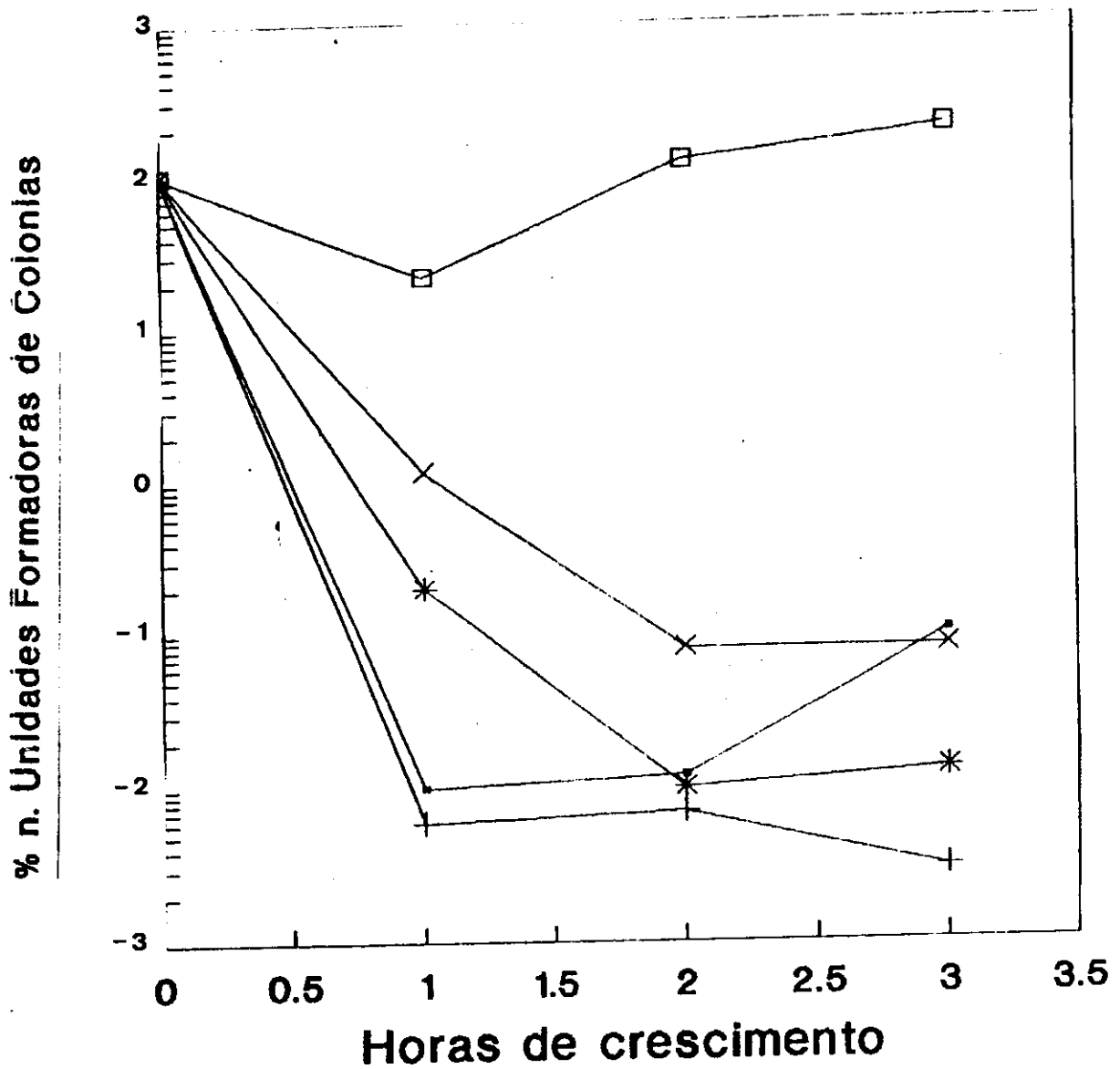


FIGURA 3b Curvas de resistência sérica das amostras de *Escherichia coli* de origem aviária com resistência intermediária ao soro de galinha.

—●— 06 —+— 07 —*— 08 —□— 13 —×— 15

4.2.4 ADESAO EM CÉLULAS HeLa

Das 17 amostras estudadas quanto ao padrão de adesão em células HeLa, 11 amostras apresentaram aderência e 6 amostras foram negativas quanto à adesão (Tabela 7).

A figura 4 indica a adesão em bactérias em células HeLa.

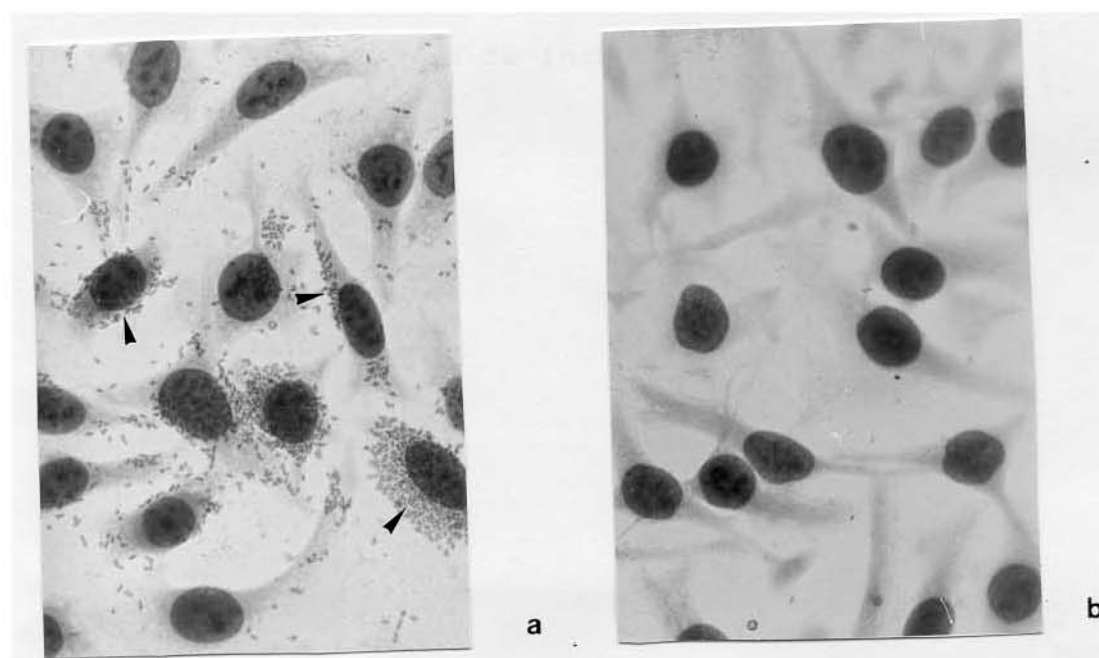


FIGURA 4 Teste de Adesão em Células HeLa

a: Adesão Positiva de *Escherichia coli* amostra 6

b: Adesão Negativa

Aumento 1.800 X.

4.2.5 INVASÃO EM CÉLULAS HeLa

Das 17 amostras bacterianas estudadas quanto a capacidade de invasão em células HeLa apenas 4 amostras (6, 8, 9 e 10) apresentaram capacidade de invasão (Tabela 7).

A figura 5 indica a invasão de bactérias em células HeLa, após 3 h de incubação a 37° C.



FIGURA 5 Invasão de *Escherichia coli* (amostra 10) em Células HeLa.

Aumento 7.200 X.

4.2.6 RESISTENCIA A DROGAS ANTIMICROBIANAS

Os resultados de resistência à drogas antimicrobianas das diferentes amostras bacterianas ensaiadas segundo a metodologia descrita no item 3.14, encontram-se na tabela 9.

Os valores numéricos indicados na tabela mostram a concentração máxima do antibiótico que ainda permitiu o crescimento da amostra bacteriana.

Das 17 amostras estudadas 5 (1, 2, 7, 8 e 10) foram sensíveis às drogas ensaiadas. Resistência múltipla foi encontrada em 4 amostras (3, 13, 16 e 17), sendo que a resistência à Tc e à Cm foram mais frequentes.

TABELA 9 Nível de resistência às drogas antimicrobianas das amostras bacterianas de origem aviária.

Amostras Bacterianas	Antibióticos					
	Ap	Cm	Km	Sm	Tc	Nal
1	s	s	s	s	s	s
2	s	s	s	s	s	s
3	s	100	s	s	50	s
4	s	s	s	s	100	s
5	s	s	s	s	100	s
6	s	200	s	s	s	s
7	s	s	s	s	s	s
8	s	s	s	s	s	s
9	s	100	s	s	s	s
10	s	s	s	s	s	s
11	s	200	s	s	s	s
12	s	s	s	s	100	s
13	350	s	s	100	50	s
14	s	s	s	s	50	s
15	s	s	s	s	50	s
16	350	100	s	s	100	s
17	1000	s	s	s	100	s

s= sensível a concentração menor que 5 ug/ml.

4.2.7 PRODUÇÃO DE COLICINAS

Das 17 amostras testadas, 11 foram produtoras de colicinas (tabela 10) as quais foram caracterizadas pelas amostras indicadoras segundo a metodologia descrita no item 3.15.

TABELA 10 Produção de colicinas pelas amostras bacterianas de origem aviária frente às indicadoras de colicinas.

Amostras Bacterianas	Amostras Indicadoras*									Tipo de Colicinas
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
1	+	+	+	+	+	-	-	+	+	E1 e E3
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	-	?	+	+	E1 e E3
4	+	-	+	+	+	-	-	+	+	Ia, Ib, V e E1
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	-	-	+	+	-	+	+	+	Ia, Ib e V
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	-	-	+	+	E1 e E3
10	+	+	+	+	-	-	-	-	-	E3, Ia e Ib
11	+	+	+	+	+	-	+	+	+	E3
12	+	+	+	+	-	-	-	-	-	E1 , E2 E3 e B
13	+	-	-	-	+	-	+	+	+	Ia, Ib e V
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	+	+	+	+	-	-	+	+	Ia, Ib e V
16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17	+	-	+	+	+	+	-	+	+	E1 e E3

ND= não determinado

+ = produção de halo de inibição frente à amostra indicadora

- = não produção de halo de inibição frente à amostra indicadora

* A. 22R80

D. 22R83

G. 20R675

B. 22R81

E. 20R914

H. 20R676

C. 22R82

F. 20R915

I. 20R996

4.2.8 VISUALIZAÇÃO DE FIMBRIAS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA

A microscopia eletrônica permitiu a visualização de estruturas semelhantes a fimbrias nas amostras 3, 5, 6, 10, 12, 13, 15, 16 e 17 quando crescidas em meio sólido e incubadas a 37° C, sendo que as amostras 1, 2, 4, 7, 8, 9, 11 e 14 não apresentaram tais estruturas quando incubadas nas mesmas condições.

As amostras 3, 6, 12 e 13 quando incubadas a 16° C deixaram de expressar as fimbrias que estavam presentes a 37° C e as amostras 5 e 6 mantiveram a expressão das fimbrias tanto a 37° C quanto a 16° C.

A figura 6 indica a presença de estruturas semelhantes à fimbrias na amostra 5, quando crescida a 37° C em meio sólido.

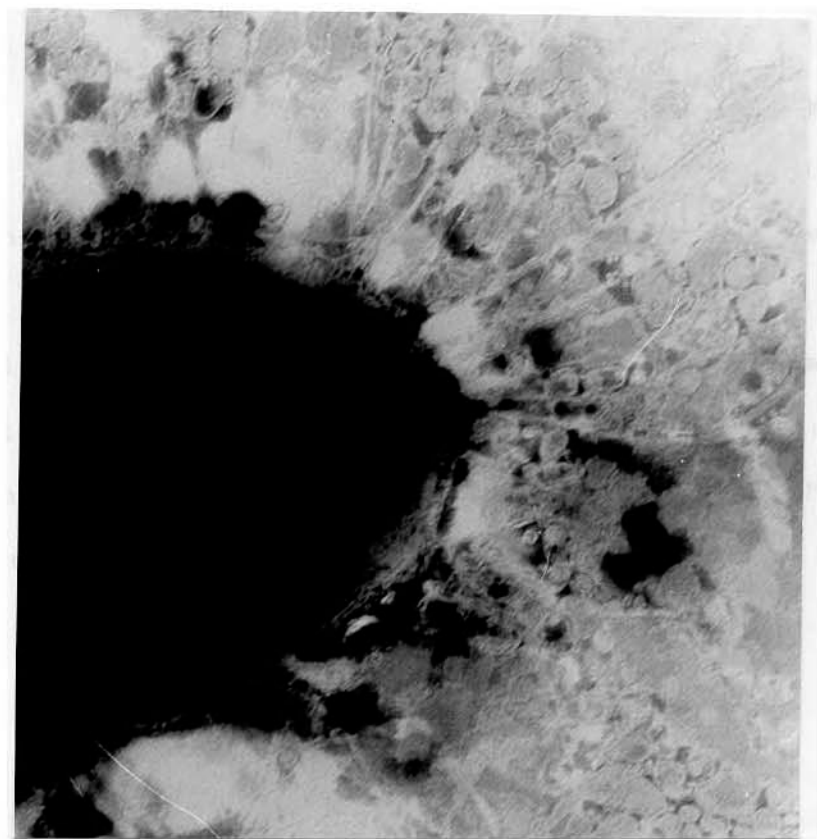


FIGURA 6 Micrografia eletrônica de *Escherichia coli* (amostra 5) crescida a 37° C em coloração negativa com PTA.

f= fimbria

Aumento 50.000 X.

4.3 CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA DAS AMOSTRAS DE *E. coli* DE ORIGEM AVIÁRIA.

4.3.1 PERFIL ELETROFORÉTICO DE DNA PLASMIDIAL

A análise do perfil plasmidial das amostras de *E. coli* de origem aviária, segundo a metodologia descrita nos itens 3.16 e 3.17, encontra-se nas Figuras 7 e 8.

Com exceção da amostra 6, que não apresentou plasmídios e das amostras R2 e 11 que apresentaram apenas plasmídios de baixo Peso Molecular, as demais amostras bacterianas apresentaram plasmídios de alto Peso Molecular e de baixo Peso Molecular, variando entre 56,2 e 0,75 Md (Tabela 11).

TABELA 11 Pesos moleculares dos plasmídios das amostras de *Escherichia coli* de origem aviária.

Amostras	Plasmídios	
	Alto P.M. (Md)	Baixo P.M. (Md)
1	49,5	3,88
2	48,3	7,8; 1,7 e 1,1
3	53,4; 50,7 e 44,8	7,4; 4,4 e 1,4
4	56,1	
5	56,2 e 46,9	5,07 e 1,4
6		
7	53,4 e 49,5	4,4 e 1,9
8	45,9	7,8; 5,2 e 0,75
9	53,4	3,5; 2,1 e 1,4
10	54,9	
11		12,8; 3,5; 2,1 e 1,4
12	56,2; 52,5 e 46,9	4,4
13	56,2; 46,9 e 43,8	5,07 e 1,42
14	56,2; 46,9	5,07 e 1,42
15	56,2; 46,9	5,07 e 1,42
16	54,9; 51,4 e 29,1	5,07; 1,5 e 1,2
17	52,1; 40,5 e 37,6	12,2; 5,2; 1,8 e 0,9

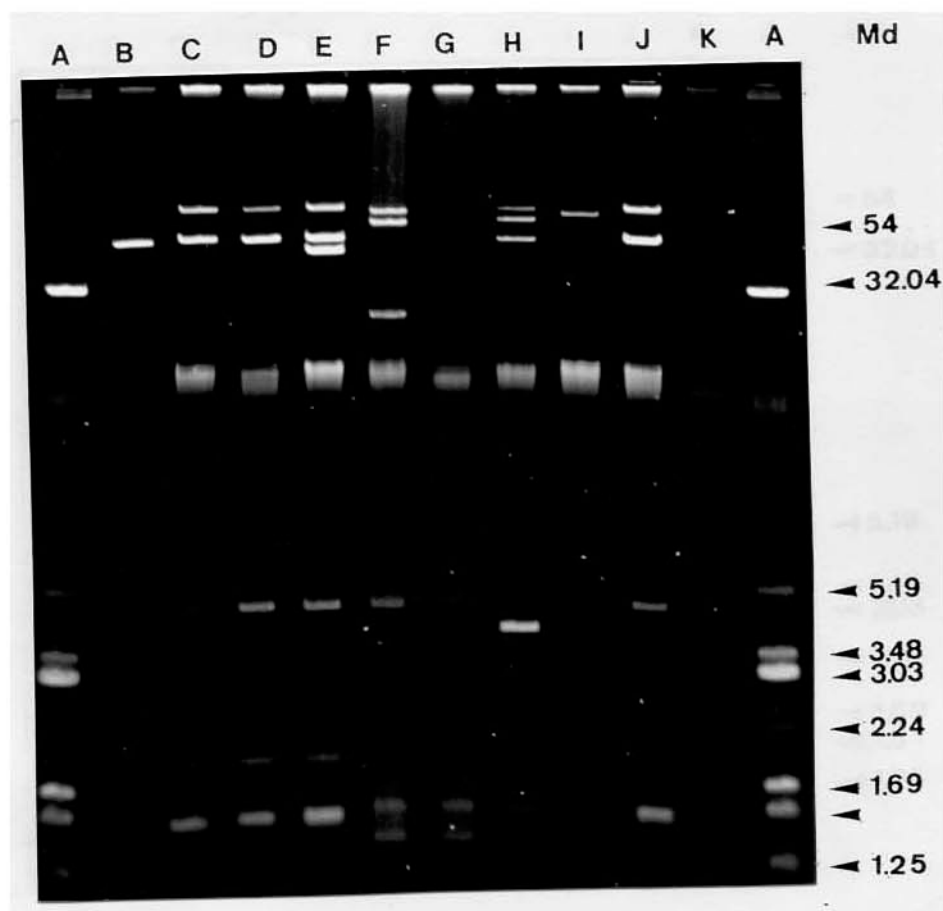


FIGURA 7 Perfil eletroforético de DNA plasmidial das amostras de *Escherichia coli* de origem aviária em gel de agarose 0.6 %.

A. V 517

E. 13

I. 10

B. p 307

F. 16

J. 5

C. 15

G. R2

K. 6

D. 14

H. 12

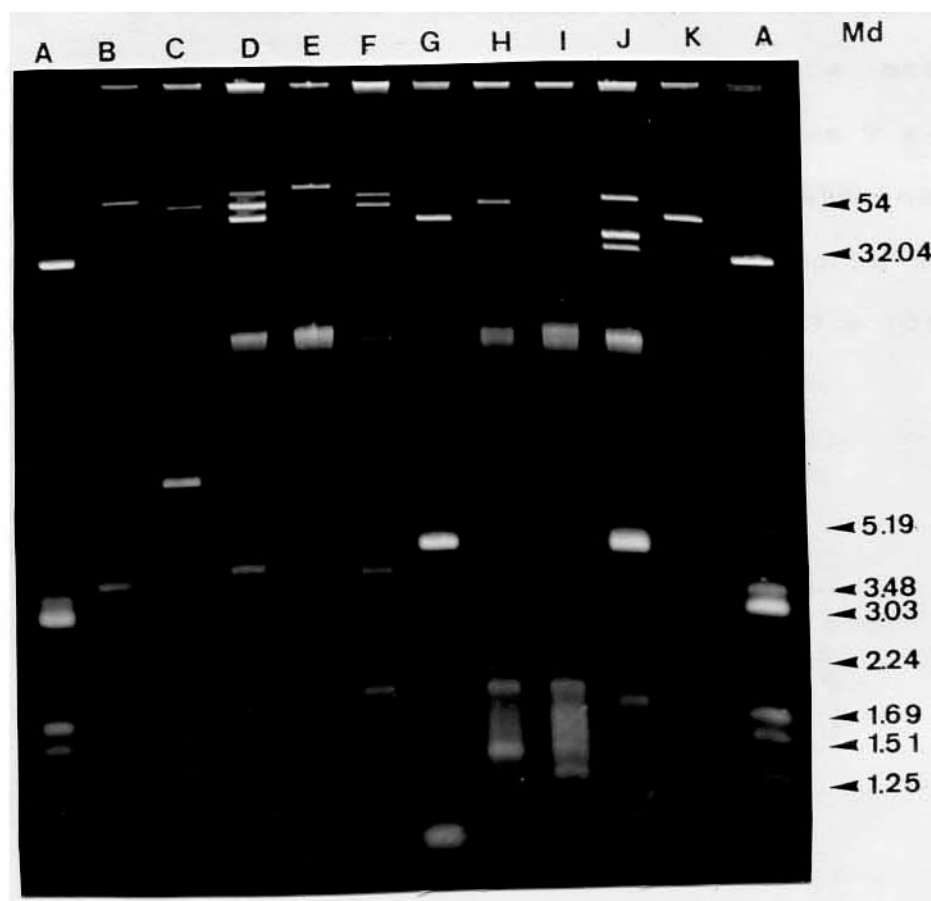


FIGURA 8 Perfil eletroforético de DNA plasmidial das amostras de *Escherichia coli* de origem aviária em gel de agarose 0.6 %.

A. V517

B. 1

C. 2

D. 3

E. 4

F. 7

G. 8

H. 9

I. 11

J. 17

K. p 307

4.3.2 PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS TOTAIS

A análise dos resultados de extração de proteínas totais das amostras de *E. coli*, segundo a metodologia descrita nos ítem 3.21, encontra-se nas Figuras 9 e 10.

Na preparação de proteínas totais não foram visualizadas diferenças significativas no padrão de bandas de proteínas das amostras estudadas (Figuras 9 e 10).

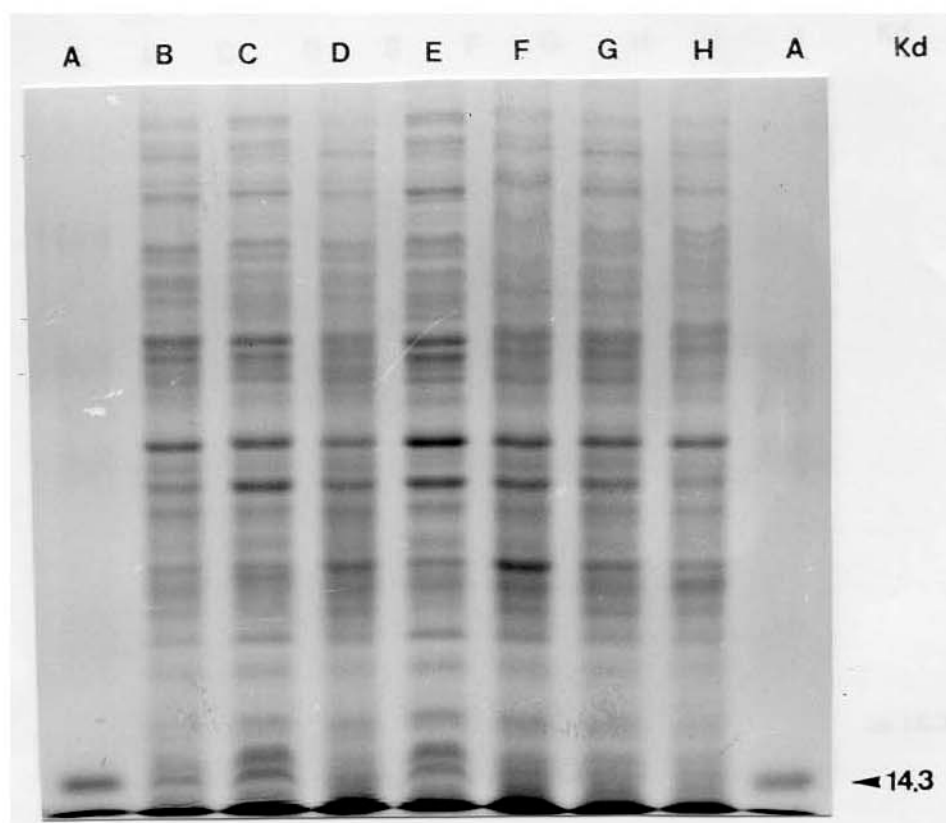


FIGURA 9 Perfil eletroforético de proteínas totais das amostras de *Escherichia coli* de origem aviária em gel de Poliacrilamida-SDS 10 % corado com coomassie blue.

A. Padrão de P.M.

D. 12

G. 9

(Sigma SDS-70)

B. 13

E. 17

H. 1

C. 16

F. 11

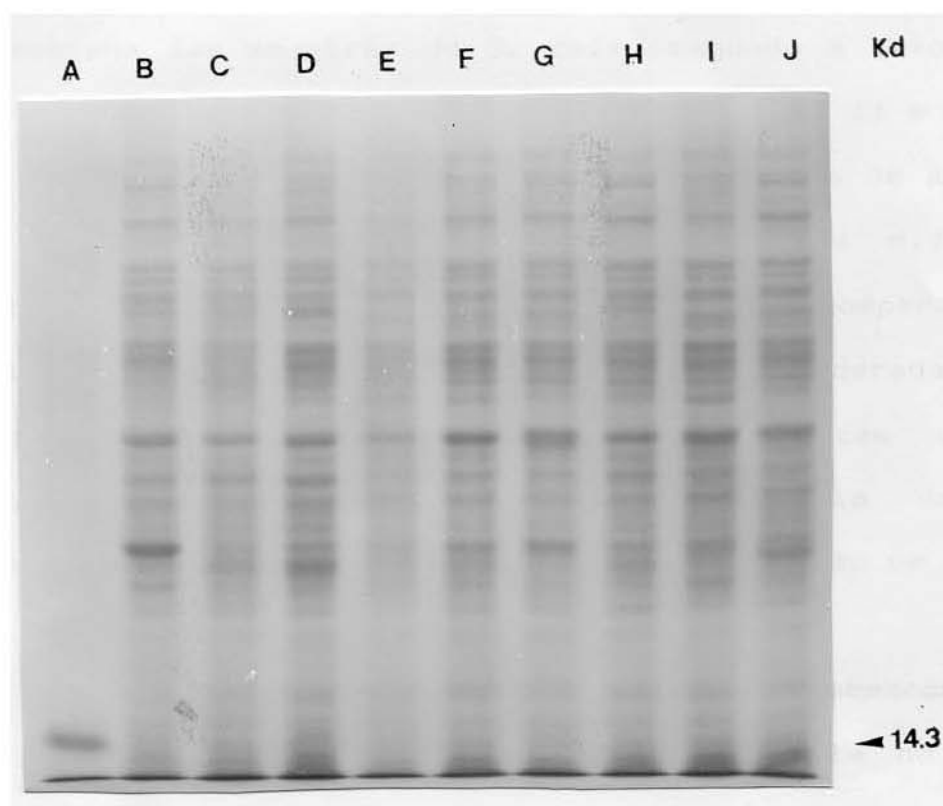


FIGURA 10 Perfil eletroforético de proteínas totais das amostras de *Escherichia coli* de origem aviária em gel de Poliacrilamida-SDS 10 % corado com coomassie blue.

A. Padrão de P.M.	E. 2	I. 6.
(Sigma SDS-70)		
B. 8	F. 14	J. 4
C. 3	G. 10	
D. 7	H. 7	

4.3.3 PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA

A análise dos resultados de extração de proteínas de membrana das amostras de *E. coli*, segundo a metodologia descrita nos ítem 3.22, encontra-se nas Figuras 11 e 12.

O perfil eletroforético das proteínas de membrana foi bastante semelhante quando comparamos as diferentes amostras de *E. coli* de origem aviária. A comparação do perfil eletroforético da amostra 13, considerada muito patogênica, com as amostras não patogênicas ou com patogenicidade diminuída indicou a ausência de duas proteínas de membrana cujos pesos moleculares são de 36,3 Kd e de 23,8 Kd respectivamente.

A amostra 9 possui uma proteína de membrana cujo peso molecular é de 37,6 Kd que está ausente no perfil eletroforético das proteínas de membrana da amostra 13 (Figura 11, canaleta G).

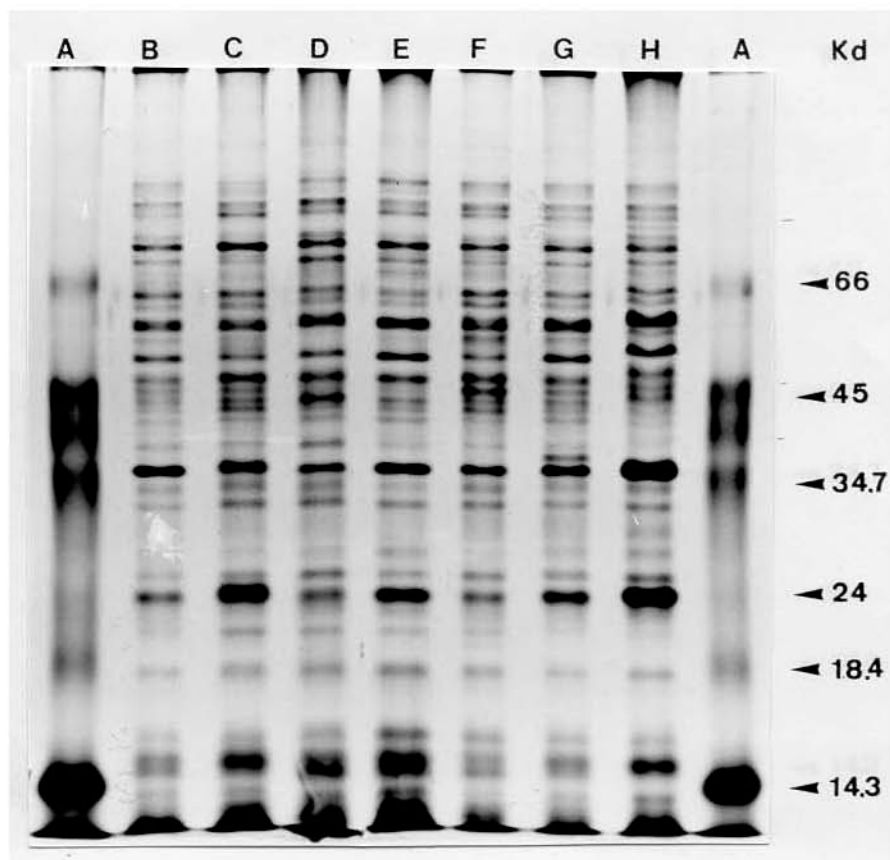


FIGURA 11 Perfil eletroforético de proteínas de membrana das amostras de *Escherichia coli* de origem aviária em gel de Poliacrilamida-SDS 10 % corado com prata.

A. Padrão de P.M.

D. 12

G. 9

(Sigma SDS-70)

B. 13

E. 17

H. 1

C. 16

F. 11

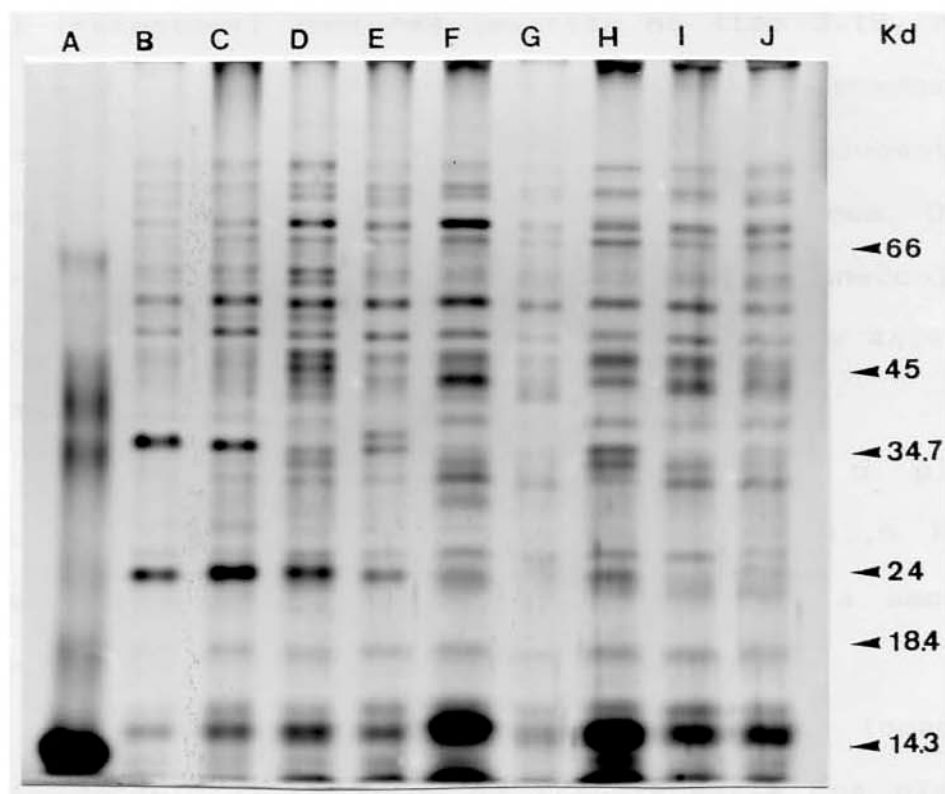


FIGURA 12 Perfil eletroforético de proteínas de membrana das amostras de *Escherichia coli* de origem aviária em gel de Poliacrilamida-SDS 10 % corado com prata.

A. Padrão de P.M.	E. 2	I. 6
(Sigma SDS-70)		
B. 8	F. 14	J. 4
C. 3	G. 10	
D. 7	H. 5	

4.4 TRANSFERENCIA DE PLASMÍDIOS ATRAVÉS DE CONJUGAÇÃO.

A conjugação entre as amostras 13 (doadora) e MS101 (receptora) conforme descrito no item 3.18, resultou na obtenção de transconjugantes selecionados para resistência a Ap (Figura 13). Os transconjugantes com resistência à Tc ou à TC e Ap não foram obtidos. O perfil eletroforético de DNA plasmidial dos transconjugantes (Figura 13) mostra que os plasmídios de 56,2 e 46,9 Md não foram transferidos através de conjugação.

A amostra 13/1, a qual possui o plasmídio responsável pela resistência a Ap (P.M.= 43,8 Md) foi transferido através de conjugação para a amostra 14 obtendo-se a amostra 14 col. 1 (Figura 14).

A conjugação entre as amostras 17 (doadora) e MS101 (receptora) resultou na transferência dos plasmídios de alto peso molecular com aproximadamente 60,2 e 46,3 Md obtendo-se os transconjugantes 17/1 e 17/2 (Figura 15).

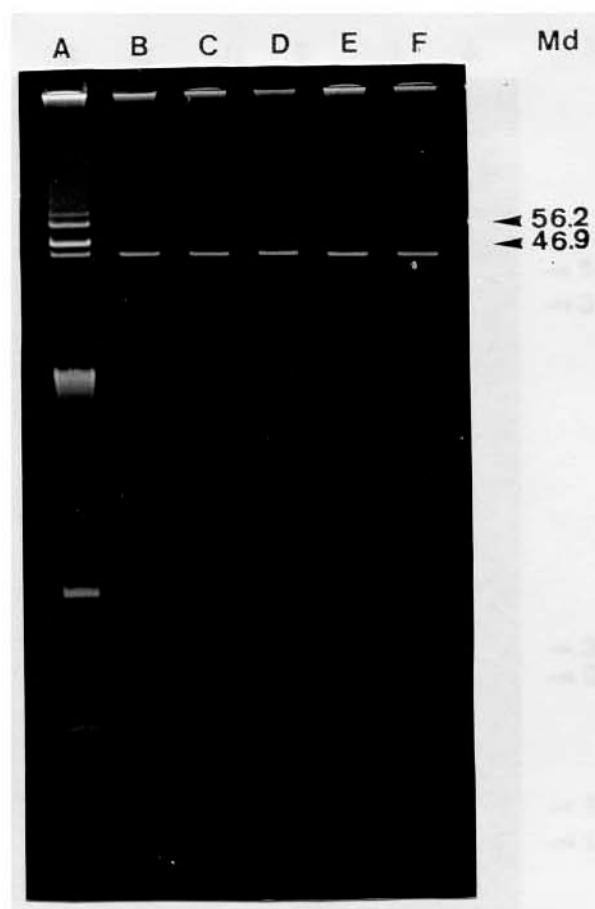


FIGURA 13 Perfil eletroforético de DNA plasmidial dos transconjugantes resistentes a Ap em gel de agarose 0,6 %.

A. 13

D. 13.10

B. 13.1

E. 13.15

C. 13.4

F. 13.21

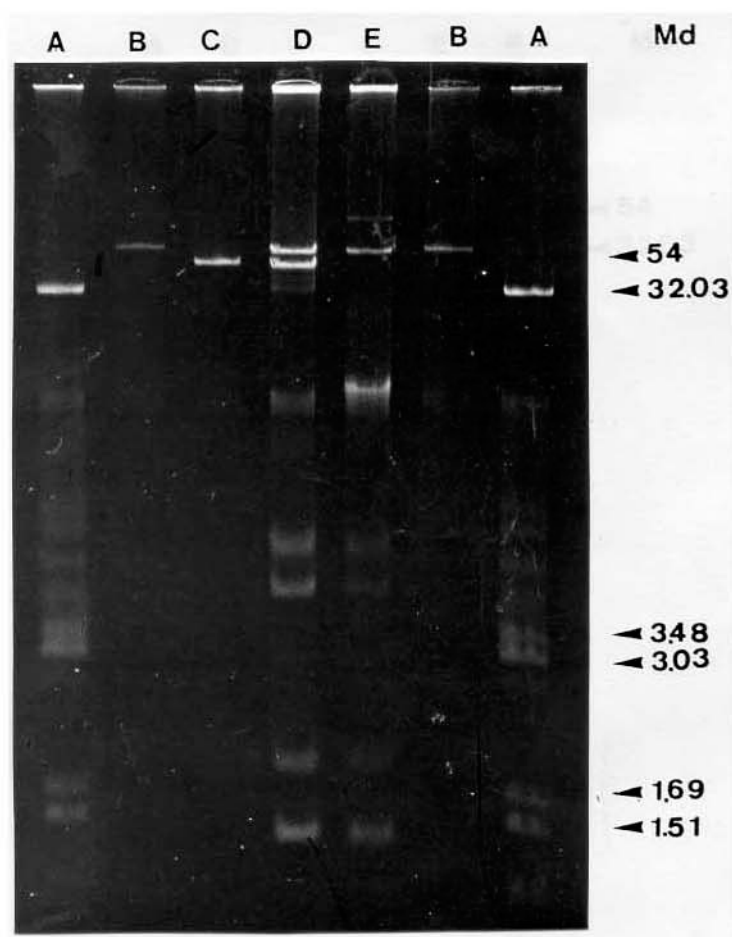


FIGURA 14 Perfil plasmidial dos transconjugantes em gel de agarose 0,6 %.

A. V 517

D. 14 col: 1

B. p 307

E. 14

C. 13.1

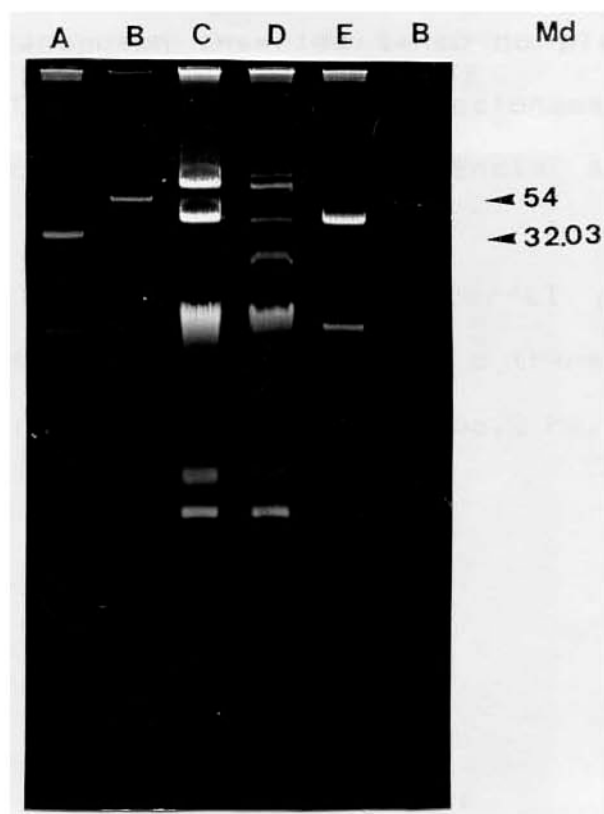


FIGURA 15 Perfil plasmidial dos transconjugantes resultantes da conjugação 17//MS101 em gel de agarose 0,6 %.

A. V 517

D. 17

B. p 307

E. 17/2

C. 17/1

4.5 MUTAÇÃO COM Tnpho A

A conjugação entre as amostras 13 (receptora) e SM10 pir (doadora), resultou na obtenção de amostras que tiveram o transposon inserido tanto no plasmídeo quanto no cromossomo. Tais amostras foram selecionadas através de duas características associadas: resistência à Km e colônias azuis.

A Figura 16 mostra o perfil plasmidial de um mutante resistente à Km o qual teve o transposon inserido no plasmídeo cujo peso molecular é de 56,2 Md.

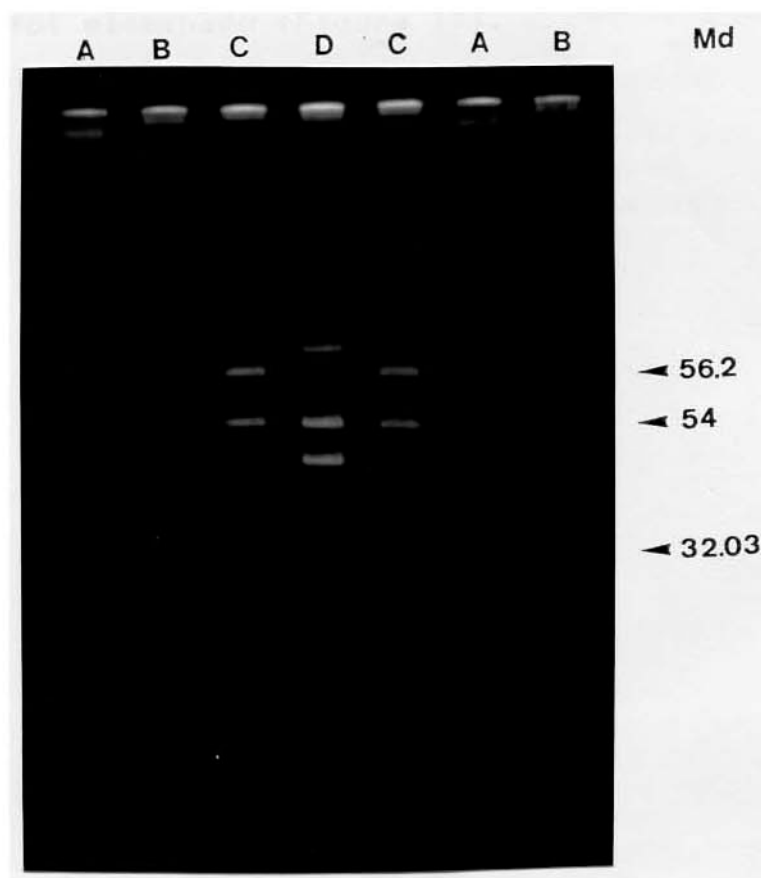


FIGURA 16 Perfil eletroforético de DNA plasmidial em gel de agarose 0,4 %.

A. V517

C. 13

B. p307

D. 13T16

4.6 CURA DE PLASMÍDIOS COM SDS 10%

A amostra 13, tratada com SDS segundo a metodologia descrita no item 3.20, resultou na obtenção de um mutante (13/3) cujo plasmídeo com alto peso molecular de 56,25 Md foi eliminado (Figura 17).

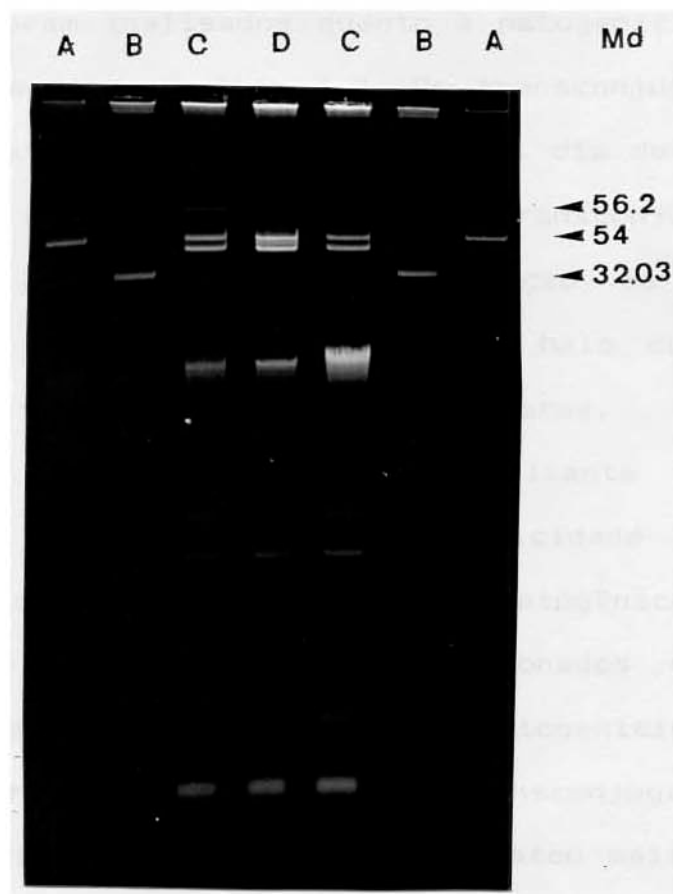


FIGURA 17 Perfil eletroforético do DNA plasmidial em gel de agarose 0,6 %.

A. p307

C. 13

B. V517

D. 13/3

4.7 ANALISE DAS CARACTERISTICAS BIOLOGICAS DOS TRANSCONJUGANTES

Os transconjugantes obtidos na conjugação 13//MS101 foram analisados quanto à patogenicidade, segundo o método descrito no item 3.2. Os transconjugantes obtidos não foram patogênicos para pintos de 1 dia de idade durante o período de observação. Estes transconjugantes foram submetidos ao teste para verificação da produção de colicinas e nenhum deles apresentou halo de inibição de crescimento frente as amostras indicadoras.

A amostra 14 col. 1 resultante da conjugação 14//13.1 foi testada quanto à patogenicidade em pintos de 1 dia de idade e tal amostra não foi patogênica.

Os transconjugantes selecionados da conjugação 17//MS101 foram analisados quanto à patogenicidade segundo o método descrito no item 3.2. O transconjugante 17/1 foi considerado patogênico, uma vez que matou mais que a metade dos pintos durante o período de observação ($DL_{50} = 3.10^{10}$) quando comparado com a amostras receptora não patogênica. O transconjugante 17/2 não matou os pintos durante o período de observação. O transconjugante 17/1 apresentou halo de inibição frente às amostras indicadoras de colicinas sendo considerado produtor de colicinas E_1 , E_2 e V e o transconjugante 17/2 não apresentou halo de inibição. Esses

transconjugantes apresentaram resistência sérica intermediária (Figura 18).

Os transconjugantes obtidos na conjugação 13 e SM10 pir (pRT 733:: Tnp^{ho} A) testados quanto à patogenicidade em pintos de um dia de idade mostraram-se altamente patogênicos com exceção de duas amostras, 13T16 e 13T19, os quais não mataram os pintos durante o período de observação. A amostra 13T16 produziu colicinas Ia, Ib, V, K, B e E₂ quando testada frente às indicadoras. Alguns mutantes foram ensaiados quanto à capacidade de adesão em células HeLa e duas amostras apresentaram adesão (amostras 13T17 e 13T19).

O perfil eletroforético das proteínas de membrana dos transconjugantes (Figura 20) mostram que os mutantes 13T16 e 13T19 não apresentaram as proteínas de membrana com peso molecular de 36,3 e 23,8 Kd quando comparadas com a amostra 13 e os demais mutantes.

A amostra 13/3, a qual teve o plasmídio de alto peso molecular (56,2 Md) eliminado pelo tratamento com SDS, e quando inoculada subcutaneamente em pintos de um dia de idade apresentou-se altamente patogênica (DL 50 = $8 \cdot 10^7$), produtora de colicinas frente às amostras indicadoras e quanto testada quanto à produção de toxina em teste de alça ligada de coelho mostrou-se positiva. No perfil eletroforético de proteínas de membrana a amostra 13/3 expressa 3 proteínas de membrana com peso molecular de 33,3;

23,3 e 16,1 Kd, respectivamente, as quais não estão presentes na amostra 13 (Figura 20).

As amostras 13, 17 e seus respectivos mutantes foram analisadas quanto ao perfil eletroforético das proteínas de membranas quando tais amostras foram crescidas em meio LB acrescentado com 200 μ M de - dipiridil (Figuras 21 e 22).

Os mutantes da amostra 13 foram ensaiados quanto a resistência sérica, segundo descrito no item 3.12. Desta maneira, a amostra 13T16 foi altamente resistente ao soro de galinha, a amostra 13/3 apresentou uma resistência intermediária com crescimento bacteriano no soro após 3 h porém inferior ao da amostra 13 (Figura 19).

A figura 21 mostra que o perfil eletroforético de proteínas de membrana das amostras crescidas em meio LB contendo - dipiridil apresenta diferenças quando comparado com o perfil eletroforético de proteínas de membrana das amostras crescidas em meio LB sem o quelante de Fe. A amostra 13 quando submetida ao tratamento com dipiridil passou a expressar 3 proteínas de membrana cujo pesos moleculares são de 75,5; 52,2 e 50,5 Kd, respectivamente, sendo que tais proteínas não estão presentes na mesma amostra sem tratamento. O mutante 13/3, que teve seu plasmídio eliminado pelo tratamento com SDS 10 %, quando crescido em meio LB contendo dipiridil deixou de expressar a proteína de membrana cujo peso molecular é de 75,5 Kd e manteve a

expressão das outras 2 proteínas de membrana presentes na amostra 13. O mutante 13T16 crescido em meio LB contendo dipiridil expressou as 3 proteínas de membrana presentes na amostra 13.

A figura 22 mostra as diferenças entre os perfis eletroforéticos das proteínas de membranas das amostras 17, 17/1 e 17/2 crescidas em meio LB contendo dipiridil e sem dipiridil. A amostra 17 quando tratada com dipiridil expressa 2 proteínas de membranas cujos pesos moleculares são de 77,5 e 38,8 Kd que não estão presentes na mesma amostra crescida em LB sem o quelante de Fe. Para as amostras 17/1 e 17/2 não foram verificadas alterações nos perfis eletroforéticos de proteínas de membrana.

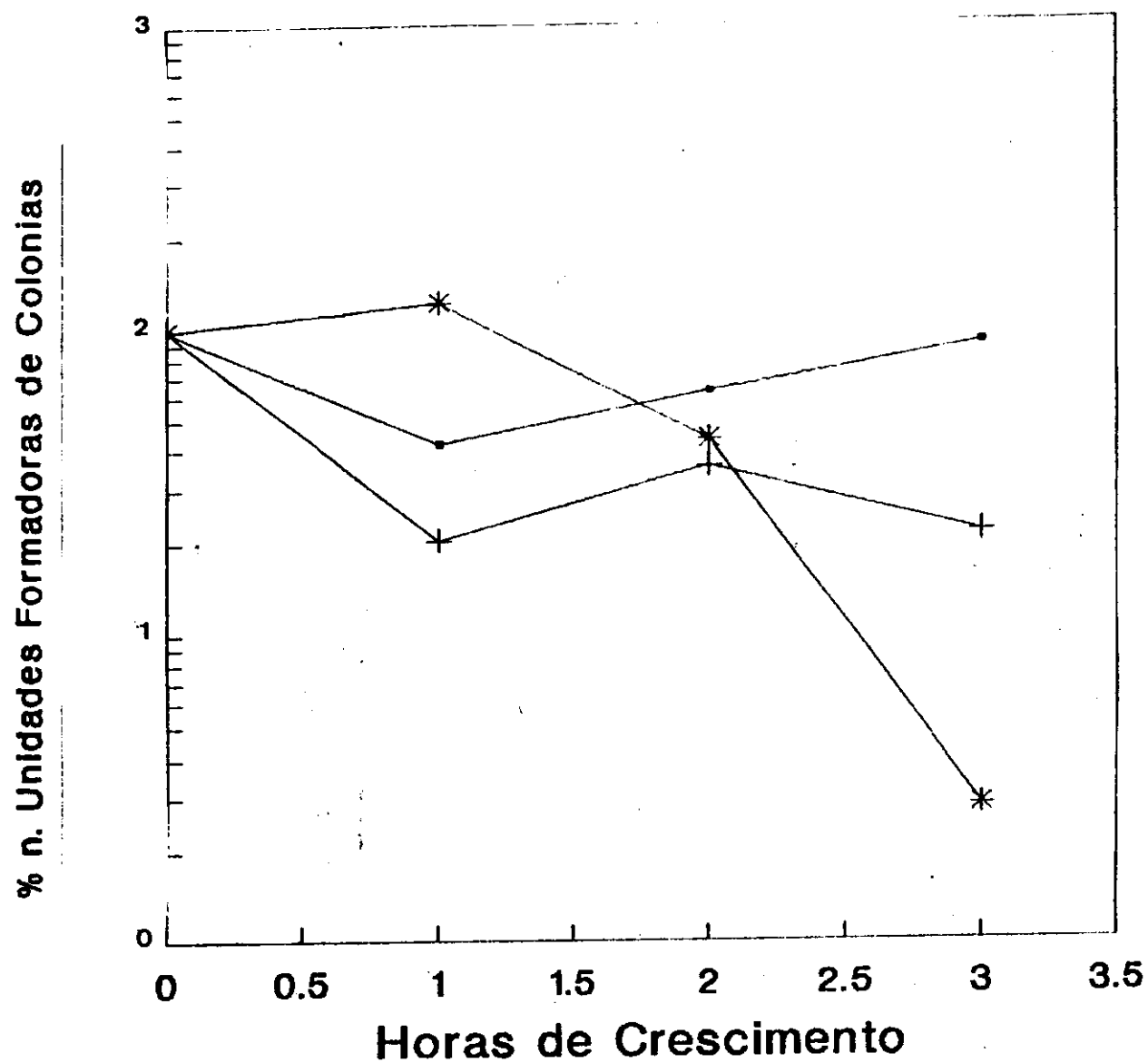


FIGURA 1B Curvas de Resistência Sérica dos Tranconjugantes Resultantes da Conjugação 17/MSJ01.

—●— 17 —+— 17/1 —*— 17/2

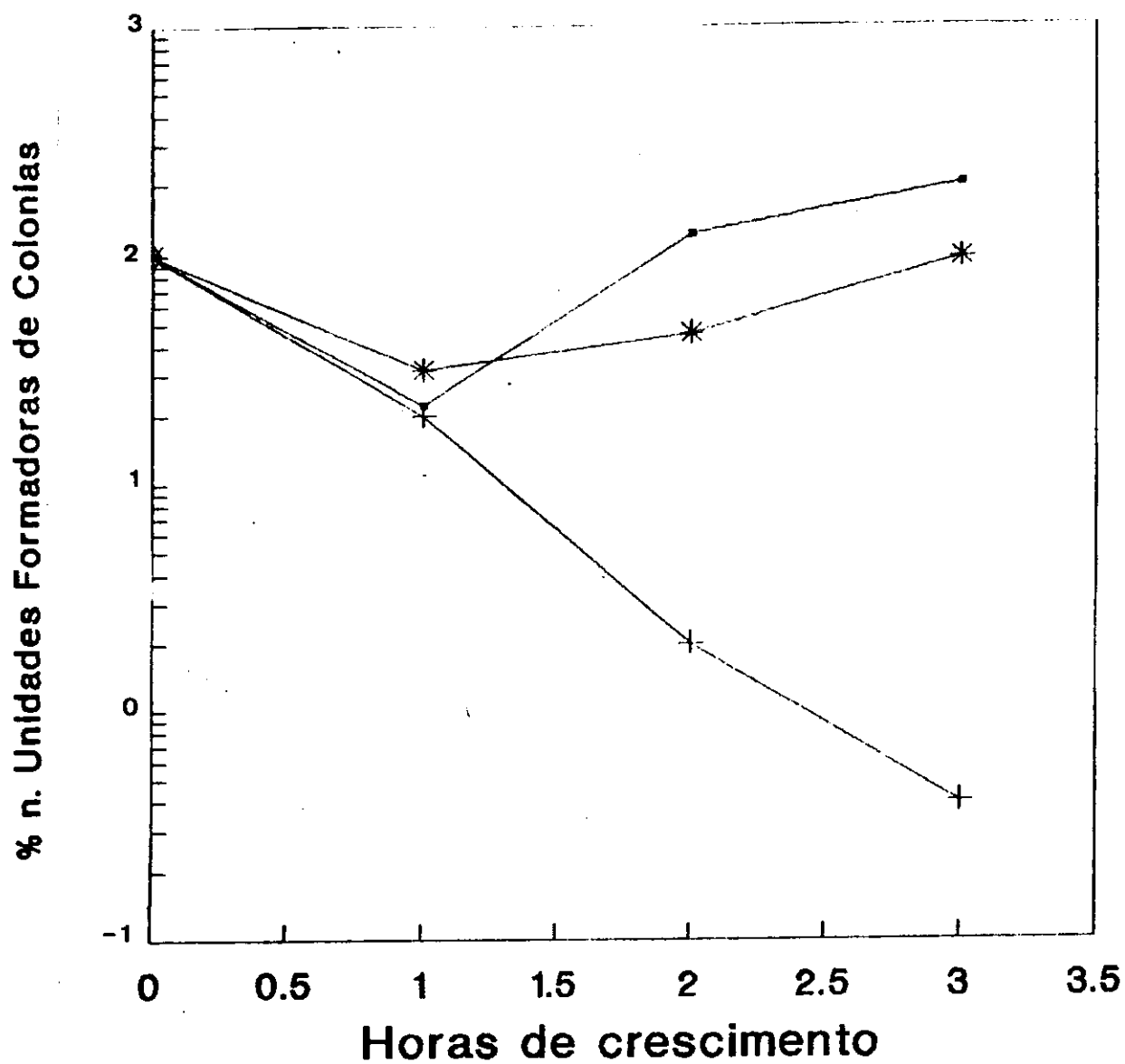


FIGURA 19 Curvas de Resistência Sérica dos Mutantes de *Escherichia coli* da Amostra 13.

—•— 13 —+— 13/3 —*— 13/16

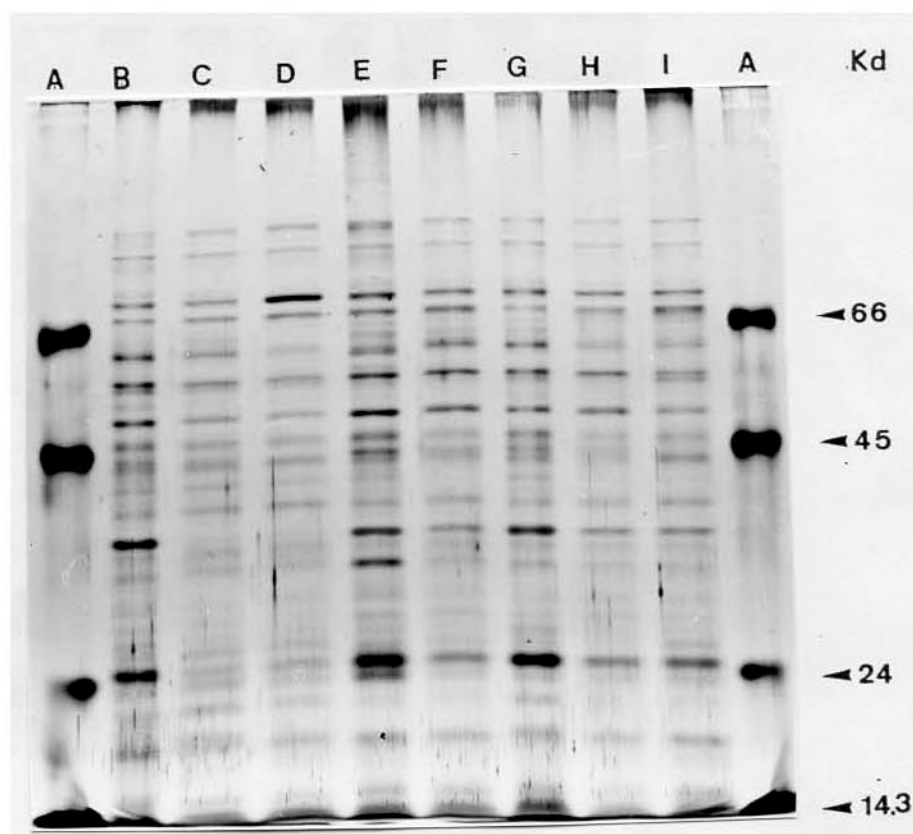


FIGURA 20 Perfil eletroforético de proteínas de membranas dos mutantes da amostra 13 em gel de Poliacrilamida-SDS 10 % corado com prata.

A. Padrão de P.M.

D. 13T19

G. 13T20

B. (Sigma SDS-70)

E. 13/3

H. 13T21

B. 13

F. 13T18

I. 13T22

C. 13T16

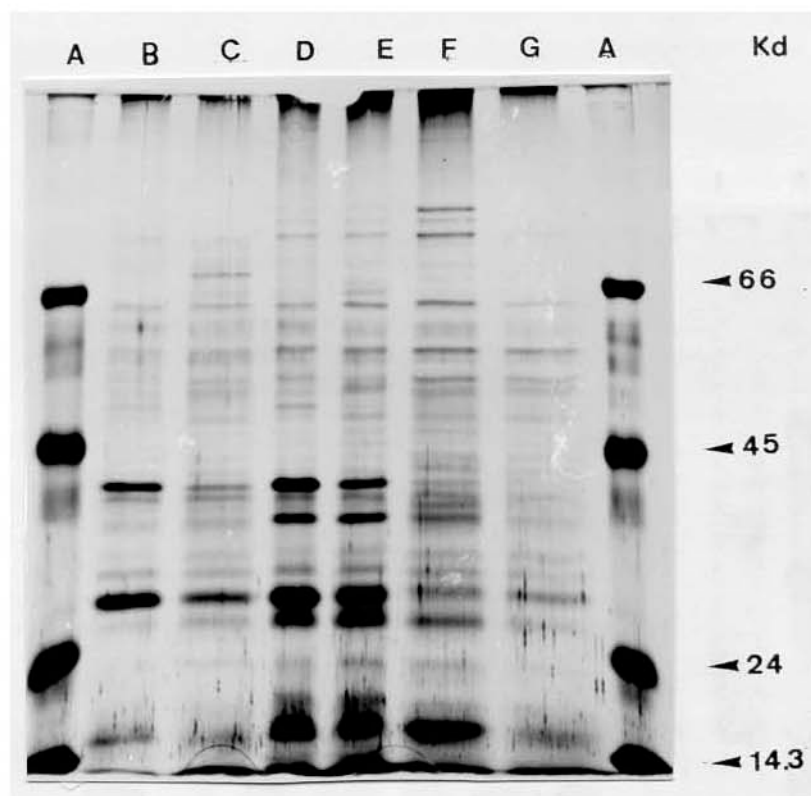


FIGURA 21 Perfil eletroforético de proteínas de membrana dos mutantes da amostras 13 tratadas com dipiridil em Gel de Poliacrilamida-SDS 10 % corado com prata.

A. Padrão de P.M.	D. 13/3	G. 13T16*
(Sigma SDS-70)		
B. 13	E. 13/3*	
C. 13*	F. 13T16	

* As amostras foram crescidas em meio LB com dipiridil.

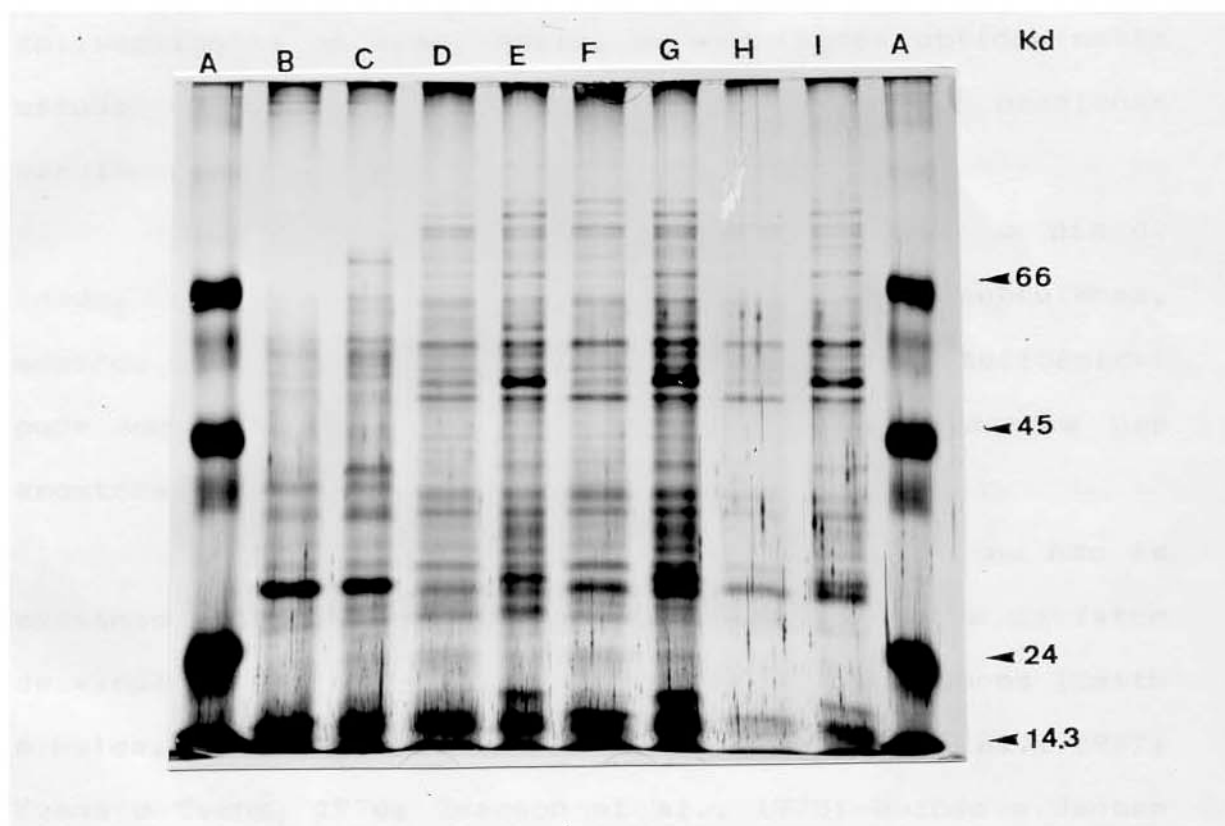


FIGURA 22 Perfil eletroforético de proteínas de membrana dos mutantes da amostras 17 tratadas com dipiridil em gel de Poliacrilamida-SDS 10 % corado com prata.

A. Padrão de P.M. (Sigma SDS-70)	D. 17/1	G. 17/2*
B. 17	E. 17/1*	H. MS101
C. 17*	F. 17/2	I. MS101*

* As amostras foram crescidas em meio LB com dipiridil.

5. DISCUSSÃO

Estudos com *E. coli* de origem aviária têm sido realizados com o objetivo de esclarecer o mecanismo de patogenicidade que esta bactéria utiliza para causar colisepticemia em aves. Assim, os resultados obtidos neste estudo sugerem diversos fatores que poderiam ocasionar virulência em amostras de *E. coli* em aves.

O teste de patogenicidade em pintos de um dia de idade, verificado através da inoculação via subcutânea, mostrou que a virulência de amostras de *E. coli* septicêmicas pode variar de uma para outra, sendo que a maioria das amostras mostrou-se altamente patogênica.

A produção de toxina, quando associada ou não às adesinas ou fatores de colonização, é considerada um fator de virulência em *E. coli* de suínos, bovinos e humanos (Smith e Gyles, 1970; Gyles et al., 1974; Kaeckenbeek et al., 1977; Evans e Evans, 1978; Isacson et al., 1978; Guinée e Jansen 1979; Smith et al., 1979; Moon et al., 1980; Levine et al., 1980; Reis et al., 1980; Cravioto et al., 1980; Peneranda et al., 1980; McConnel et al., 1981; Gaastra e de Graff, 1982; Gatti et al., 1985). Entretanto, os resultados obtidos no teste para produção de toxinas ST que atua elevando o nível de GMPc e LT que eleva o nível de AMPc resultando na secreção de líquido para a luz intestinal provocando diarreia, foram negativos em *E. coli* de origem aviária.

Estes resultados concordam com os observados por Vidotto et al., 1990.

A Verotoxina (VT) ou "Shiga-like" é uma toxina que embora tenha um modo de ação diferente das toxinas ST e LT, também, é considerada um fator de virulência bastante importante em *E. coli* (O'Brien et al., 1983; Johnson et al., 1983). Os resultados encontrados neste estudo mostraram que somente 3 amostras (3, 13 e 15) apresentaram produção de toxina VT. Estas amostras foram consideradas altamente patogênicas.

A capacidade de adesão das amostras em estudo pode ser verificada através dos testes de hemaglutinação com eritrócitos de diferentes animais, teste de adesão em células HeLa e visualização de fimbrias através de microscopia eletrônica. O teste de hemaglutinação com eritrócitos de diferentes animais indicou que a maioria das amostras apresenta adesinas, as quais provavelmente desempenham um papel importante de adesão das bactérias nas células da traquéia das aves durante a infecção natural.

A hipótese de que a colisepticemia é essencialmente uma infecção respiratória causada por outros agentes (vírus e bactérias) que debilitam o sistema imune das aves facilitando a colonização por *E. coli*, exige que tais amostras tenham a capacidade de adesão às células do trato respiratório e consequentemente invasão (Harry e Hemsley, 1965). Entretanto, os resultados obtidos neste

estudo, mostraram que estes os modelos de adesão e invasão em células HeLa não são apropriados para o estudo de patogenicidade em aves. As amostras 5, 6 e 14 que não são patogênicas para pintos de um dia de idade, mostraram capacidade de adesão em células HeLa, enquanto que, as amostras 3, 9, 11 e 17 mostraram-se patogênicas e não foram capazes de aderir nas mesmas células. Estes resultados, entretanto, não invalidam a hipótese de que a adesão das amostras de *E. coli* de origem aviária nas células epiteliais de traquéia é um passo essencial na patogenicidade, visto que a via de inoculação subcutânea utilizada no teste de patogenicidade elimina esta etapa na infecção natural.

Algumas amostras foram submetidas ao teste de Sèreny para verificar a capacidade de invasão. Os resultados obtidos neste teste foram negativos, indicando que o mecanismo de patogenicidade das amostras de *E. coli* de origem aviária não é o mesmo utilizado pelas *E. coli* enteroinvasivas em humanos (DuPont et al., 1971; Levine, 1987).

Em geral, a presença de plasmídios nas amostras de *E. coli* está associada à patogenicidade, uma vez que os mesmos carregam genes de virulência, tais como: produção de enterotoxinas (ST e LT) (Gyles e Barnum, 1969; Smith e Hall, 1978), expressão de fímbrias relacionadas com a aderência ao epitélio do hospedeiro (Orskov e Orskov, 1966; Smith e Linggood, 1972; Evans et al., 1975; Reis et al., 1980;

Peneranda et al., 1980; Smith et al., 1974), sistemas de captação de ferro (Bullen et al., 1978; Weinberg, 1984; Willians e Roberts, 1989; Frost e Rosenberg, 1973), colicinas (Willians, 1979; Braun, 1981; Stuart et al., 1980; Clancy e Savage, 1981) e capacidade de resistir à ação bactericida do soro (Clancy e Savage, 1981; Taylor, 1976; Mool et al., 1980; Binns et al., 1982; Nillius e Savage, 1984). Como foi observado neste estudo, esta associação também pode ser sugerida para as amostras de *E. coli* de aves, visto que dentre as 17 amostras estudadas apenas uma não apresentou plasmídios e a mesma não foi patogênica quando testada em pintos de um dia de idade.

O plasmídio col V, responsável pela produção de colicina V, geralmente está associado à patogenicidade em amostras de *E. coli* septicêmicas (Smith, 1974). Entretanto, a colicina V não é o determinante de virulência, visto que amostras não produtoras de colicina V, mas que possuem plasmídios de alto peso molecular semelhante às amostras colicinogênicas, apresentam virulência quando testadas em animais (Quakenbusch e Falkow, 1979; Milch et al., 1979). Este fato, foi verificado no presente trabalho uma vez que a maioria das amostras estudadas apresentam plasmídios de alto peso molecular e, no entanto, apenas 4 amostras 04, 7, 13 e 15 são produtoras de colicina V.

Os plasmídios col V carregam, frequentemente, genes que aumentam a capacidade das células bacterianas em

sobreviver frente às defesas do organismo do hospedeiro. Como exemplos, os genes responsáveis pela expressão do sideróforo aerobactina no sistema de captação de ferro (Williams, 1979) e os genes responsáveis pela codificação de proteína de membrana externa relacionada com a capacidade de resistência ao soro (Binns et. al., 1979).

O ferro é um elemento essencial no metabolismo bacteriano proporcionando a multiplicação do mesmo no hospedeiro. A limitação deste íon no organismo do hospedeiro é considerado um dos mecanismos de defesa contra as infecções bacterianas uma vez que o ferro encontra-se associado à proteínas (transferrinas) presentes no sangue e fluidos linfáticos. Assim, a não disponibilidade de ferro para a bactéria dificulta sua multiplicação (Bullen et al, 1978; Weinberg, 1984). Várias bactérias são capazes de produzir compostos que competem com as transferrinas do sangue e transferem ferro necessário para seu metabolismo. Estes compostos, denominados sideróforos, solubilizam o ferro ou captam-no das transferrinas promovendo a internalização deste íon através da interação do complexo sideróforo-ferro com receptores específicos na membrana da bactéria (Williams e Roberts, 1989).

Os sideróforos são classificados quimicamente em 2 grupos: os fenolatos (enteroquelinas) e os hidroxamatos (aerobactinas). Os genes responsáveis pela expressão da enteroquelina estão no cromossomo (Williams e Roberts,

1989), enquanto que, os genes que codificam a expressão da aerobactina estão associados a plasmídios col V ou cromossomos..

A utilização de ferro pelas amostras de *E. coli* de origem aviária verificada através da produção de aerobactina mostrou que tanto as amostras patogênicas quanto as não patogênicas, não apresentam o sistema de captação de ferro mediado por plasmídio, o que discorda dos resultados obtidos por Dho e Lafont (1984). Estes autores encontraram uma correlação entre a capacidade de crescimento das amostras de origem aviária em condições limitadas de ferro e a patogenicidade. É possível que as amostras estudadas neste trabalho, apenas não estejam expressando a característica de captação de ferro "in vitro", não podendo ser excluída a possibilidade da ocorrência deste sistema durante a infecção provocada pela inoculação da bactéria via subcutânea em pintos de um dia de idade.

A análise do perfil eletroforético de proteínas de membrana das amostras patogênicas e seus mutantes (patogênicos e não patogênicos) quando submetidos à limitação de ferro durante o crescimento bacteriano demonstrou que este induz a expressão de proteínas de membrana de alto peso molecular cujos genes certamente são cromossômicos, uma vez que a falta de plasmídios mantém a expressão de todas as proteínas de membrana.

A capacidade de resistir à atividade bactericida do soro em amostras de *E. coli* está associada à genes plasmidiais presentes tanto no plasmídio col V (Binns et al., 1979) quanto nos plasmídios R (Moll et al., 1980). Entretanto os resultados obtidos no presente trabalho, indicaram que 5 amostras (1, 2, 8, 11 e 15) apresentaram-se sensíveis aos antibióticos testados sendo que com exceção da amostra 2, as demais mostraram-se resistentes ao soro de galinha no teste de resistência sérica. Estes resultados indicam que os genes responsáveis pela resistência sérica podem estar localizados em outros plasmídios tais como col V, I-k94 e plasmídios F como foi verificado por Manning et al., 1980 e Ferraza e Levy, 1980.

O mecanismo pelo qual as amostras de *E. coli* invasivas são resistentes ao soro é devido à presença de componentes de superfície, proteínas da membrana externa e antígeno capsular os quais parecem inibir a ativação ou função do complemento (Taylor, 1976). A proteína de membrana externa, proteína tra T, codificada pelo gene tra T de plasmídios conjugativos R e a proteína codificada pelo gene iss do plasmídio col V são bastante semelhantes e estão envolvidos na resistência sérica (Binns et al., 1979). Embora os dados não sejam conclusivos, parece que estas proteínas bloqueiam a ação do complemento terminal na superfície da célula (Binns et al., 1982).

A determinação da resistência sérica nas amostras de *E. coli* de origem aviária demonstrou que a mesma possui um papel significativo na patogenicidade, pois a maioria das amostras estudadas que foram capazes de resistir à atividade bactericida do soro, mostraram-se patogênicas quando testadas em pintos de um dia de idade. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Vidotto et al., (1990). Por outro lado a verificação de que a amostra 2 mostrou-se sensível ao soro de galinha e patogênica para pintos de um dia de idade, indica a possibilidade de outro(s) fator(es) de virulência estarem envolvidos na patogenicidade de algumas amostras de *E. coli* de origem aviária.

A patogenicidade das amostras de *E. coli* de origem aviária também foi estudada, no presente trabalho, quanto à localização dos genes responsáveis pela expressão da mesma. Para tal, transferência de plasmídios entre amostras patogênicas e não patogênicas, mutagênese com transposon Tnpho A e cura de plasmídios com SDS foram realizados. Tais experimentos foram feitos com a amostra 13, que entre todas as estudadas, foi considerada muito patogênica quando inoculada em pintos de um dia de idade.

Os resultados na conjugação da amostra 13 e a receptora MS101 mostraram que os plasmídios, com exceção dos plasmídios de alto peso molecular com 56,2 e 46,9 Mda, respectivamente, são conjugativos. O perfil plasmidial dos transconjugantes apresentou um plasmídio com 43,8 Md e

outros de baixo peso molecular que foram transferidos para a amostra receptora. Os testes de patogenicidade em pintos de um dia de idade mostraram que estes transconjugantes não foram patogênicos e, portanto, tais plasmídios não são os responsáveis pela virulência da amostra 13.

A mutagênese realizada com o transposon Tnpho A resultou na obtenção de mutantes que tiveram este transposon inserido no plasmídio cujo peso molecular é de 56,2 Mda (Figura 16). Esses mutantes quando testados em pintos de um dia de idade perderam a virulência, o que indicaria que o gene responsável pela patogenicidade desta amostra *E. coli* poderia estar localizado no referido plasmídio.

A cura do plasmídio, cujo peso molecular é de 56,2 Md, com SDS resultou na obtenção de uma amostra patogênica quando testada em pintos de um dia de idade (Figura 17). Estes resultados indicam que no caso de mutagênese com o transposon, o mesmo também foi inserido no cromossomo, causando uma mutação em genes envolvidos com a patogenicidade na amostra 13.

Visto que na literatura, as proteínas de membrana externa têm papel importante na patogenicidade de amostras de *E. coli* invasivas, o perfil eletroforético das proteínas de membrana das amostras em estudo foi realizado. Os resultados mostrados nas figuras 11 e 12 indicam que as amostras consideradas não patogênicas (5, 6 e 14) não apresentaram duas proteínas de membrana com pesos

moleculares de 23,8 e 36,3 Kda. As amostras 5 e 14, entretanto, apresentaram resistência sérica intermediária, o que indica que tais proteínas não estão envolvidas na capacidade de resistir às atividades bactericidas do soro. Este resultado foi confirmado pela curva de resistência sérica da amostra 13 e seus mutantes (patogênico - amostra 13/3 e não patogênico - amostra 13/16), onde a amostra 13/16, considerada não patogênica e que possui as proteínas de membrana de 23,8 e 36,3 Kda, apresentou resistência sérica intermediária.

Segundo Vidotto et al. (1990), a patogenicidade das amostras de *E. coli* de origem aviária é um fenômeno multifatorial onde a produção de colicina V, produção de aerobactina, resistência sérica e invasão celular participam na virulência das amostras. Estas características proporcionam às amostras patogênicas a capacidade de resistir ao sistema de defesa do hospedeiro e também a competir com as transferrinas na captação de ferro causando a septicemia e invasão celular. Os resultados obtidos no presente trabalho concordam com o fato de que a patogenicidade em amostras de *E. coli* de origem aviária é um fenômeno multifatorial, entretanto, a resistência sérica tem uma participação parcial na patogenicidade sendo as proteínas de membrana com 23,8 e 36,3 Kda os principais determinantes da patogenicidade.

6. CONCLUSOES

A partir da análise dos resultados dos testes realizados neste estudo com as amostras de *E. coli* de origem aviária, foi possível concluir que:

- A produção de toxinas ST e LT e hemolisinas não estão relacionadas com a patogenicidade uma vez que as amostras foram negativas para estes testes.

- A produção de toxina VT aumentou a virulência de pelo menos 3 amostras em estudo.

- Os modelos de adesão e invasão em células HeLa não são adequados para o estudo de patogenicidade.

- Os testes de hemaglutinação e visualização de fímbrias em microscopia eletrônica indicaram a presença de estruturas semelhantes à fímbrias que podem facilitar a adesão nas células epiteliais de traquéia das aves.

- A capacidade de resistir à atividade bactericida do soro não é a principal característica da patogenicidade embora contribua para um aumento na virulência de algumas amostras.

- O perfil de proteínas de membranas das amostras em estudo mostraram a presença de duas proteínas cujos pesos moleculares são de 23,8 e 36,3 Kda, respectivamente, nas amostras patogênicas.

- Os estudos genéticos de mutagênese e cura de plasmídios indicaram que os genes codificadores das proteínas de membrana com 23,8 e 36,3 Kda, respectivamente, são cromossômicos.

7. RESUMO

Amostras de *Escherichia coli*, isoladas de aves com septicemia, foram estudadas visando determinar os fatores envolvidos na patogenicidade. Tais amostras foram, inicialmente, caracterizadas por testes bioquímicos, seguidos por testes de patogenicidade em pintos de um dia de idade, hemaglutinação, visualização de fímbrias através de microscopia eletrônica, produção de toxinas, hemolisinas e colicinas, capacidade de adesão e invasão de células HeLa e de captação de Fe mediado por plasmídios, resistência às drogas antimicrobianas e à ação bactericida do soro, caracterização eletroforética do perfil plasmidial e de proteínas totais e de membrana em SDS-PAGE; além de, estudos genéticos de mutagênese com transposon Tnpho A e cura de plasmídios visando a localização dos genes envolvidos na patogenicidade.

Os resultados mostraram que a produção de toxinas e hemolisinas não estão relacionadas com a patogenicidade, uma vez que a maioria das amostras foram negativas para estes testes. Os testes de adesão e invasão celular demonstraram que os mesmos não podem ser utilizados como modelo para estudos de patogenicidade em *Escherichia coli* de origem aviária. Os resultados obtidos na hemaglutinação e visualização de fímbrias em microscópio eletrônico indicaram que a maioria das amostras estudadas possuem fímbrias que

podem facilitar a adesão nas células epiteliais da traquéia das aves. A produção de colicinas foi verificada na maioria das amostras, entretanto, a colicina V estava presente em apenas 5 das amostras e que foram consideradas patogênicas para pintos de um dia de idade. A capacidade de resistir à atividade bactericida do soro foi uma característica verificada nas amostras patogênicas entretanto, a resistência sérica mediada pelos plasmídios col V e R não é a principal característica da patogenicidade embora contribua para um aumento na virulência de algumas amostras.

Os estudos de eletroforese em gel de agarose mostraram que estas amostras apresentam plasmídios de alto peso molecular. As características de patogenicidade de uma das amostras de origem aviária não foram transferidas por conjugação para uma amostra de *Escherichia coli* receptora K12. A mutagênese de uma amostra patogênica com transposon Tnpho A resultou na obtenção de dois mutantes (13T16 e 13T19) que perderam a patogenicidade (uma vez que o transposon foi inserido no plasmídio com 52,2 Md e também no cromossomo). A cura do plasmídio de alto peso molecular (56,2 Md) resultou na obtenção de uma amostra que manteve a patogenicidade quando inoculada em pintos de um dia de idade. Estes resultados indicam que os fatores envolvidos com a patogenicidade, nesta amostra, possivelmente são mediados por genes cromossômicos. O perfil eletroforético de proteínas de membrana de uma amostra selvagem, patogênica, e

seus mutantes mostraram a ausência de duas subunidades proteicas cujos pesos moleculares são de 23,8 e 36,3 Kd que estavam ausentes nas últimas. Estes resultados indicam que tais proteínas podem estar envolvidas na patogenicidade das amostras de *Escherichia coli* de origem aviária, além de outros fatores, como resistência sérica e produção de colicina, os quais foram avaliados neste estudo.

8. SUMMARY

Septicemic *Escherichia coli* strains isolated from chickens were studied to determine their pathogenic factors. These studies involved pathogenicity assays in one-day-old chicks; hemmagglutination looking for fimbriae expression; electron microscope studies; toxins, hemolysins and colicins production; adhesion and invasiveness of HeLa cells; antimicrobial drug resistance; serum resistance; siderophores expression; plasmid profile; total and outer membrane protein profiles and genetic and transposon mutagenic studies.

The results had shown that hemolysins and toxins production are not related to the pathogenicity. Since most of studied strains were negative to these assays. The adhesion and invasiveness assays were not suitable as models for the pathogenicity of these strains. Hemmagglutination and electron microscope studies indicated that most of the strains is able to produce fimbriae which could be important to the adhesion on the trachea cells. Most of the strains were able to produce colicins, but colicin V which is correlated to the pathogenicity was produced by only five strains. Despite of the fact that most of the pathogenic strain be resistance to the bactericidal activity of the serum this trait is not the main responsible for the virulence.

Plasmid DNA electrophoresis demonstrated that these were presents in the majority of the studied strains. We are not able transfer by conjugation the pathogenicity traits to a recipient strain.

Two nonpathogenic mutants (13T16 and 13T19) were obtained by transposon mutagenesis using transposon Tnpho A. Plasmid cure and genetic studies lead us to suppose that in this pathogenic strain the factors involved in pathogenicity are mediated by chromossomic genes. SDS-PAGE of membrane proteins of a wild type septicaemia strain and its nonpathogenic mutants showed that two protein subunits of 23.8 and 36.3 Kda could be involved in the pathogenicity. These proteins, besides serum resistance capacity, toxins production could be responsible for the full expression of pathogenicity.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Achtman, M.; Kennedy, N.; Skurray, R. Cell-cell interactions in conjugating *Escherichia coli*: role of *tra T* protein in surface exclusion. **PNAS** **74**, 1977.
- Barbour, E. K.; Nalbut, N. H.; Al-Nakhli, H. M. Use of epidemiology markers to identify the source of *Escherichia coli* infections in poultry. **Am. J. Vet. Res.**, **46**(4): 989-991, 1985.
- Benedetti, C. A. Análise eletroforética de proteínas de membrana de *Pseudomonas avenae* e *Pseudomonas rubrillineans* patogênicas a gramíneas. Campinas, 1991. 75 p. (Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).
- Bindereif, A.; Braun, V & Hantke, K. The cloacin receptor of col V-bearing *Escherichia coli* is part of the Fe^{+3} -aerobactin transport systems. **J. Bacteriol.**, **150**: 1472-75, 1982.
- Bindereif, A.; Garibaldi, J. A.; Neillands, J. B. Annual meeting, American Society for Microbiology, 81ST, Dallas, Tx, March 16, p 119, Abtr, 1981.

- Binns, M. M.; Davies, D. L.; Hardy, K. G. Cloned fragments of the plasmid col V, I-K specifying virulence and serum resistance. **Nature**, **279**: 778-81, 1979.
- Binns, M. M.; Mayden, J.; Levine, R. P. Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes *tra T* of R and *iss* of col V, I-K 94. **Infect. Immun.**, **35**: 654-59, 1982.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. **Nucleic. Acid Res.**, **7**: 1513-22, 1979.
- Bitter-Suermann, D.; Peters, H.; Nehrbass, R.; Montenegro, M.; Timmis, K.N. Monoclonal antibody detection of inc F group plasmid. Encoded *tra T* protein in clinical isolates of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **46**: 308-13, 1984.
- Blum, H.; Beier, H. & Gross, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, **8**: 93-9, 1987.
- Braun, V. *Escherichia coli* cells containing the plasmid col V produce the iron aerobactin. **FEMS Microbiol. Lett.**, **11**: 225-28, 1981.

- Bullen, J. J.; Rogers, H. J. & Griffith, E. Role of iron bacterial infection. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, 80: 1-35, 1978.
- Carbonetti, N. H. & Williams, P.H. A cluster of five genes specifying the aerobactin iron uptake system of plasmid col V - K30. **Infect. Immun.**, 46: 7-12, 1984.
- Clancy, J. & Savage, D. C. Another colicin V phenotype in vitro adhesion of *Escherichia coli* to mouse intestinal epithelium. **Infect. Immun.**, 32: 343-52, 1981.
- Cravioto, A.; McConnell, M.M.; Rowe, B.; Scotland, S. M.; Smith, H. R. & Willshaw, J. J. Studies of colonization factors in *Escherichia coli* strains isolated from human: identification and plasmids analysis, In: Gastra, W & de Graff, F. K. 1982. Host-specific fimbrial adhesins of non-invasive enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Microbiol. Rev.**, 46: 129-161. 1980.
- Dean, A. G.; Ching, Y. C.; Williams, R. G. & Harden, L. B. Test for *Escherichia coli* enterotoxin of diarrhea in children in Honolulu. **J. Infect. Dis.**, 125: 407-11, 1973.

- Dho, M. & Lafont, J. P. Adhesive properties and iron uptake abilities in *Escherichia coli* lethal and nonlethal for chickens. **Avian Dis.**, 28: 1016-25, 1984.
- Drasar, B. S. & Hill, M. J. Human intestinal flora. The distribution of bacterial flora in the intestine. London: Academic Press, pag 36-46, 1974.
- DuPont, H. L.; Formal, S. B.; Hornick, R. B.; Snyder, M. J.; Libonati, J. P.; Sheahan, D. G.; LaBrec, E. H. & Kalas, J. P. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. **N. Engl. J. Med.**, 285: 1-9, 1971.
- Evans, D. G. & Evans, D. J. Jr. New surface-associated heat-labile colonization factor (CFA/II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O6 e O8. **Infect. Immun.**, 21: 638-47, 1978.
- Evans, D. G.; Evans, D. J. Jr. & Gorbach, S. L. Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. **Infect. Immun.**, 8: 725-30, 1973.
- Evans, D. G.; Silver, R. P.; Evans, D. J. Jr.; Chase, D. G. & Gorbach, S. L. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli*

- enterotoxigenic for humans. **Infect. Immun.**, **12**: 656-57, 1975.
- Evans, D. J. Jr.; Evans, D. G.; Young, L. S. & Pitt, J. Hemagglutination typing of *Escherichia coli* definition of seven hemagglutination types. **J. Clin. Microbiol.**, **12**: 235-42, 1980.
- Ferraza, D. & Levy S. B. Biochemical and Immunological characterization of an R plasmid-encoded protein with properties resembling those of major cellular outer membrane proteins. **J. Bacteriol.**, **144**(1): 149-58, 1980.
- Frost, G. E. & Rosemberger, H. The citrate-dependent iron transport system in *Escherichia coli* K12. **Biochem. Biophys. Acta.**, **330**: 90-101, 1973.
- Gaastra, W. & de Graff, F. S. Host-specific fimbrial adhesin of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Microbiol Rev.**, **46**: 129-61, 1982.
- Gatti, M. S. V.; Serafim, M. B. & Pestana de Castro, A.F. Fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas no Brasil. **Revista de Microbiologia**, **16**: 21-31, 1985.

Gibson, F. & Magrath, D. I. The isolation and characterization of a hydroxamic acid (aerobactin) formed by *Aerobacter aerogenes* 62-1. **Biochim. Biophys. Acta**, **192**: 175-84, 1969.

Glantz, P. J. Serotypes of *Escherichia coli* associated with colibacillosis in neonatal animals. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, **176**: 67-79, 1971.

Grewal, K. K.; Warner, P. J. & Williams, P. H. An inducible outer membrane protein involved in aerobactin-mediated iron transport by col V strains of *Escherichia coli*. **FEBS Lett.**, **140**: 27-30, 1982.

Griffiths, E.; Stevenson, P; Joyce, P. Pathogenic *Escherichia coli* express new outer membrane proteins with growing in vivo. **FEMS Microbiol. Lett.**, **16**: 95-99, 1983.

Gross, W. B. Colibacillosis. In: Hofstad, M. S.; Calnek, N. W.; Helmboldt, C. F.; Reid, W. M.; Yoder, H. W. (eds), *Diseases of poultry* (6 th ed). Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 392-405, 1972.

Guinée, P. A. M. & Jansen, W. H. Detection of enterotoxigenic and attachment factors in *Escherichia coli* strains of human, porcine and bovine origin; a

- comparative study. **Zentralb. Bacteriol. Parasinteked. Infectinaskr. Hyg. Abt. Orif. Reihea**, 243: 245-57, 1979.
- Guinée, P. A. M.; Veldkamp, J. & Jansen, W. H. Improved minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, 15: 676-8, 1977.
- Gyles, C. L. & Falkow, S. The enterotoxin plasmid of *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, 130: 40-49, 1974.
- Harry, E. G. & Hemsley, L. A. The association between the presence of septicaemia strains of *Escherichia coli* in the respiratory and intestinal tracts of chickens and the occurrence of colisepticaemia. **The Veterinary Record.**, 77: 35-40, 1965.
- Hoefer Scientific Instruments. Hoefer Electrophoresis Catalog and Exercises (1990-1991). San Francisco, 1990.
- Hugles, C.; Philips, R.; Roberts, A. P. Serum resistance among *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in relation to O type and the carriage of hemolysin, colicin and antibiotic resistance determinants. **Infect Immun.**, 35: 270-75, 1982.

- Isaacson, R. H.; Moon, H. W. & Schneider, R. A. Distribution and virulence of *Escherichia coli* in the small intestine of calves with and without diarrhea. **Am. J. Vet. Res.**, **38**: 1750-55, 1978.
- Jackman, P. J. H. & Whiley, R. A. Microbial sustematics, identification and fingerprinting based on electrophoretic analysis of proteins. Campinas, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, 1990.
- Johnson, W. M.; Lior, H. & Bezanson, G. S. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. **The Lancet**, i:76, 1983.
- Jones, G. W. & Rutter, J. M. Role of K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhoea caused by *Escherichia coli* in piglets. **Infect. Immun.**, **6**: 918-27, 1972.
- Kaeckenbeek, A.; Josse, M. & Schoennaers, R. Relations chez les *Escherichia coli* d'origine bovine entre le pouvoir enteropathogene, l'antigene K99 et l'hémagglutination. **Am. ed. Vet.**, **121**: 239-48, 1977.
- Kennedy, N.; Beutin, L.; Achtman, M.; Skurray, R.; Rahmsdorf, H & Herrlich, P. Conjugation proteins encoded by the F sex factor. **Nature**, **270**: 580-85, 1977.

- Kim, K. J. & Tak, R. B. Studies on pathogenic *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis. In: Biochemical and serological investigations. **Korean J. Vet. Public. Health**, 7(2): 113-120., 1983.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature (London)**, 227: 680-85, 1970.
- Levine, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. **J. Infect. Dis.**, 155: 377-89, 1987.
- Levine, M. M.; Reinnels, M.B. Daya, V. & Hughes, T. P. Hemmagglutination and colonization factors in enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* that cause diarrhoea. **J. Infect. Dis.**, 141: 733-37, 1980.
- Manning, P. A.; Beutin, L.; Achtman, M. Outer membrans of *Escherichia coli*: Properties of the F sex factor *tra T* protein which is involved in surface exclusion. **J. Bacteriol.**, 142(1): 285-94, 1980.

- McConnel, M. M., Smith, H. R., Willshaw, G. A. Field, A. M. & Rowe, B. Plasmid coding for heat-labile enterotoxin production isolated from *Escherichia coli* 078 comparison of properties. **J. Bacteriol.**, **143**: 148-57, 1981.
- Milch, H.; Nikolnikov, S.; Čzirók, E. *Escherichia coli* col V plasmid and their role in pathogenicity. **Acta Microbiol. Hung.**, **31**(2): 117-25, 1984.
- Miller, J. H. Experiments in molecular biology. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.
- Moll, A.; Manning, P. A.; Timmis, K. Plasmid-determined resistance to serum bactericidal activity: a major outer protein, the *tra T* gene product, is responsible for plasmid-specified serum resistance in *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **28**: 359-67, 1980.
- Moon, H. W.; Kohler, E. M.; Scheneider, R. A. & Whipp, S. C. Prevalence of pilus anigens, enterotoxins types, and eneropathogenicity among K88-negative enterotoxigenic *Escherichia coli* from neonathal pigs. **Infect. Immun.**, **27**: 222-30, 1980.
- Nargaraja, K. V.; Emery, D. A.; Newman, J. A. & Pomeroy, B. S. Identification and isolation of somatic pili from

- pathogenic *Escherichia coli* of turkeys. **Am. J. Vet. Res.** **44**(2): 284-87, 1983.
- Naveh, M. W.; Zusman, T.; Skutelsky, E. & Ron, E. Z. Adherence pili in avian strains of *Escherichia coli*: effect on pathogenicity. **Avian Dis.**, **28**: 651-61, 1984.
- Nililius, A. M. & Savage, D. C. Serum resistance encoded by colicin V plasmid in *Escherichia coli* and its relationship to the plasmid transfer system. **Infect. Immun.**, **43**: 947-53, 1984.
- O'Brien, A. D.; Lively, T. A.; Chen, M. E.; Rothman, S. W. & Formal, S. B. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* shiga like cytotoxin. **The Lancet**, **i**: 702, 1983.
- Ogata, R. T.; Winters, C.; Levine, R. P. Nucleotide sequence analysis of the complement resistance gene from plasmid R 100. **J. Bacteriol.**, **151**(2): 819-29, 1982.
- Orskov, I. & Orskov, F. Episome carried surface antigen k88 of *Escherichia coli*. In: Transmission of the determinant of k88 antigen and influence on the transfer of chromosomal markers. **J. Bacteriol** **91**: 69-75, 1966.

- Payne, S. M. Synthesis and utilization of siderophores by *Shigella flexneri* J. **Bacteriol.**, **143**: 1420-24, 1980.
- Peneranda, M. E.; Mann, M. B.; Evans, D. G. & Evans, D. J. Jr. Transfer of an ST:LT:CFA/II plasmid into *Escherichia coli* K12 strain R1 by cotransformation with PSL 301 plasmid DNA. **Fem Microbiol. Letters**, **8**: 251-54, 1980.
- Quackenbush, R. L. & Falkow, S. Relationship between colicin V activity and virulence in *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **24**: 562-64, 1979.
- Reis, M. H. L.; Affonso, M. L. T.; Trabulsi, L. R.; Mazaittis, A. J.; Maos, R. & Maos, W. K. Transfer of a CFA/I-ST plasmid promoted by a conjugative plasmid in a strain of *Escherichia coli* of serotype O128ac:H12. **Infect. Immun.**, **29**: 140-43, 1980.
- Scaletsky, I. C. A.; Silva, M. L. M. & Trabulsi, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, **45**: 534-36, 1984.
- Secher, I.; Ohad, E. & Zamberg, Y. Serogroups and serotypes of *Escherichia coli*, from disease fowl (Israel, 1972 -

1981). Reference laboratory for *Escherichia coli*, Central Laboratories, Ministry of Health, Jerusalem, and Veterinary Services, Ministry of Agriculture, Haifa.

Shipley, P. L.; Gyles, C. L. & Falkon, S. Characterization of plasmids that encode for the K88 colonization antigen. **Infect. Immun.**, 20: 559-60, 1978.

Silveira, W. D. Estudo plasmidial em amostras de *Escherichia coli* produtoras do novo fator de colonização F42. Ribeirão Preto, 1986. 116 p. (Doutorado- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo).

Smith, H. R.; Cravioto, A.; Willshaw, G. A.; McConnell, M. M.; Scotland, S. M. Gross, R. J & Rowe, B. A plasmid coding for the production of colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin in strains of *Escherichia coli*. **Fems Microbiol. Letters**, 6: 255-60, 1979.

Smith, H. W. & Gyles, C. L. The relationship between two apparently different enterotoxin produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. **J. Med. Microbiol.**, 3: 387-401, 1970.

Smith, H. W. & Hall, S. The transmissible nature of the genetic factor in *Escherichia coli* that controls

enterotoxin production. *J. Gen. Microbiol.*, 52: 319-34, 1978.

Smith, H. W. & Linggood, M. A. Further observations on *Escherichia coli* colienterotoxins with particular regard to those produced by atypical piglet strains and by calf and lamb strains: the transmissible nature of these enterotoxin and of a K antigen possessed by calf and lamb strains. *J. Med. Microbiol.*, 5: 243-50, 1972.

Smith, H. W. A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of *Escherichia coli*: the discovery of a plasmid-controlled toxin and a plasmid-controlled lethal character closely associated, or identical, with colicine V. *J. Gen. Microbiol.*, 83: 95-111, 1974.

Sojka, W. J. & Carnaghan, R. E. A. *Escherichia coli*: Infection in Poultry. *Res. Vet. Sci.*, 2: 340-52, 1961.

Grinivasan, V. A.; Kharole, M. V.; Kalra, D. S. & Dwivedi, P. Colibacillosis in Poultry. *Indian Vet. J.*, 56: 629-33, 1979.

- Stuart, S. J.; Greenwood, K. T. & Luke, R. K. J. Hydroxamate-mediated transport of iron controlled by col V plasmids. **J. Bacteriol.**, **143**: 35-42, 1980.
- Suwanichkul, A. & Panigrahy, B. Biological and immunological characterization of pili *Escherichia coli* serotypes O1, O2 e O78 pathogenic to poultry. **Avian Dis.**, **30**: 781-787, 1986.
- Suwanichkul, A. & Panigrahy, B. Diversity of pilus subunits of *Escherichia coli* isolated from avian species. **Avian Dis.**, **32**: 822-25, 1988.
- Taylor, P. W. Immunochemical investigations on lipopolysaccharides and acidic polysaccharides from serum-sensitive and serum resistant strains of *Escherichia coli* from urinary tract infections. **J. Med. Microbiol.** **9**:405-21, 1976.
- Tomoeda, M.; Inuzuka, M.; Kubo, N. & Nakamura, S. Effective elimination of drug resistance and sex factors in *Escherichia coli* by Sodium Dodecyl Sulfate. **J. Bacteriol.**, **95**(3): 1078-1089, 1968.
- Truscott, R. B. Studies on the chicken-lethal toxin of *Escherichia coli*. **Can. J. Comp. Med.**, **38**: 160-167, 1973.

- Tsuji, T.; Joya, J. E.; Yao, S.; Honda, T. & Miwatani, T. Purification and characterization of heat-labile enterotoxin isolated from chicken enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Fems Microbiol. Lett.**, 52: 79-84, 1988.
- van Tiel- Menkveld, G. J.; Oudega, B.; Kempers, O. & Graaf, F. K. The possible involvement of the cloacin DF13 receptor protein in the hydroxamate-mediated uptake of iron by *Enterobacter cloacae* and *Escherichia coli* (col V). **FEMS Microbiol. Lett.**, 12: 373-80, 1981.
- Vidotto, M. C. Caracterização e estudo genético molecular de fatores de virulência de *Escherichias coli* aviária. (Tese de Doutorado). Microbiologia e Imunologia, Escola Paulista de Medicina, 1988.
- Vidotto, M. C.; Muller, E. E.; Freitas, J. C.; Alfieri, A. A.; Guimarães, I. G. & Santos, D. S. Virulence factors of avian *Escherichia coli*. **Avian Dis.**, 34: 531-38, 1990.
- Weinberg, E. D. Iron withholding: A defense against infection and neoplasia. **Physiol. Rev.**, 64: 65-102, 1984.
- Williams, P. H. & Roberts, M. Iron scavenging in the pathogenesis of *Escherichia coli*. In: Hopwood, D. A. &

- Chater, K. E., ed. *Genetics of Bacterial Diversity*. London, Academic Press, 1989. cap. 16, pp. 331-50.
- Williams, P. H. & Warner, P. J. col V plasmid-mediated, colicin V-independent iron uptake system of invasive strains of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **29**: 411-16, 1980.
- Williams, P. H. Novel iron uptake system specified by col V plasmids: an important component in the virulence strains of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **26**: 925-32, 1979.
- Yano, T.; Garcia, M.; Leite, D. S.; Camargo, I. J. B. de & Castro, A. F. P. de Fimbriae-like adhesive factor (EAF 44) from a verocytotoxigenic *Escherichia coli* of bovine origin. **Res. Vet. Sci.**, **45**: 418-19, 1988.
- Yano, T.; Leite, D. S.; Camargo, I. J. B. de & Castro, A. F. P. de A probable new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. **Microbiol. Immunol.**, **30**: 495-508, 1986.
- Yano, T.; Oliveira, M. S.; Fontes, C. F.; Almeida, A. C. P. & Castro, A. F. P. Detection of heat-labile (LT) enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* by

radial immune hemolysis test: a modification for clinical use. *Med. Microbiol. Immunol.*, 177: 219-26, 1982.