

FABIANE BENETTI

**DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE  
PATOGENICIDADE E ESTRUTURA CLONAL DE  
LINHAGENS DE *Escherichia coli* UROPATOGÊNICAS**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
CAMPINAS-SP

1999



FABIANE BENETTI

**DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE  
 PATOGENICIDADE E ESTRUTURA CLONAL DE  
 LINHAGENS DE *Escherichia coli* UROPATOGÊNICAS**

Este exemplar corresponde à redação final  
 da tese defendida pelo(a) candidato(a)  
Fabiane Benetti  
 e aprovada pela Comissão Julgadora  
09/04/99

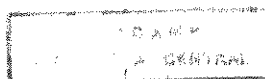
Dissertação apresentada ao  
 Departamento de Microbiologia e Imunologia  
 do Instituto de Biologia da Universidade  
 Estadual de Campinas, para obtenção do título  
 de Mestre em Ciências Biológicas na Área de  
 Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
 CAMPINAS-SP

1999

99/2238



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	71100
V.	Ex.
TOMBO BC/	37 889
PROC.	229/99
0	<input type="checkbox"/>
0	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	11/06/99
N.º CPD	

CM-00124166-2

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

**Benetti, Fabiane**

**B439d**

Determinação das características de patogenicidade e estrutura clonal de linhagens de *Escherichia coli* uropatogênicas/Fabiane Benetti. -- Campinas, SP:[s.n.], 1999.  
142f.:ilus.


Orientador: Wanderley Dias da Silveira

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1. *Escherichia coli*. 2. Patogenicidade-características. 3. Infecção.  
4. Genes-identificação. I. Silveira, Wanderley Dias da. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

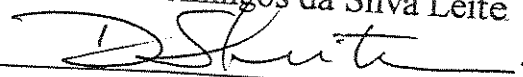
## Componentes da Banca Examinadora

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira (Orientador)



---

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite



---

Prof. Dr. Marcelo Brocchi



---

Prof. Dr. Tomomasa Yano (Suplente)

---



## Sumário

	Página
Lista de Figuras.....	7
Lista de Tabelas.....	9
Resumo.....	10
1. Introdução.....	11
2. Objetivos.....	13
3. Revisão bibliográfica.....	14
4. Material e métodos.....	47
4. 1. Linhagens bacterianas.....	47
4. 2. Linhagens padrão utilizadas neste trabalho.....	48
4. 3. Determinação do nível de resistência a drogas antimicrobianas.....	49
4. 4. Extração de DNA plasmidial.....	50
4. 4. 1. Soluções utilizadas na técnica.....	51
4. 5. Eletroforese de DNA plasmidial em gel de agarose.....	52
4. 6. Teste de adesão em células HeLa.....	53
4. 6. 1. Crescimento das linhagens bacterianas.....	53
4. 6. 2. Cultivo de células HeLa.....	53
4. 6. 3. Teste de adesão.....	54
4. 6. 4. Teste de invasão.....	55
4. 7. Adesão de <i>Escherichia coli</i> em células uroepiteliais <i>in vitro</i> .....	58

4. 8. Produção de sideróforos (aerobactina).....	59
4. 9. Absorção do corante vermelho de congo pelas linhagens bacterianas em meio de cultura.....	60
4. 10. Produção de hemolisina.....	61
4. 11. Extração de isoenzimas.....	61
4. 11. 1. Soluções utilizadas na técnica.....	62
4. 12. Determinação do perfil eletroforético do DNA através de Ribotipagem.....	67
4. 12. 1. Extração do DNA genômico.....	67
4. 12. 2. Ribotipagem.....	68
4. 12. 3. Marcação do fragmento de DNA p64 com ( $\alpha$ - $^{32}$ P) dCTP.....	71
4. 12. 4. Hibridização da membrana de “nylon” com a sonda p64.....	71
4. 12. 5. Soluções utilizadas na técnica.....	73
4. 13. Mutagênese com transposon TnphoA.....	75
4. 14. Cura de plasmídios através de tratamento com brometo de etídio.....	76
4. 15. Microscopia eletrônica.....	77
5. Resultados.....	79
5. 1. Determinação da resistência a drogas antimicrobianas.....	79
5. 2. Extração de plasmídios das linhagens uropatogênicas. Eletroforese em gel de agarose.....	81
5. 3. Testes de adesão e invasão em células HeLa.....	83

5. 4. Adesão de <i>Escherichia coli</i> em células uroepiteliais <i>in vitro</i> .....	92
5. 5. Produção de sideróforos e fixação do corante vermelho de congo.....	92
5. 6. Produção de hemolisina.....	92
5. 7. Extração de isoenzimas.....	95
5. 8. Determinação do perfil eletroforético do DNA através de Ribotipagem.....	97
5. 9. Mutagênese.....	100
5. 10. Cura de plasmídios através do tratamento com brometo de etídio.....	102
5. 11. Extração de DNA plasmidial (DT e mutantes).....	102
5. 12. Microscopia eletrônica.....	107
6. Discussão.....	108
7. Conclusão.....	121
Abstract.....	122
8. Referências bibliográficas.....	123

---

## Lista de figuras

Figura 1. Gel de agarose (0,7%) da eletroforese de DNA plasmidial das linhagens de <i>E. coli</i> uropatogênicas.....	81
Figura 2. Cultivo de células HeLa, padrões de adesões e adesões de linhagens de <i>E. coli</i> uropatogênicas.....	86
Figura 3. Adesões de linhagens de <i>E. coli</i> uropatogênicas.....	87
Figura 4. Adesões de linhagens de <i>E. coli</i> uropatogênicas.....	88
Figura 5. Adesões de linhagens de <i>E. coli</i> uropatogênicas.....	89
Figura 6. Adesões de linhagens de <i>E. coli</i> uropatogênicas.....	90
Figura 7. Dendograma das dessemelhanças genéticas das linhagens de <i>E. coli</i> uropatogênicas, segundo perfil eletroforético de isoenzimas.....	96
Figura 8. Gráfico representativo do aspecto radiográfico da eletroforese em gel de agarose (0,7%), quando da utilização da enzima Eco R I para a digestão do DNA genômico.....	98
Figura 9. Gráfico representativo do aspecto radiográfico da eletroforese em gel de agarose (0,7%), quando da utilização da enzima Hind III para a digestão do DNA genômico.....	98
Figura 10. Dendograma das dessemelhanças genéticas das linhagens de <i>E. coli</i> uropatogênicas, segundo a técnica de Ribotipagem.....	99

Figura 11. Gel de agarose (0,7%) da eletroforese de DNA plasmidial das linhagens de <i>E. coli</i> uropatogênicas DT e mutantes.....	103
Figura 12. Gel de agarose (0,7%) da eletroforese de DNA plasmidial das linhagens de <i>E. coli</i> uropatogênicas DT e mutantes.....	104
Figura 13. Gel de agarose (0,7%) da eletroforese de DNA plasmidial das linhagens de <i>E. coli</i> uropatogênicas DT e mutantes.....	105
Figura 14. Gel de agarose (0,7%) da eletroforese de DNA plasmidial das linhagens de <i>E. coli</i> uropatogênicas DT e mutantes.....	106
Figura 15. Microscopia eletrônica do teste de invasão em células HeLa da linhagem uropatogênica DT.....	107

## Lista de Tabelas

Tabela I. Antibióticos aos quais as linhagens bacterianas uropatogênicas são sensíveis.....	57
Tabela II. Drogas antimicrobianas às quais as linhagens de <i>E. coli</i> uropatogênicas se mostraram resistentes.....	80
Tabela III. Pesos moleculares dos plasmídios observados no gel de eletroforese de agerose (0,7 %).....	82
Tabela IV. Capacidade de adesão em células HeLa das linhagens de <i>E. coli</i> uropatogênicas.....	85
Tabela V. Capacidade de invasão de células HeLa das linhagens de <i>E. coli</i> uropatogênicas.....	91
Tabela VI. Produção de sideróforo aerobactina, fixação do corante vermelho de congo e produção de hemolisina.....	94
Tabela VII. Adesão em células HeLa dos mutantes da linhagem DT.....	101

## Resumo

Treze linhagens de *Escherichia coli*, isoladas de pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) que apresentavam infecções do trato urinário, foram estudadas com relação às suas características bioquímica (perfil eletroforético de isoenzimas), moleculares (perfil plasmidial, perfil de DNA segundo técnica de ribotipagem-RFLP e mutagenicidade) e de patogenicidade (produção de hemolisina, produção de aerobactina, absorção do corante vermelho de Congo e capacidade de adesão e invasão *in vitro* em células HeLa). Uma linhagem foi mutagenizada com a finalidade de localizar possíveis genes envolvidos com patogenicidade. Os dados obtidos com os perfis eletroforéticos de isoenzimas e ribotipagem permitiram a construção de dendogramas de dessemelhanças das diferentes linhagens. Com exceção à capacidade de adesão nas linhagens celulares cultivadas *in vitro*, nenhuma das demais características pode ser relacionada à patogenicidade.

## 1. Introdução

*Escherichia coli*, o bacilo Gram-negativo mais prevalente na flora humana fecal, habita usualmente o cólon como um comensal e participa dos processos fisiológicos normais do intestino<sup>(92)</sup>. Apesar de ser considerado um organismo comensal, muitas vezes algumas linhagens desta espécie bacteriana atuam como agentes etiológicos causadores de infecção do trato urogenital. Este tipo de infecção é denominado Infecção do Trato Urinário (ITU)<sup>(2,11,13,20,67)</sup>.

Estima-se que 10 a 20% das mulheres e 12% dos homens apresentem, em alguma fase de sua vida, infecções sintomáticas do trato urinário causadas por *E. coli*. Acredita-se, também, que uma frequência ainda maior apresente infecções assintomáticas por este mesmo tipo bacteriano. Algumas vezes, estas bactérias são causadoras de pielonefrite e septicemia levando o paciente à morte<sup>(11,13,22,66)</sup>.

Para que este tipo de linhagem bacteriana possa estabelecer seu processo infeccioso é necessário que a mesma expresse fatores ditos de patogenicidade ou de virulência (FV)<sup>(1,2,15)</sup>.

Entre os FV, destacam-se aqueles que permitem à bactéria reconhecer e colonizar a superfície das células do hospedeiro (adesinas); a produção de toxinas, hemolisinas, colicinas e polissacarídios; expressão de sistemas de captação de ferro a partir de transferrinas do sangue do hospedeiro (enterobactina e a aerobactina) e resistência sérica<sup>(11,13,14,19,66)</sup>.



Mulheres com uma história de infecção recorrente por *E. coli* causadora de ITU demonstraram ser produtoras do receptor galactosil sialosil glicosíngolipídio presentes no sangue, ao contrário daquelas que não tenham tido tal história. O tipo de aderência de linhagens uropatogênicas de *E. coli* às células epiteliais vaginais de mulheres não secretoras deste tipo de receptor são comparáveis às células das secretoras<sup>(89)</sup>.

## 2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivos : (1) estudar as características de patogenicidade (produção de toxinas e hemolisinas, absorção do corante vermelho de congo em meio de cultura e resistência a antimicrobianos) de treze linhagens de *Escherichia coli* isoladas de pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) que apresentavam infecção urinária, sendo uma destas linhagens isolada de um paciente apresentando sintomas clínicos de pielonefrite; (2) estabelecer a estrutura clonal destas linhagens bacterianas através da análise do perfil eletroforético de diferentes isoenzimas; (3) estabelecer a estrutura clonal destas linhagens através da técnica de ribotipagem, (4) determinar o perfil eletroforético de plasmídios e (5) tentar correlacionar a presença deste plasmídio com as características de patogenicidade através de um mecanismo de recombinação genética e/ou eliminação plasmidial ou por meio de mutação com auxílio do transposon TnphoA.

### 3. Revisão Bibliográfica

*Escherichia coli* é um dos agentes infecciosos mais prevalentes em humanos, sendo capaz de causar doenças diarréicas, meningite neonatal e infecções do trato urinário<sup>(30,44,46,66,75,87,93)</sup>.

Análises epidemiológicas<sup>(48)</sup> moleculares de *E. coli* sugeriram a emergência de linhagens uropatogênicas ocultas dentre aquelas presentes na flora intestinal do próprio hospedeiro<sup>(47)</sup>.

As diferentes linhagens de *E. coli* têm sido sorologicamente classificadas por diferentes antígenos O (somático), K (capsular) e H (flagelar), aumentando a variedade de diferentes sorotipos O:K:H. São conhecidos, 171 antígenos O, 100 antígenos K e 57 antígenos H<sup>(97)</sup>. Nem todas as linhagens de *E. coli* provenientes, seja do intestino humano ou de qualquer outro local do organismo, apresentam os três tipos de antígenos ao mesmo tempo. Como consequência desta variação, a identificação sorológica de *E. coli* é freqüentemente incompleta, isto é, pode ter por base somente o antígeno O ou os antígenos O e H. De modo geral, quando por razões diversas, somente os antígenos O ou O:K são identificados e a linhagem é móvel, diz-se que ela pertence a determinado grupo sorológico, por exemplo, O18 ou O18:K76. Este cuidado é necessário porque uma linhagem de determinado sorogrupo O ou O:K pode possuir qualquer um dos 57 antígenos H. Assim sendo, o termo sorotipo é reservado para designar linhagens cujos antígenos H são identificados. Deste modo, pode-se ter

---

sorotipos O:K:H, ou somente O:H, quando falta o antígeno K na linhagem. Em se tratando de linhagens imóveis, isto é, sem antígenos flagelares, elas são geralmente designadas de sorotipo imóvel, sendo usado o sinal (-) para significar a ausência de flagelos. O conceito de biosorotipo é muito importante em *E. coli* porque muitas linhagens associadas a infecções intestinais são biosorotipos típicos<sup>(41,44,47,70,98)</sup>.

O estudo sorológico de linhagens de *E. coli*, utilizando-se todos os soros anti-O, anti-K e anti-H, somente é utilizado quando se procura conhecer a associação de sorogrupos e sorotipos com determinadas patologias ou com outras condições ecológicas. No entanto, somente um número relativamente pequeno de sorotipos O:K:H têm sido relacionados nestes casos. É freqüente a utilização de antígenos preparados somente contra os sorogrupos O de *E. coli* enteropatogênica clássica e enteroinvasora. Os antígenos superficiais de *E. coli* enteropatogênica clássica antigamente eram denominados antígenos K, de variedade B. Atualmente, entretanto, sabe-se que estes antígenos fazem parte do antígeno O. Quanto aos anti-soros H, teriam indicação, mas geralmente não são empregados<sup>(19,47,98)</sup>.

Cerca de 60 dos 171 sorogrupos O de *E. coli* são mais freqüentemente encontrados em associação com o homem. Destes 60, aproximadamente 25 sorogrupos fazem parte da flora normal do intestino, sendo que a maioria corresponde aos sorogrupos associados às infecções urinárias, meningite e bacteremia. Os outros 35 sorogrupos são agentes de infecção intestinal, correspondendo a seis categorias de *E. coli* enteropatogênica denominadas: *E. coli*

enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroaderente (EAEC) e *E. coli* difusa (DAEC)<sup>(43,60,64,84,97)</sup>.

EPEC são os agentes bacterianos mais frequentes de diarreia infantil no Brasil, predominando, sobretudo, nos primeiros meses de vida<sup>(60,79)</sup>. Vários estudos demonstraram que em cada sorogrupo O, somente determinados biosorotipos são regularmente associados à diarreia<sup>(27,70,72)</sup>. Os mecanismos de patogenicidade destes colibacilos envolvem aderência à mucosa intestinal e, talvez, produção de toxinas. EPEC aderem formando microcolônias localizadas em certas áreas das células HeLa cultivadas *in vitro* (adesão localizada)<sup>(83,98)</sup>. A estrutura responsável pela aderência localizada é codificada por plasmídios, tratando-se de fímbrias ou proteína da membrana externa.

Quanto à produção de toxinas, sabe-se, atualmente, que EPEC não produzem as citotoxinas “Shiga-like”, mas podem produzir outros tipos de toxinas. A infecção por EPEC parece localizar-se, preferencialmente no intestino delgado. A razão da grande prevalência de EPEC em crianças com poucos meses de vida ainda permanece desconhecida<sup>(84,92,97,98)</sup>.

O reservatório de EPEC parece ser o próprio homem. O mecanismo de transmissão da infecção, na comunidade, ainda não foi estabelecido. Em hospitais e berçários, a bactéria é transmitida por contato oral-fecal. Crianças com diarreia são a principal fonte de infecção. A infecção é mais frequente e mais grave nas crianças que não se alimentam com leite materno<sup>(59,79)</sup>.

Faz-se o diagnóstico da infecção pelo isolamento de EPEC das fezes em meio de MacConkey. A bactéria é identificada através de provas bioquímicas e, a seguir, pelo emprego de soros polivalentes e monovalentes. Os primeiros são soros de identificação presuntiva, a qual deve ser confirmada por provas de aglutinação em soros monovalentes. Recentemente foi preparada uma sonda molecular que detecta todas as EPEC produtoras de adesão localizada (PCR)<sup>(27,84,98)</sup>.

A terapia com a utilização de antimicrobianos é quase sempre desnecessária nestas infecções. Quando indicada, o antimicrobiano deve ser selecionado pelo antibiograma, uma vez que os biosorotipos mais freqüentemente isolados são resistentes à maioria dos antimicrobianos<sup>(84,97)</sup>.

EIEC correspondem a biosorotipos bem definidos, caracterizados pelos seus antígenos O, ausência quase constante de antígeno flagelar, incapacidade de descarboxilar a lisina e presença de um plasmídio de, aproximadamente, 120-140 megadaltons que transporta os genes responsáveis pela invasão de células epiteliais. A capacidade de proliferar no interior das células e de provocar doença é dependente de genes plasmidiais e cromossômicos. EIEC apresentam a patogenicidade semelhante à de *Shigella* e, sendo assim, a infecção intestinal, causada por estas bactérias é determinada por inflamação e necrose da mucosa do íleo terminal e do cólon. A capacidade invasora de EIEC pode ser demonstrada pelo teste de Serény, que consiste na inoculação da bactéria no olho de cobaia albina. Quando a linhagem é invasora, ela prolifera abundantemente na conjuntiva do olho do

animal, causando intensa cerato-conjuntivite que cura espontaneamente em duas a três semanas, graças aos sistemas de defesa do hospedeiro<sup>(27,92)</sup>.

As infecções intestinais provocadas por EIEC são mais comuns em crianças, com mais de dois anos de idade e em adulto. O reservatório da bactéria é o próprio homem. A infecção é adquirida pela ingestão de água e alimentos contaminados e por contato pessoal.

O diagnóstico é feito pela coprocultura, que consiste no cultivo de EIEC em meios de MacConkey e SS e na caracterização dos sorotipos. Em rotina, os sorotipos são caracterizados por meio de provas bioquímicas e sorológicas. A eletroforese em gel de agarose, para demonstrar o plasmídio de invasão, também pode ser utilizada. Atualmente, a identificação de EIEC pode ser feita com segurança total por meio de sondas moleculares que detectam o gene responsável pela síntese do antígeno de invasão e PCR. O teste de Serény fica reservado para o estudo de linhagens duvidosas<sup>(84,97)</sup>.

As infecções por EIEC costumam curar-se espontaneamente se o indivíduo for mantido com uma boa hidratação e feita a prevenção para que o quadro não evolua para choque<sup>(84)</sup>. Entretanto, quando a gravidade das manifestações exigir tratamento, o antimicrobiano mais indicado é a ampicilina. EIEC, de modo geral, continuam sensíveis à maioria dos antibimicrobianos<sup>(97)</sup>.

ETEC são biosorotipos de *E. coli* que produzem enterotoxinas termolábeis e termoestáveis. As primeiras são conhecidas pelas siglas LTI e LTII e as segundas pelas siglas STa e STb. As

---

linhagens de ETEC isoladas de seres humanos raramente produzem as enterotoxinas LTII e nunca a STb. A enterotoxina LTI é uma proteína imunogênica, com peso molecular de 100.000 daltons. Sua molécula consiste de 5 subunidades periféricas (subunidades B) e uma central (subunidade A). As subunidades B fixam a toxina à superfície da célula epitelial e a A, altera o metabolismo celular. O receptor da enterotoxina LTI, ao nível do enterócito, é o gangliosídeo GM-1. Uma vez produzida por *E. coli* e fixada ao enterócito pelas subunidades B, a subunidade A penetra na célula, ativando a adenil-ciclase, o que provoca aumento de AMPc. O aumento desta substância, no interior da célula, determina o bloqueio da absorção de sódio pelas células apicais da mucosa, estimulando ainda a secreção de potássio e carbonato pelas células das criptas. Em consequência destas alterações, no metabolismo hidrossalino da mucosa, ocorrerá aumento da quantidade de líquido na luz intestinal e conseqüentemente diarreia. A enterotoxina LTI apresenta grande similaridade à enterotoxina produzida pelo *Vibrio cholerae*<sup>(4,27,98)</sup>.

A enterotoxina STa, ao contrário da enterotoxina LTI, é uma pequena molécula, contendo apenas 17-19 aminoácidos, não imunogênica, com peso molecular de, aproximadamente, 5.000 daltons. Trata-se, também, de uma potente toxina, no que diz respeito a sua capacidade de alterar o metabolismo hidrossalino da mucosa intestinal. Sua atividade decorre de sua capacidade de ativar a guanil-ciclase, o que provoca acúmulo de GMPc nas células da mucosa intestinal<sup>(27,92)</sup>.



Além de produzir as enterotoxinas LTI e STa, as ETEC apresentam fimbrias, cuja função é fixá-las à mucosa do intestino delgado. Estas fimbrias, também conhecidas como fatores de colonização ou adesão, são proteínas imunogênicas<sup>(92)</sup>.

A patogênese da infecção por ETEC pode ser descrita resumidamente da seguinte maneira : depois que a bactéria atravessa a barreira gástrica, ela se fixa à mucosa do intestino delgado, por meio de seu fator de colonização. Uma vez fixada, começa a proliferar e a produzir a enterotoxina, dependendo do seu fenótipo enterotoxigênico. A toxina ou toxinas formadas produzem, então, diarreia aquosa. Deve-se notar que a infecção intestinal por ETEC é superficial, a bactéria não penetra no epitélio intestinal. Por esta razão, as fezes dos pacientes afetados não apresentam leucócitos, sangue ou muco<sup>(84,92)</sup>.

Ao contrário do que se pensava inicialmente, ETEC correspondem a número relativamente pequeno de sorotipos, alguns produzindo somente a enterotoxinas LTI, outros somente a STa e ainda outros, as duas enterotoxinas. Até o presente, não foram encontrados fatores de colonização nos sorotipos de ETEC que produzem somente a enterotoxina LTII<sup>(97)</sup>.

As enterotoxinas LTI e STa, bem como os fatores de colonização, são codificadas por genes localizados em plasmídios, os quais são designados por plasmídios *ent*. As infecções por ETEC ocorrem tanto em crianças como em adultos. Esta bactérias representam ainda uma das principais causas da diarreia do viajante. Embora algum tempo atrás se pensasse diferentemente, hoje não há

dúvida de que ETEC que causam infecção no homem têm como reservatório o próprio homem. A infecção se transmite pela ingestão de água e alimentos contaminados. Há evidências de que a bactéria também possa ser transmitida por contato pessoal, em berçários e enfermarias de pediatria<sup>(50)</sup>.

O diagnóstico da infecção por ETEC se faz pela pesquisa das enterotoxinas LTI e STa, nas linhagens de *E. coli* isoladas, das fezes do paciente. A enterotoxina LTI pode ser demonstrada em cultura de tecidos e por uma variedade de testes imunológicos como aglutinação de hemácias sensibilizadas pela toxina, precipitação em gel e outras<sup>(59)</sup>.

A pesquisa da enterotoxina STa é, geralmente, feita por inoculação de camundongos recém-nascidos (Teste de Dean) com sobrenadantes das culturas. Uma maneira de verificar se uma linhagem de *E. coli* produz enterotoxina, consiste em pesquisar na bactéria os genes que codificam as toxinas LTI e STa, por meio de sondas moleculares<sup>(58,97)</sup>.

Como as demais infecções intestinais causadas por *E. coli*, as infecções por ETEC também dispensam antibioticoterapia, na maioria das vezes. Entretanto, quando houver indicação, o antimicrobiano deve ser selecionado pelo antibiograma, uma vez que ETEC podem apresentar resistência múltipla com relativa freqüência.

A principal manifestação clínica provocada por EHEC é a diarreia sanguinolenta. A doença, denominada colite hemorrágica, foi descrita recentemente nos Estados Unidos e Canadá, associada à

ingestão de hamburgers contaminados com *E. coli*. EHEC produzem duas citotoxinas, conhecidas pelas designações “Shiga-like toxin” I e II (SLTI e SLTII) ou verotoxinas I e II (VTI e VTII), ambas codificadas por bacteriófagos lisogênicos. Vários estudos<sup>(84,97)</sup> sugerem que estas toxinas são as substâncias responsáveis pela hemorragia intestinal e também pela síndrome hemolítica-urêmica que, às vezes, acompanha a colite hemorrágica. EHEC aderem à mucosa do intestino delgado por meio de fimbrias codificadas em plasmídios<sup>(4,83,84)</sup>.

A identificação de EHEC é feita pela dosagem das toxinas em cultura de tecidos (células Vero ou HeLa) ou através de sondas moleculares que detectam os genes que as codificam.

O tratamento para infecções por EHEC não tem sido estabelecido. Há controvérsia sobre o mesmo porque alguns pesquisadores têm sugerido que a terapia com antibiótico pode aumentar a probabilidade da síndrome hemolítica-urêmica (HUS). No entanto, esta hipótese parece não ter fundamento ou uma razão plausível. Pacientes que desenvolvem HUS devem ser clinicamente piores do que aqueles que são tratados com antibióticos. O maior desafio é tratar complicações das infecções por EHEC, como HUS, onde a diálise é necessária caso ocorra a falência renal. A recuperação é usualmente completa, embora uma parcela dos pacientes possa apresentar seqüelas, incluindo falha renal crônica<sup>(84)</sup>.

EAEC são linhagens correntemente definidas como linhagens de *E.coli* que não secretam enterotoxinas LT ou ST e que aderem às células de cultura celular como Hep-2<sup>(43)</sup>.

A patogênese da infecção por EAEC não está bem entendida, entretanto, uma lesão histopatológica característica e vários possíveis fatores de virulência têm sido descritos. As linhagens de EAEC acentuam a secreção de muco pela mucosa, fixando a bactéria em um biofilme mucoso. A habilidade de EAEC em se unir ao muco tem sido demonstrada *in vitro* e em voluntários contaminados por EAEC, que desenvolveram uma diarreia predominantemente mucosa. O papel do excesso da produção de muco não está bem definido, entretanto, a formação de um biofilme denso deve ser relacionado com a diarreagenicidade do organismo e, talvez, a sua habilidade em causar uma colonização persistente<sup>(43)</sup>.

Evidências experimentais sugerem que a infecção por EAEC está acompanhada por efeitos citotóxicos na mucosa intestinal. A lesão foi caracterizada pela necrose hemorrágica da mucosa e leve resposta inflamatória com edema e infiltração mononuclear da submucosa. Esta destruição mucosa tem sido demonstrada em autópsia do íleo de pacientes que morreram de diarreia persistente causada por EAEC<sup>(43)</sup>.

A aderência deste tipo de *E.coli* foi observada como sendo por meio de fimbrias, porém não se conseguiu determinar precisamente qual o seu tipo.

Um número crescente de estudos<sup>(43)</sup> tem reportado a associação de EAEC com diarreia em populações em desenvolvimento, mais proeminentemente em associação com diarreia persistente (14 dias ou mais). Esta associação parece ser geográfica. Países como

Índia, Brasil, México, Venezuela, Chile, Bangladesh e Irã têm relatado casos freqüentes de diarreia persistente.

Embora a maioria dos relatos têm citado EAEC como causadora de diarreia endêmica esporádica, outros têm descrito a ocorrência de uma epidemia associada à este tipo bacteriano. Talvez, mais significativa do que a associação de EAEC com diarreia persistente seja a sua associação a um retardamento do crescimento em crianças, verificado em estudos realizados no Brasil e na Austrália<sup>(43)</sup>.

As características clínicas da diarreia por EAEC vêm sendo melhor definidas em casos de endemia, os quais são descritos como diarreia aquosa, mucóide e secretória, mal estar com baixo grau de febre e fezes sanguinolentas ou mucóides.

A detecção da infecção por EAEC é diagnosticada, definitivamente, através do isolamento de *E. coli* das fezes dos pacientes<sup>(43)</sup>.

EPEC, EIEC, ETEC, EHEC e EAEC, raramente causam infecções extra-intestinais. Estas infecções são causadas por linhagens de *E. coli* dos sorogrupos que participam da flora normal dos intestinos, e podem se localizar em qualquer órgão ou tecido do corpo humano. Entretanto, 3 grupos de infecções são mais freqüentes: infecções urinárias, meningite e bacteremia. *E. coli* é a causa mais comum de infecção urinária, sendo responsável por 90 %, ou mais, das infecções adquiridas<sup>(27,60)</sup>.

O diagnóstico das infecções extra-intestinais é feito pelo isolamento e posterior identificação bioquímica da linhagem de *E. coli*.

Não há vantagem, do ponto de vista médico, em realizar a identificação sorológica da amostra. O antimicrobiano a ser utilizado no tratamento deve ser selecionado tendo-se por base não apenas a sensibilidade do agente etiológico, mas também a concentração que atinge no local de infecção<sup>(39,72)</sup>.

Fatores de resistência a antimicrobianos, bacteriocinas, funções metabólicas específicas, tais como enzimas envolvidas na degradação de compostos xenobióticos, proteínas envolvidas na secreção, como fatores de patogenicidade bacteriana podem ser codificados por elementos genéticos móveis<sup>(75)</sup>.

A Infecção do Trato Urinário (ITU) é a forma mais comum de infecção extraintestinal de *E. coli* e esta bactéria é a causa mais comum de ITU. *E. coli* é o agente causal em, aproximadamente, 80% das infecções comuns do trato urinário que se manifestam através de três formas clínicas : bacteriúria assintomática, cistite e pielonefrite. Estas infecções ocorrem em homens e mulheres e em diferentes idades. *E. coli* isolada de pacientes com ITU muitas vezes expressam propriedades específicas que não estão presentes nas linhagens da flora fecal comensal<sup>(75)</sup>.

A defesa do hospedeiro contra a ITU inclui tanto inflamação local como resposta imune mediada por anticorpos à bactéria patogênica causadora das infecções. Estudos histológicos em camundongos têm mostrado que existe integração destas duas respostas protetoras durante resolução espontânea de uma ITU causada por *E. coli*. Células fagocitárias foram observadas na urina dentro de

uma semana após instalação intravesical de linhagens de *E. coli* viáveis, e o infiltrado inicial consistiu primariamente de neutrófilos polimorfonucleares seguidos pelo aparecimento de células inflamatórias mononucleares<sup>(40)</sup>. Anticorpo anti-*E. coli* facilita a rápida fagocitose das bactérias pelos fagócitos<sup>(39)</sup>. Estudos com primatas não humanos têm demonstrado que níveis de anticorpos urinários e séricos para *E. coli* aumentam durante as primeiras duas semanas seguindo a infecção por *E. coli* causadoras de cistite e que este aumento precede a resolução espontânea da infecção. Estudos com animais têm demonstrado que piúria indicativa de uma resposta inflamatória local ocorre primariamente em ITU<sup>(40)</sup>.

O papel do lipopolissacarídeo (LPS) é o de induzir uma resposta inflamatória local na bexiga e isto tem sido foco de várias investigações recentes.

Estudos utilizando modelo animal (camundongo) de ITU causada por *E. coli* têm indicado que citocinas induzidas na resposta ao LPS bacteriano atuam potencializando a resposta inflamatória<sup>(39)</sup>.

Nos anos 80, Goebel *et al.*<sup>(93)</sup> analisaram linhagens de *E. coli* uropatogênicas que eram capazes de produzir fatores de virulência específicos, incluindo  $\alpha$ -hemolisina (*hly*). Tornou-se óbvio que os genes *hly* estavam localizados em grandes regiões cromossômicas do DNA que foram denominadas de “ilhas de hemolisina”. Estudos posteriores revelaram que genes adicionais envolvidos no uropatogenicidade estavam localizados nestas ilhas (em geral, genes responsáveis pela expressão da fimbria P), que foram,

consecutivamente, renomeadas “ilhas de patogenicidade” (*Pais*). A *Pais* pode ser definida conforme o seguinte critério : carrear genes de virulência, estar presente em linhagens patogênicas e ausente ou esporadicamente presente em linhagens menos patogênicas, apresentar porcentagem diferente G+C da média do genoma, ocupar grandes regiões cromossômicas ( $> 30$  kb), representar unidades genéticas distintas, muitas vezes flanqueadas por repetições diretas, estar associada à genes de RNAt e/ou às seqüências de inserção, apresentar seus codificadores de integrases, transposases, origens de replicação plasmidial, o que confere estabilidade à sua organização<sup>(12,35,93)</sup>.

As ilhas de patogenicidade são encontradas tanto em bactérias Gram-negativas como nas Gram-positivas e estão presentes no genoma de linhagens patogênicas, mas ausentes ou raramente presentes em variantes não patogênicos das mesmas espécies patogênicas<sup>(35,93)</sup>.

*Pais* de *E. coli* uropatogênica possuem a tendência em sofrer deleção com alta frequência, assim como sofrer a ocorrência de duplicações. Estas, muitas vezes, estão integradas à loci de RNAt, os quais devem representar sítios alvo para a integração destes elementos. Sítios de ligação de bacteriófagos e genes crípticos na *Pais*, que são homólogos aos genes do fago integrado, plasmídios originados de replicação ou elementos da seqüência de inserção (IS), indicam que estes elementos genéticos particulares foram capazes de se dissipar entre as populações bacterianas por transferência genética horizontal, um processo que contribui para a evolução genética<sup>(35,91)</sup>.



Alguns estudos<sup>(51)</sup>, indicam uma possível correlação entre os diversos fatores de virulência. Kuhar *et al.*<sup>(51)</sup> (1998) demonstraram que um fator citonecrótico nem sempre está associado à produção de hemolisina, por exemplo UPEC.

Do ponto de vista evolutivo, não somente a aquisição de seqüências de genes homólogos, mas também a formação de deleções, representa uma maior plasticidade do genoma<sup>(35)</sup>.

Estudos epidemiológicos em bactérias isoladas a partir de ITU de humanos, identificaram associações entre certas características bacterianas e estas infecções. A confirmação da correlação entre estas características e a presença da infecção, no entanto, requerem modelos animais que nem sempre estão disponíveis. A escolha de tal modelo pressupõe que exista, ao menos, certa similaridade entre as células do hospedeiro original e aquelas do modelo a ser empregado, para que haja expressão de pelo menos parte dos genes responsáveis pelos FV<sup>(13,15,22,105)</sup>.

Diferentes linhagens de *Escherichia coli* causadoras de ITU podem apresentar um ou mais tipos de FV.

A adesão a substratos sólidos é uma propriedade comum a muitos microrganismos patogênicos, incluindo-se entre estes, os vírus e as bactérias. Esta adesão é considerada o primeiro passo necessário à colonização das superfícies mucosas do hospedeiro e precedente à infecção em muitas situações<sup>(2,11,13,14,15,18,105)</sup>. No final dos anos 70<sup>(13)</sup>, foi reconhecido, pela primeira vez, que linhagens de *E. coli* causavam ITU e que estas linhagens tinham a capacidade de adesão à células

uroepiteliais. Esta adesão era afetada pela manose, adesão característica de bactérias expressando fimbrias tipo 1, denominada adesão D-manose sensível (MSHA). No entanto, também é possível que a adesão não seja bloqueada pelo açúcar D-manose. Este tipo de adesão é denominada adesão D-manose resistente (MRHA). Foi verificado que ambos os tipos de adesões eram mediados por fimbrias<sup>(1,11,13,14,75)</sup>.

Um dos FV cruciais para a colonização uroepitelial da superfície mucosa é a capacidade que estas linhagens possuem de expressar, em sua superfície, estruturas moleculares protéicas, chamadas de adesinas ou fimbrias, que estão relacionadas à adesão às células do hospedeiro. Estudos epidemiológicos de adesinas em *E. coli* uropatogênica têm sido, freqüentemente, baseados em testes de hemaglutinação, aglutinação de látex ou ELISA<sup>(75)</sup>. Entretanto, a expressão das adesinas ou fimbrias pode ser influenciada pelas condições de cultivo. Desde que os operons *pap* e *pil*, requeridos para a expressão da adesinas P e tipo 1, respectivamente, foram clonados, a hibridização do DNA tem se tornado um importante método para o estudo de adesinas<sup>(63)</sup>.

As fimbrias são estruturas morfológica e funcionalmente distintas dos flagelos, os quais são mais grossos, mais longos e, aparentemente, mais flexíveis, sendo responsáveis pela motilidade, mas não por aderência. As fimbrias são compostas de subunidades polimerizadas, repetidas em hélice, com 3 a 1/8 de subunidades por

volta<sup>(14)</sup> e que ligam-se a receptores específicos existentes na superfície das células dos hospedeiros<sup>(7,14,72)</sup>.

As fimbrias de bactérias uropatogênicas, incluindo *E. coli*, são codificadas por genes cromossômicos e desempenham um papel de grande importância nos mecanismos de aderência<sup>(63)</sup>.

Fímbria tipo 1, a qual é encontrada na superfície da maioria de linhagens de *E. coli*, (patogênicas ou não), reconhecem os receptores que estão presentes nas paredes de vasos sanguíneos e nos eritrócitos algumas espécies animais<sup>(14,73)</sup>.

A adesão mediada pelas fimbrias tipo 1 é bloqueada por D-manose ou  $\alpha$ -metil manose e por concanavalina A, mas não por soluções de outros monossacarídeos ou seus derivados, indicando que o receptor para fimbrias tipo 1 é, provavelmente, uma estrutura alongada, já que manosídeos com um grupo aromático ligado à posição alfa, trissacarídeos e oligossacarídeos ramificados, que contêm  $\alpha$  1-3 manosídeo ligado, são melhores inibidores de adesão de fímbria tipo 1 do que são as unidades de D-manose ou  $\alpha$ -metil manose somente. Nitrofenol e seus derivados inibem a adesão de fímbria tipo 1 ao epitélio celular mas não a hemaglutinação de eritrócitos de cobaia ou humanos, sugerindo que o receptor para fímbria tipo 1 no epitélio celular, mas não o de eritrócitos, possua um componente hidrofóbico importante<sup>(44,73)</sup>.

Receptores para fimbrias tipo 1 estão presentes em eritrócitos de muitas espécies. No homem, a bactéria com fímbria tipo 1 adere às células epiteliais bucais, células intestinais e células

vaginais, sugerindo um possível papel das fimbrias tipo 1 em *E.coli*, na sua colonização bucal, intestinal e vaginal<sup>(2,14,43)</sup>.

Receptores para fimbrias tipo 1 estão presentes nas paredes dos vasos sangüíneos e nas camadas musculares, mas não no epitélio da bexiga humana. Bactérias que expressam fimbrias tipo 1 unem-se ao epitélio uretral e às linhagens celulares de rim humanos, de macacos, de ratos e de porcos.

Este tipo de fimbria promove a adesão e a fagocitose por leucócitos polimorfonucleares humanos, anticorpos antifimbriais e soluções de manose sendo que  $\alpha$ -metil-manosídeo bloqueiam estas interações. Quando presente em bactérias não opsonizadas ou hidrofílicas, estas fimbrias têm um papel mais importante na adesão a fagócitos, liberação de grânulos e fagocitose do que quando elas estão presentes em organismos opsonizados ou hidrofóbicos<sup>(14,65,75,102)</sup>.

Como outros tipos de fimbrias de *E. coli*, as fimbrias tipo 1 são codificadas por um grupo de genes que incluem genes para a subunidade estrutural, uma adesina, várias proteínas acessórias e proteínas reguladoras. A adesina (pilE-FimH) e a subunidade estrutural (pilA-FimA) podem ser expressas independentemente uma da outra. A adesina está localizada na extremidade da fimbria e continua ao longo do eixo da fimbria. A subunidade FimH reconhece a porção da D-manose localizada terminalmente na união celular e secreta glicoproteínas. Isto também foi demonstrado para a união manose sensível a epítomos peptídicos não glicosados. Interações com tais receptores permitem à bactéria fimbriada tipo 1 se ligar a uma série de

células, incluindo eritrócitos, células epiteliais, granulócitos e macrófagos<sup>(19)</sup>.

As fimbrias tipo 1 são hidrofóbicas possuindo, predominantemente, amino-ácidos apolares. São expressas por cepas fecais e urinárias em proporções similares, ocorrendo em cerca de 71% dos isolados de pacientes com cistite e em cerca de 58% dos isolados de pacientes com bacteriúria assintomática<sup>(44)</sup>. Perugini e Vidotto (1996)<sup>(75)</sup> encontraram em seus estudos a frequência de 100 % nos casos de pielonefrite e 87,5 % nos casos de cistite para este tipo de fimbria. E, segundo os relatos de Leathart e Gally (1998)<sup>(56)</sup>, 80% das *E. coli* uropatogênicas expressam a fimbria tipo 1.

A aderência mediada por este tipo de fimbria tem sido indicada como sendo a responsável pela indução de inflamação. Estudos *in vitro* têm demonstrado que bactéria fimbriada do tipo 1 se une aos fagócitos e induzem a proliferação e diferenciação de células humanas B, assim como a degranulação de mastócitos e liberação de histamina no camundongo. Connell *et al.* (1996)<sup>(19)</sup> demonstraram que a *E.coli* estimula as células urinárias do trato epitelial a secretar interleucina 8 e interleucina 6. Linhagens com fimbrias tipo 1 induziram a secreção de níveis mais altos de interleucina 8 e interleucina 6 do que isógenos não fimbriados. Portanto, tal fimbria deve contribuir para aumentar a resposta inflamatória em pacientes infectados com *E.coli* positiva para fimbria tipo 1<sup>(19,75,102)</sup>.

Pesquisas recentes têm demonstrado que a fimbria tipo 1 é expressa por mais de 90% de *E. coli* uropatogênicas<sup>(75)</sup>.

Embora a fimbria tipo 1 seja capaz de reconhecer vários receptores como fibronectina, laminina, moléculas de adesão de leucócitos CD 11 e CD 18 e uromodulina (35-39), estes não estão presentes no tecido uroepitelial e, portanto, não servem como receptores de fimbria neste tecido. Entretanto, a uromodulina, uma proteína manosilada derivada do rim, presente em uma concentração extraordinariamente alta na urina (20 a 30 mg/L), deve ter um papel defensivo. Ela pode saturar todos os sítios de união de manose da fimbria tipo 1, bloqueando potencialmente a união bacteriana ao uroepitélio. Outro mecanismo de defesa que possivelmente bloqueie esta união envolve a camada mucosa que recobre a superfície uroepitelial. Foi demonstrado em modelos animais que *E. coli* fimbriada com tipo 1 não pode se unir à superfície normal da bexiga que está coberta por uma camada intacta de muco<sup>(104)</sup>. O dano a esta camada mucosa permite que a bactéria tenha acesso aos receptores do uroepitélio subjacente, propiciando a aderência. Defeitos nestes mecanismos de defesa, que acarretam os efeitos combinados da uromodulina solúvel e do muco uroepitelial, devem conduzir à aderência de *E. coli*, via interação do receptor FimH à superfície uroepitelial<sup>(19,104)</sup>.

Linhagens de *E. coli*, causadoras de ITU podem apresentar em sua superfície outros tipos de fimbrias, além da tipo 1.

A fimbria denominada P (por aglutinar hemácias humanas obtidas a partir de indivíduos do grupo sanguíneo P) é uma fimbria MRHA constituída de uma subunidade maior (PapA), de 19,5 kDa e de

três subunidades menores (PapE, PapF, PapG), com 16,5 kDa, 15 kDa, 17,5 kDa, respectivamente<sup>(7,13,14)</sup>.

O grupo P de antígenos sangüíneos são uma família de oligossacarídios contendo uma parte terminal ou interna Gal $\alpha$ (1-4) Gal $\beta$ (Gal-Gal) que está presente em certas células de mamíferos, primariamente como componente carboidrato de glicosfingolipídios<sup>(42)</sup>. Vários estudos<sup>(44,53)</sup> confirmam que glicolipídios que contém a porção Gal-Gal são receptores para adesão de linhagens de *E. coli* e que esta porção é o maior determinante desta união. Células uroepiteliais de homens e mulheres têm um receptor de densidade similar para linhagens com fimbria P, como células uroepiteliais escamosas e de transição<sup>(45,54)</sup>.

A fimbria P parece ser a mais comumente encontrada em linhagens de *E. coli* isoladas a partir de casos de ITU<sup>(13)</sup>, sendo expressa por, aproximadamente, 70% das linhagens causadoras de pielonefrite em humanos, tanto em crianças como em adultos. Segundo Bingen<sup>(5)</sup>, este tipo de fimbria é encontrada em 80%, 30% e 20% das linhagens de pacientes com pielonefrite, cistite e bacteriúria assintomática, respectivamente. As fimbrias P são encontradas somente em 30% das linhagens isoladas de pacientes com pielonefrite associada a pacientes imunocomprometidos, com refluxo vesico-uretral, anormalidades anatômicas do trato urinário ou que tenham sofrido procedimentos invasivos recentes do trato urinário<sup>(5)</sup>.

O grande número de receptores para fimbria P no tecido renal de humanos, com pielonefrite aguda sugere que esta fimbria é

necessária para colonização e invasão do trato urinário superior. No entanto, a proporção de linhagens de *E. coli* que expressam fimbrias P é similar entre o trato urinário superior e o inferior, dentro de cada categoria clínica<sup>(54)</sup>.

Kuhar *et al.* (1998)<sup>(52)</sup> estudaram linhagens de *E. coli* de pacientes com e sem infecções intestinais. Uma alta porcentagem destas linhagens que expressavam fimbria P foi encontrada com uma também alta porcentagem de linhagens isoladas de infecções intestinais. Uma correlação foi observada entre colicinogenicidade e produção de fimbria P<sup>(52)</sup>.

Estudos realizados<sup>(103)</sup> por Vranes, concluíram que as linhagens de *E. coli* que expressaram este tipo de fimbria apresentaram uma adesão significativamente superior em células animais cultivadas *in vitro*.

Soderhall *et al.* (1997)<sup>(87)</sup> tentaram induzir uma proteção imune em primatas, que não haviam tido infecção urinária, simulando uma infecção com linhagens P fimbriadas. Concluíram que não era possível induzir esta proteção uma vez que ocorria a mutagênese destas linhagens<sup>(85)</sup>.

Muitos isolados urinários, que apresentam MRHA na ausência de fimbrias P, hibridizam com sondas específicas de DNA para genes que expressam adesinas não fimbriadas. Esta família de adesinas (Dr, por reconhecer hemácias do grupo sanguíneo Dr) inclui a adesina 075X, a adesina afimbrial I (AFA I) e adesinas AFaIII; todas já identificadas nas linhagens urinárias<sup>(43)</sup>. As adesinas da família Dr



estão associadas à *E. coli* patogênica causadora de infecção no trato urinário e diarreia. Tais adesinas têm identidade genética comum e reconhecem epítomos receptores distintos do fator de diminuição de aceleração (DAF), um fosfatidilinositol ligado a uma glicoproteína de membrana envolvida na regulação da cascata do Complemento que contém o grupo humano do antígeno sanguíneo Dr<sup>(44,49)</sup>. Linhagens com adesinas Dr específicas aglutinam eritrócitos humanos Dr positivos mas falham para aglutinar eritrócitos Dr negativos que têm necessidade de DAF. A designação da adesinas Dr é baseada neste antígeno do grupo sanguíneo específico. Estas adesinas são estruturalmente distintas das outras adesinas de *E. coli*, já que parecem com uma malha fina enrolada ou como uma camada filamentosa capsular na superfície celular, não sendo, muitas vezes, visíveis por microscopia eletrônica<sup>(16,33,44,45,676)</sup>.

Diferentes linhagens de *E. coli* que expressam adesinas Dr parecem reconhecer diferentes porções do antígeno Dr, indicando haver uma variedade de fimbrias Dr<sup>(44,76)</sup>. Hemaglutininas Dr unem-se a numerosos sítios dentro do trato urinário, incluindo o interstício renal, cápsula de Bowman, membrana tubular, células epiteliais transitórias uretrais e células epiteliais exfoliadas na urina. O receptor DAF da adesina Dr está também presente na superfície de leucócitos humanos polimorfonucleares (PMN)<sup>(46)</sup>.

A adesina Dr medeia a aderência e aglutinação dos PMN e não é antagonizada por inibidores de outras adesinas tais como fimbrias tipo 1 e fimbria P não sendo, também, afetada pela ausência

de receptores PMN para fimbria tipo 1. Em contraste, a aderência a PMN mediada por hemaglutinina Dr foi especificamente antagonizada pelo cloranfenicol. Estas observações sugerem que o receptor no PMN para a hemaglutinina Dr e, por extensão ao restante da família Dr, é bioquimicamente similar ao receptor para estas adesinas no eritrócito. Esta conclusão é consistente com a hipótese que DAF, que está presente nos PMN e é o receptor da adesina Dr nos eritrócitos e nos tecidos humanos, é o receptor da adesina Dr nos PMN. Tal fato não resulta em crescimento significativo do poder de patogenicidade bacteriano, mas sugere que o impedimento de aderência aos fagócitos não deve fornecer uma vantagem de sobrevivência à fase variante de adesina Dr negativa. O número de organismos unidos por PMN varia dramaticamente dependendo da adesina recombinante expressada<sup>(34,46)</sup>.

Os operons dos diferentes tipos de adesinas da família Dr estão organizados similarmente. Estes operons são constituídos por cinco genes próximos, sendo um deles o gene para a hemaglutinina estrutural<sup>(11,13,14,22,102)</sup>.

Em contraste com a fimbria P, hemaglutininas da família Dr estão associadas a casos de cistite<sup>(12)</sup>.

Fímbrias S e F1C estão intimamente relacionadas a algumas cepas urinárias. A fimbria S, assim chamada porque se liga a resíduos terminais específicos sialil-galactosídeo, medeia o tipo X de MRHA de eritrócitos humanos, uma propriedade que pode ser explorada para separar células bacterianas produtoras de fimbria S das outras não produtoras. A expressão da fimbria S exhibe variação de fase.

Receptores para esta fimbria são encontrados nas células epiteliais dos túbulos proximal e distal, ductos coletores e glomérulos, no interstício renal e no endotélio vascular renal. Em humanos, linhagens que expressam fimbrias S estão mais relacionadas com meningite e bacteremia do que com ITU<sup>(46)</sup>.

Fimbrias F1C não medeiam hemaglutinação ou aderência epitelial urocélular, mas podem ligar-se às células epiteliais bucais e a alguns tecidos renais, embora com um receptor (não manose sensível) específico desconhecido<sup>(44)</sup>.

Os genes codificadores das fimbrias S e F1C apresentam-se estruturados em uma região comum, com uma subunidade estrutural da adesina, e várias proteínas acessórias presentes no cromossomo. A adesina está localizada na extremidade da fimbria S e, como fimbrias P e tipo 1, tem uma sequência de aminoácidos diferente da subunidade estrutural<sup>(44,51)</sup>.

As fimbrias M e G pertencem ao grupo X. A adesina M une-se especificamente a uma sequência terminal do amino-ácido do antígeno do grupo sanguíneo M, encontrado na glicoforina A<sup>(46)</sup>.

A fimbria G une-se a uma N-acetilglicosamida, aglutinando eritrócitos após tratamento com endo- $\alpha$ -galactamase para exposição de resíduos GlcNAc internos<sup>(42)</sup>.

Outros fatores de virulência potenciais que podem ser encontrados em *E.coli* obtidas a partir de infecção do trato urinário são aerobactina, hemolisina, polissacarídeo capsular e resistência sérica<sup>(46)</sup>.

Certas linhagens de *E. coli* são capazes de elaborar fatores tóxicos que podem causar multinucleação e aumento de tecidos de cultura e necrose em pele de ratos<sup>(28)</sup>. Um destes fatores foi descrito primeiramente em 1983 e recebeu a denominação de Fator Citotóxico Necrozante (CNF). A produção do CNF foi reconhecida em linhagens de *E. coli* que produziam diarreia, infecção urinária e bacteremia em humanos. O papel do CNF na patogênese de infecções por *E. coli* não está definido, mas as propriedades necrótica e letal *in vivo* e a habilidade em alterar o citoesqueleto das células de cultura celular *in vitro* sugerem que este fator realmente seja de virulência<sup>(28)</sup>.

O ferro é um composto essencial à sobrevivência de todo organismo vivo. Por isso, os microrganismos apresentam sistemas chamados de sideróforos, que são capazes de obter o ferro presente na célula do hospedeiro para a sua sobrevivência<sup>(46)</sup>.

Aerobactina é um sideróforo e é uma pequena molécula formada da ligação de duas moléculas de lisina e uma de citrato. Linhagens com o sistema produtor de aerobactina têm um crescimento melhor em condições de baixas concentrações de ferro, incluindo soro e urina diluída. *E. coli* pode usar, mas não sintetizar ferro, e não pode transportar citrato suficiente para suportar crescimento em baixas condições de ferro na ausência de outros sideróforos. Outro tipo de quelante de ferro existente em *E. coli* é o denominado enterobactina. Em pH neutro, porém, esta substância possui uma afinidade por ferro menor do que aquela apresentada pela aerobactina<sup>(46)</sup>.

A aerobactina é codificada por um operon constituído por cinco genes, dos quais quatro genes codificam as enzimas necessárias à síntese de aerobactina e o quinto gene codifica um receptor protéico de membrana externa. A produção de aerobactina é regulada pela concentração de ferro intracelular, através do produto do gene *fur*. Em baixas concentrações de ferro, o repressor de *fur* é liberado da região promotora fazendo com que ocorra a transcrição do mesmo<sup>(44)</sup>.

Os genes para a síntese de aerobactina são encontrados tanto em plasmídios como no cromossoma bacteriano, com a localização cromossômica sendo a predominante entre os isolados clínicos humanos. A associação de expressão de aerobactina e fimbria P é comumente encontrada entre aquelas linhagens isoladas de pacientes apresentando ITU e urosepsia, embora linhagens obtidas a partir de pacientes apresentando apenas urosepsia expressem apenas aerobactina. Parece haver, também, uma associação na expressão de aerobactina e hemolisina<sup>(44)</sup>.

O sistema aerobactina é mais comum entre linhagens de *E. coli* isoladas de pacientes com pielonefrite, cistite ou bacteremia, evidências estas que sugerem a contribuição da aerobactina para a virulência dentro e fora do trato urinário<sup>(45)</sup>.

Linhagens hemolíticas são, normalmente, mais virulentas que as não hemolíticas porque a hemolisina libera ferro do hospedeiro através da ruptura dos eritrócitos e outros tipos de células<sup>(66)</sup>.

Vaisanen-Rhen *et al.* (1981)<sup>(99)</sup> e Cavalier e Snyder (1982)<sup>(66)</sup> correlataram a produção de hemolisina com a patogenicidade de

linhagens uropatogênicas de *E. coli*. Mendonça *et al.*<sup>(66)</sup>, no entanto, concluíram que esta característica não é essencial para a patogenicidade<sup>(66,97,88)</sup>.

A toxina citolítica protéica secretada pela maioria das células hemolíticas de *E. coli*, é conhecida como  $\alpha$ -hemolisina. A  $\alpha$ -hemolisina destrói eritrócitos de todos os mamíferos<sup>(46)</sup>. A substância presente no sobrenadante de culturas é composta quase que totalmente por proteína, com alguma evidência da existência de um fosfolipídio ou de um componente lipolissacarídico.

Para exercer seu efeito, as moléculas de hemolisina inserem-se no lipídio da membrana, produzindo canais de cálcio seletivos de ampla condutância, com diâmetro de 2 nm e que aumentam a permeabilidade das membranas dos eritrócitos ao cálcio, potássio, manitol e sacarose<sup>(46)</sup>.

Em adição à lise de eritrócitos, a hemolisina é tóxica a uma variedade de células do hospedeiro, o que, provavelmente, contribui para a ocorrência da inflamação, injúria tecidual e diminuição das defesas do hospedeiro.

A produção de hemolisina é codificada por quatro genes do operon denominado *hly*, o qual está localizado no cromossomo de isolados de *E. coli* de humanos, em contraste à localização plasmidial que é comum às cepas encontradas em animais. A proteína HlyA (110kDa) é a única entre as toxinas de *E. coli* que é secretada através da membrana sem lise celular e sem clivagem do peptídio<sup>(44)</sup>.

Todas as linhagens de *E. coli* causadoras de ITU hemolíticas ou causadoras de urosepsia apresentam hibridização com uma sonda molecular constituída por fragmentos de DNA contendo genes produtores de hemolisina, obtidos a partir de uma linhagem isolada de paciente com pielonefrite. Linhagens uropatogênicas hemolíticas quase sempre expressam também MRHA ou fimbrias P. A produção de hemolisina está associada à adesão celular epitelial e à resistência sérica, mas não à produção de aerobactina ou AFA<sup>(46)</sup>.

Várias evidências sugerem que a hemolisina seja expressa *in vivo*, possivelmente durante ITU aguda. Títulos de anticorpos anti-hemolisina, que são altos em pacientes com ITU humana, são proporcionais à severidade da síndrome clínica. Na ITU humana, a produção de hemolisina é mais comum entre linhagens obtidas de pacientes com pielonefrite, seguida por aquelas isoladas de pacientes com cistite. Tal produção é mais prevalente em episódios de ITU localizados no trato urinário superior.

Assim, é possível que a função de virulência da hemolisina seja multifatorial, incluindo a liberação de ferro dos eritrócitos, interrupção da fagocitose e toxicidade direta aos tecidos do hospedeiro<sup>(44)</sup>.

Polissacarídios capsulares (antígeno K) são polímeros lineares de repetidas subunidades de carboidrato que, algumas vezes, também, podem incluir amino-ácido ou um componente lipídico, interferindo na detecção do antígeno O e protegendo a célula dos mecanismos de defesa do hospedeiro. As cápsulas da maioria das

linhagens de *E. coli* patogênicas extraintestinais são finas, ácidas, termoestáveis e altamente aniônicas, características estas que identificam polissacarídeos do grupo II. Este grupo, que agrega-se espontaneamente por causa de um grupo fosfatídico na extremidade da molécula, inclui os polissacarídeos K1, K2, K5, K6, K12, K13, K14, K15, K20, K23, K51, K52 e K 54. O K1 é um homopolímero de unidades de ácido siálico.

Com raras exceções, cepas K1 positivas são menos fagocitadas que as não capsuladas ou K1 negativas. O grau de bloqueio da fagocitose é proporcional à quantidade de polissacarídeo. A fagocitose de cepas com cápsula K1 aumenta após a exposição a anticorpos anti-K1 ou pela quebra capsular por calor. A carga negativa e a hidrofobicidade do polissacarídeo K1 são intrinsicamente antifagocitários. Eritrócitos recobertos com cápsulas polissacarídicas são fracamente lisados pelo complemento, mesmo na presença de anticorpos anticapsulares<sup>(13,20)</sup>.

Este grupo capsular é codificado por um grupo de genes localizado próximo ao locus *serA* no cromossomo de *E. coli*. Um grupo de genes é responsável pela síntese e polimerização de subunidades, outro responsável pela modificação pós-polimerização do polissacarídeo e transporte através da membrana citoplasmática; um terceiro é responsável pela translocação através da membrana externa à superfície celular. Como esperado, as regiões que codificam a síntese de subunidades são específicas para os diferentes polissacarídeos do tipo K pertencentes ao grupo II. Em contraste, regiões de pós-



polimerização e translocação de diferentes tipos de polissacarídeo K são proximamente relacionados.

Polissacarídios capsulares de cepas de *E. coli* são fracamente imunogênicos em animais e humanos. O polissacarídeo K1 é, particularmente, não imunogênico, produzindo uma resposta imunológica quase imensurável na maioria dos animais e somente em 12% dos seres humanos acometidos por pielonefrite, devido a linhagens produtoras de polissacarídeo K1<sup>(13)</sup>.

Entre os isolados de pacientes com pielonefrite, pode ocorrer associação da expressão de polissacarídeo K1 com fimbrias P. A cápsula K1 é o tipo capsular mais comumente encontrado entre linhagens fecais e urinárias. A prevalência das linhagens fecais aumenta com a idade. A associação melhor conhecida do polissacarídeo K1 em doenças humanas é com a meningite neonatal, na qual 79% dos isolados de *E. coli* são positivos para o antígeno K1. Em geral, linhagens produtoras do polissacarídeo K1 são mais comuns em pacientes com pielonefrite do que em pacientes com outras ITU ou na flora fecal normal<sup>(63)</sup>.

A resistência sérica é considerada um fator de virulência presente nas linhagens de *E. coli*. Segundo Taylor<sup>(13)</sup>, bactérias são mortas por soro humano normal através da atividade lítica do sistema complemento. A via alternativa é ativada pela bactéria na ausência de anticorpos específicos e tem papel mais importante na morte sérica nesta via do que na via clássica. O lipídio A pode ativar a via clássica na ausência de anticorpo, mas a sua localização dentro da membrana

externa provavelmente torna-o inacessível aos componentes do complemento na bactéria intacta.

Em geral, colônias lisas, que expressam LPS de maneira integral em sua superfície, são mais soro-resistentes que as rugosas, que expressam LPS parcialmente em sua superfície ou não o expressam, e o grau de resistência sérica é proporcional à quantidade de lipolissacarídeos presente nas colônias. Colônias soro-resistentes com abundância de polissacarídeos O parecem ativar e consumir complemento em um grau maior. Na maioria dos isolados de pielonefrite e cistite, há uma soro-resistência comum, tanto para aquelas linhagens isoladas do trato urinário inferior como para aquelas do trato superior<sup>(44)</sup>.

Embora a associação de FVs com ITU seja vista usualmente da perspectiva de cada FV individual com o isolado, é claro que linhagens urinárias, comumente, expressam múltiplos fatores simultaneamente. Em algumas linhagens, esta múltipla expressão é devida à presença de um bloco genético ligado à determinantes para diferentes FVs. Tal expressão múltipla dos FVs é mais comum nos isolados de ITU do que nos fecais e periuretrais e, ainda, entre os pacientes com pielonefrite e isolados do trato urinário superior, que pacientes com cistite e isolados do trato urinário inferior. Nos casos onde os múltiplos FVs são expressos, as condições do hospedeiro tem um papel importante. Esta observação sugere que os FVs funcionam por somatória ou sinergisticamente para vencer as defesas normais do hospedeiro, tornando tais linhagens mais virulentas e mais patogênicas<sup>(44)</sup>.

O crescimento de colônias em meio mínimo é mais comum entre as linhagens isoladas do trato urinário inferior que aquelas do superior. A capacidade de motilidade ou a presença de antígeno flagelar não é, ainda, um fator de virulência bem determinado.

Algumas linhagens hemolíticas produzem um fator citotóxico necrosante que causa dermonecrose e formação de células gigantes multinucleadas em animais. A produção deste fator é mais prevalente entre os isolados clínicos do que entre as linhagens fecais e é limitada às cepas que também produzem  $\alpha$ -hemolisina<sup>(46)</sup>.

## 4. Material e Métodos

### 4. 1. Linhagens Bacterianas

As treze linhagens bacterianas foram recebidas do Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e tiveram a sua confirmação bioquímica realizada como descrito a seguir : foram cultivadas em tubo contendo 3,0 mL de meio LB, o qual foi incubado por 12-18 horas a 37° C. O crescimento bacteriano foi semeado por esgotamento em placas de ágar MacConkey<sup>(Difco Laboratories)</sup> e os mesmos incubados por 12-18 horas a 37° C.

Para cada cultura, uma colônia foi transferida para tubos contendo meios LB<sup>(81)</sup>, Citrato<sup>(25)</sup>, EPM<sup>(95)</sup> e Mili<sup>(93)</sup> para confirmação das características bioquímicas e identificação, além da confecção do teste da coloração de Gram.

Após a confirmação destas características, um crescimento bacteriano em meio LB foi inoculado em tubos contendo meio LA<sup>(81)</sup>, semi-sólido, para manutenção das linhagens de *E. coli* em temperatura ambiente. À mesma cultura em meio LB foi adicionado glicerol para uma concentração final de 15 % e esta mantida a - 70° C.

## 4. 2. Linhagens padrão utilizadas neste trabalho

linhagem	característica	origem
V517	plasmídios de pesos moleculares 32 MD; 5.19 MD; 3.48 MD; 3.30 MD; 2.24 MD; 1.69 MD; 1.51 MD; 1.25 MD.	CVD
p307	plasmídio de peso molecular 54 MD	CVD
pR1	plasmídio de peso molecular 62 MD	CVD
pR40a	plasmídio de peso molecular 96 MD	CVD
pRA1	plasmídio de peso molecular 86 MD	CVD
<i>E. coli</i> AL	adesão localizada	DMI
<i>E. coli</i> AD	adesão difusa	DMI
<i>E. coli</i> EA	adesão enteroagregaiva	DMI
<i>S. flexnerii</i> (LG 1522)	controle de sideróforo	DMI
<i>S. aureus</i>	controle de aerobactina	FT
<i>E. coli</i> (C3)	controle de vermelho de Congo	UFV

CVD- Center for Vaccine Development.

DMI- Departamento de Microbiologia e Imunologia-Instituto de Biologia-  
UNICAMP.

FT- Fundação Tropical André Tosello.

UFV- Universidade Federal de Viçosa (MG).

#### 4. 3. Determinação do nível de resistência 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 linhagens bacterianas foram inoculadas com auxílio de uma multi-alça, a partir de um pré-inóculo em 3,0 mL de meio LB inoculado a 37° C por 12-18 horas, em placas de Petri contendo 20 mL de meio LA contendo diferentes concentrações dos antibióticos.

As concentrações antimicrobianas ensaiadas foram : 0, 10, 20, 50, 100, 200, 500 µg/mL. As placas foram cultivadas a 37° C por 18 horas e os resultados avaliados. Considerou-se o nível de resistência de uma determinada linhagem bacteriana como sendo aquela concentração em que a referida amostra ainda apresentou crescimento, quando comparada à mesma linhagem crescida na ausência do antimicrobiano.

---

#### 4. 4. Extração de DNA plasmidial

O método utilizado para extração de DNA plasmidial foi baseado na técnica de lise alcalina de Birboin & Doli (1979), com modificações<sup>(81)</sup>.

As linhagens bacterianas foram inoculadas em 3,0 mL de meio LB e incubadas a 37° C por 12-15 horas. 1,0 mL do crescimento bacteriano foi transferido para tubo “Eppendorff” e centrifugado a 12.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido em 100 µL de solução I (4.4.1.1) gelada. Este tubo foi mantido em banho de gelo por 5 minutos, sendo a seguir, adicionados 200 µL de solução II (4.4.1.2). O conteúdo do tubo foi misturado por inversão suave e vagarosa. Após o tubo ter sido mantido em banho de gelo por não mais que 5 minutos, 150 µL da solução III (4.4.1.3) foram acrescentados ao conteúdo do mesmo e então, novamente, invertidos suavemente e mantidos em banho de gelo por 15 minutos. A suspensão foi centrifugada a 12.000 rpm por 6 minutos e 400 µL do sobrenadante transferidos para outro tubo “Eppendorff”. A este volume, adicionou-se 1,0 mL de etanol PA gelado (-20° C), sendo o tubo invertido várias vezes para a mistura das soluções. Após este procedimento, o tubo foi mantido a - 20° C por, pelo menos, 30 minutos.

O DNA plasmidial foi precipitado por centrifugação a 12.000 rpm por 6 minutos, seco à temperatura ambiente e

ressuspendido com 50  $\mu$ L de tampão TE <sup>(81)</sup>. O DNA foi mantido a - 20° C até o momento de uso.

Para uso, alíquotas da suspensão de DNA plasmidial em volumes de 15  $\mu$ L foram transferidas para tubos “Eppendorff” contendo 5  $\mu$ L de tampão de ressuspensão (4.4.1.4) 6X, homogeneizadas com o auxílio de uma micropipeta e, então, aplicadas em canaletas de géis de agarose.

#### *4. 4. 1. Soluções Utilizadas na Técnica*

4. 4. 1. 1. Solução I :	50 mM Glicose
	25 mM Tris- HCl (pH 8,0)
	10 mM EDTA
4. 4. 1. 2. Solução II :	0,2 N NaOH
	1 % SDS
4. 4. 1. 3. Solução III :	5M acetato de potássio (60 mL)
	ácido acético glacial (11,5 mL)
	água destilada (28,5 mL)

4. 4. 1. 4. Tampão de ressuspensão (6X) : solução de sacarose a 50 %  
na qual adicionaram-se azul de bromofenol e xileno cianol,  
na concentração de 0,25 %.



#### 4. 5. Eletroforese de DNA plasmidial em gel de agarose

O DNA plasmidial foi verificado através do sistema de eletroforese horizontal submerso. A concentração do gel utilizada foi de 0,7 %. A agarose foi fundida em tampão TEB<sup>(81)</sup> 1X, resfriada e vertida em uma cuba contendo sobre a mesma um pente de acrílico para a formação das canaletas.

Após o endurecimento, 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 corrente elétrica 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 brometo de etídio (2,5 µg/mL) e o DNA foi visualizado sob luz violeta.

Para registro dos resultados, os géis foram fotografados com filme preto e branco Kodak (ISO 100) ou Fuji com auxílio de um filtro vermelho ou filme Polaroid.

#### 4. 6. Teste de adesão em células HeLa

##### 4. 6. 1. *Crescimento das linhagens bacterianas*

As linhagens bacterianas foram inoculadas em 5,0 mL de meio Tryptic Soy Broth (TSB) <sup>(Difco Laboratories)</sup> e, a seguir, incubadas sem agitação a 37° C por 12-18 horas. Uma alíquota de 1,0 mL do crescimento bacteriano foi transferido para um tubo “Eppendorff”, o qual foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos e o precipitado ressuspensionado em PBS<sup>(80)</sup> pH 7,4 e novamente centrifugado. Finalmente, o precipitado foi ressuspensionado em 1,0 mL de PBS pH 7,4 contendo D-manose 0,5 % para a realização do teste.

##### 4. 6. 2. *Cultivo de células HeLa*

As células HeLa <sup>(Depto.Micobiologia e Imunologia, I.B., Unicamp)</sup> foram mantidas em garrafas de cultura <sup>(Corning, Costar Corporation, USA)</sup> com meio Eagle<sup>(MEM)</sup> suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de solução de antibióticos (1 % estreptomicina e 0,6 % penicilina) as quais foram incubadas a 37° C por 72 horas. 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  $1 \times 10^5$  células/mL com meio Eagle suplementado com SFB.

Aliquotas de 1,0 mL da suspensão de células foram transferidas para placas de 24 orifícios, de fundo chato<sup>(Sarstedt, Inc., USA)</sup> contendo lamínula de 10x7 mm esterilizadas, sendo as mesmas incubadas a 37° C em atmosfera de CO<sub>2</sub> por 24 horas. O acompanhamento do crescimento das monocamadas foi feito com o auxílio de microscópio óptico invertido nos tempos de 24 e 48 horas.

#### 4. 6. 3. *Teste de adesão*

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

Para a realização do teste de adesão, o meio de cultura das placas com 24 orifícios, de fundo chato<sup>(Sarstedt, Inc., USA)</sup> foi descartado, as células lavadas com 1,0 mL de PBS pH 7,4 e a seguir 1,0 mL de meio Eagle suplementado com 10 % de SFB foi acrescentado a estas placas. Um volume de 50 µL da suspensão bacteriana foi adicionado aos orifícios das placas, as quais foram incubadas a 37° C por 30 minutos (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, colocaram-se novamente as placas a 37° C com 1,0 mL de meio Eagle em cada orifício, por 3 e 6 horas.

Após estes períodos de tempo, o meio de cultura foi descartado, as lamínulas lavadas 3 vezes com 1,0 mL de PBS pH 7,4 e as lamínulas fixadas com metanol durante 30 minutos, sendo as mesmas, a seguir, coradas com corante May Grünwald a 2,5 %, diluído em tampão Sörensen na proporção de 1:2, por 5 minutos.

Após a coloração com o corante May Grünwald, adicionou-se o corante Giemsa a 1%, diluído em tampão Sørensen na proporção de 1:5, por 10 minutos. As lamínulas 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 óptica comum sob aumento de 400x e 1000x e fotografada com filme Kodak (ISO 100) em fotomicroscópio com filtro azul. O filme e as fotografias em papel F3<sup>(Kodak)</sup> foram processados segundo as instruções do fabricante.

#### 4. 6. 4. *Teste de invasão*

O procedimento para este teste foi semelhante ao teste de adesão até o momento de inocular o crescimento bacteriano nas placas<sup>(Sarstedt)</sup>. Foram testadas as linhagens bacterianas que continuaram apresentando adesão positiva no teste de adesão de 6 horas na presença e/ou na ausência de D-manose<sup>(34)</sup>.

Para o teste de invasão, 100µL da suspensão bacteriana foram adicionados aos orifícios das placas, as quais foram incubadas a 37°C por 90 minutos.

Após este período, o meio de cultura foi descartado, as células lavadas 10 vezes com 1,0 mL de solução de PBS pH 7,4 adicionada com antibióticos (para 500 mL de PBS foram colocados 100 mg de canamicina e 100 mg de cloranfenicol).

As placas, então, receberam novamente meio de Eagle, porém desta vez adicionados com 10  $\mu$ L do antibiótico para as quais as bactérias eram sensíveis e 10  $\mu$ L do antibiótico usado para o cultivo de células HeLa, já citado no item 4. 6. 2. Os antibióticos adicionados ao meio de cultura e aos quais as diferentes linhagens eram sensíveis podem ser observados na Tabela I.

Tabela I. Antibióticos aos quais as linhagens bacterianas uropatogênicas são sensíveis.

linhagem de <i>E. coli</i> uropatogênica :	antibiótico :
DT	canamicina;cloranfenicol
28	canamicina;ampicilina
33	canamicina;cloranfenicol
46	canamicina;ampicilina
168	cloranfenicol;ampicilina
178	canamicina;ampicilina
189	canamicina;ampicilina
202	canamicina;ampicilina

Após isto, as placas foram incubadas a 37° C por 3 horas e o teste seguiu como o teste de adesão.

#### 4. 6. 4. 1. Soluções utilizadas na técnica

Tampão de Sørensen :

Solução A :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....9,08 g  
 água destilada q.s.p.....1000 mL

Solução B :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .....9,47 g  
 água destilada q.s.p.....1000 mL

Para se obter pH 7,3 foram misturados 23,2 mL da solução A e 76,8 mL da solução B.

#### 4. 7. Adesão de *Escherichia coli* em células uroepiteliais *in vitro*

A linhagem foi crescida em placas de Petri contendo meio BHI<sup>(Difco Laboratories)</sup> ágar a 37° C, durante 15 horas. Então, transferiu-se uma colônia para meio BHI e incubou-se a 37° C. Centrifugou-se o crescimento bacteriano a 6.000 rpm por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento com PBS pH 7,3.

A seguir, fez-se o preparo de células uroepiteliais humanas, colhidas na urina. A coleta de células foi feita com a primeira urina da manhã. Centrifugou-se esta urina em centrífuga a 6.000 rpm por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento, duas vezes, com PBS pH 7,4. Então, ressuspendeu-se este sedimento com PBS pH 7,4 e acertou-se a quantidade celular para uma concentração de  $10^5$  células/mL em Câmara Newbauer.

Seguiu-se à adesão colocando-se 500  $\mu$ L do crescimento bacteriano, padronizando-se a concentração de bactérias para  $10^8$  células/mL, juntamente com 500  $\mu$ L de suspensão celular em tubos de “Eppendorff” limpos. Incubou-se a 37° C por, no mínimo, uma hora em um aparelho shaker a 60 rpm. Após este procedimento, centrifugou-se a 1.500 rpm por 15 minutos. Retirou-se o sobrenadante cuidadosamente com a pipeta e lavou-se o sedimento duas vezes com PBS pH 7,4, centrifugando-se a 3.000 rpm por 15 minutos. Ressuspendeu-se o sedimento, então, em PBS pH 7,4 e fixou-se em lâmina a 37° C por uma hora. Fez-se a coloração e observou-se ao microscópio óptico.

#### 4. 8. Produção de sideróforos (aerobactina)

Com a finalidade de se verificar a capacidade de produção de sideróforos (aerobactina) pelas linhagens de *E. coli* uropatogênicas, as mesmas foram inoculadas em meio LB acrescido de 200  $\mu$ M de 2, 2  $\alpha$ - $\alpha$  dipiridil e incubadas a 37° C por 24 horas sob agitação de 150 rpm. Centrifugou-se, então, o crescimento bacteriano a 12.000 rpm por 3 minutos e filtrou-se o sobrenadante em membrana de nitrocelulose de 0,22  $\mu$ m.

Uma linhagem indicadora (LG 1522) foi crescida em tubo contendo meio LB e incubada a 37° C por 24 horas, 100  $\mu$ L do



crescimento bacteriano da mesma foram inoculados em placas de Petri contendo meio LA com  $\alpha$ - $\alpha$  dipiridil.

Em orifícios feitos no ágar, colocaram-se 50  $\mu$ L do sobrenadante das linhagens das quais queria-se verificar a produção de sideróforos. Incubou-se as placas a 37° C por 48 horas.

O crescimento bacteriano da linhagem utilizada como controle positivo ao redor dos orifícios indica a produção de aerobactina e serve como um parâmetro para observação e conclusão da produção de aerobactina das demais linhagens bacterianas.

#### 4. 9. Absorção do corante vermelho de Congo pelas linhagens bacterianas em meio de cultura

Este teste foi feito para que se pudesse verificar a capacidade das linhagens de *E. coli* uropatogênicas de absorver o corante vermelho de Congo. As linhagens bacterianas foram crescidas em meio LB a 37° C por 24 horas. O crescimento bacteriano foi inoculado em placas de Petri contendo meio TSA<sup>(81)</sup> acrescido de 0,01 % de vermelho de Congo e as mesmas incubadas a 37° C por 24 horas.

O aspecto de colônias vermelhas da linhagem utilizada como controle positivo indica um resultado positivo para este teste, enquanto as colônias incolores indicam resultado negativo.

#### 4. 10. Produção de hemolisina

Para a verificação da capacidade de produção ou não de hemolisina, o teste foi aplicado às linhagens de *E. coli* uropatogênicas. As linhagens bacterianas foram crescidas em meio LB a 37°C por 18 horas. Então, as mesmas foram semeadas em placas de Petri contendo meio ágar<sup>(Difco Laboratories)</sup> sangue de carneiro 5 % com o auxílio de uma multi-alça. Após isto, as placas foram invertidas e incubadas a 37°C por 24 horas. A produção de hemolisina foi evidenciada pela formação de halo de hemólise ao redor das colônias.

#### 4. 11. Extração de isoenzimas

Para se determinar o grau de similaridade entre as diferentes linhagens, foi feita a análise do padrão de isoenzimas. As seguintes isoenzimas foram utilizadas : fosfoglicoisomerase (PGI), hexoquinase (HEX), isocitrato dehidrogenase (IDH), adenilato quinase (ADK), alfa-esterase ( $\alpha$ -EST), malato desidrogenase (MDH) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).

As linhagens foram inoculadas em 50 mL de meio LB e incubadas a 37° C por 15 horas. O crescimento bacteriano foi centrifugado a 5.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ressuspendeu-se o sedimento em 2,0 mL de tampão para isoenzimas (descrito a seguir). A suspensão foi sonicada por 3 períodos de 20 segundos em banho de gelo e, então, centrifugou-se a 12.000

rpm durante 20 minutos. Utilizou-se este sobrenadante para o feitiço da eletroforese. Segue abaixo as composições dos tampões utilizados.

*4. 11. 1. Soluções utilizadas na técnica*

4. 11. 1. 1. Tampão para extração de isoenzimas (pH 8,0) :

trizma base.....10 mM

EDTA.....1 mM

NADP.....0,5 mM

Ajustar o pH com HCl concentrado.

4. 11. 1. 2. Tampão tris-citrato pH 8,0 (tampão A) :

trizma base.....83,20 g

ácido cítrico monohidratado....33,09 g

água destilada.....1 L

Ajustar o pH com HCl concentrado.

4. 11. 1. 3. Tampão tris-citrato pH 6,3 (tampão B) :

trizma base.....27,00 g

ácido cítrico monohidratado.....18,07 g

água destilada.....1 L

Ajustar o pH com HCl concentrado.

4. 11. 1. 4. Tampão tris-citrato pH 6,7 :

trizma base.....0,97 g

ácido cítrico monohidratado.....0,63 g

água destilada.....1 L

Ajustar o pH com HCl concentrado.

4. 11. 1. 5. Tampão borato pH 8,0 :

ácido bórico.....18,5 g

NaOH.....2,4 g

água destilada.....1 L

Ajustar o pH com HCl concentrado.

4. 11. 1. 6. Tampão tris-HCl pH 8,5 :

trizma base.....1,2 g

água destilada.....1 L

Ajustar o pH com HCl concentrado.

4. 11. 1. 7. Soluções de substrato para isoenzimas :

*Substrato para MDH*

L-malato.....1,34 g

água destilada q.s.p.....10 mL

Ajustar o pH 7,0 com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

*Solução de MTT, NADP e PMS*

solução aquosa a 10 mg/mL de MTT, NADP ou PMS.

*Solução de NBT*

solução aquosa a 20 mg/mL de Nitro-Blue tetrazólio.

*Solução de NAD*

solução aquosa a 25 mg/mL de NAD.

*Solução de  $MgCl_2$* 

solução aquosa a 100 mg/mL de  $MgCl_2$ .

*Adenilato Quinase (ADK)*

tris-HCl 0,2M pH8,0.....	25 mL
glicose.....	100 mg
ADP.....	25 mg
glicose 6 fosfato dehidrogenase....	10 U
sol. NADP.....	0,3 mL
sol. $MgCl_2$ .....	0,3 mL
sol. MTT.....	0,6 mL
sol. PMS.....	0,6 mL

*Fosfoglicoisomerase (PGI)*

tris-Hcl 0,2M pH 8,0.....25 mL  
 frutose 6-fosfato.....0,6 mL  
 glicose 6-fosfato dehidrogenase...3 U  
 sol. NADP.....0,6 mL  
 sol. MgCl<sub>2</sub>.....0,3 mL  
 sol. MTT.....1 ml  
 sol. PMS.....0,5 mL

*Glicose 6-fosfato dehidrogenase (G6PDH)*

tris-HCl 0,2M pH 8,0.....30 mL  
 glicose 6-fosfato.....40 mg  
 sol. MgCl<sub>2</sub>.....0,3 mL  
 sol. MTT.....0,6 mL  
 sol. NADP.....0,9 mL  
 sol. PMS.....0,3 mL

*Hexoquinase (HEX)*

tris-HCl 0,05M pH 7,0.....	30 mL
glicose.....	50 mg
ATP.....	12 mg
sol. MgCl <sub>2</sub> .....	0,3 mL
sol. NBT.....	0,6 mL
sol. NADP.....	0,45 mL
glicose 6-fosfato desidrogenase.....	35 U

*Isocitrato desidrogenase (IDH)*

tris-HCl 0,2M pH 8,0.....	50 mL
ácido isocítrico.....	60 mg
sol. NADP.....	1 mL
sol. MgCl <sub>2</sub> .....	0,4 mL
sol. MTT.....	1 mL
sol. PMS.....	1 mL

*Malato Dehidrogenase (MDH)*

tris-HCl 0,2M pH8,0.....	40 mL
MDH substrato.....	8 mL
sol. MTT.....	1 mL
sol. NAD.....	0,8 mL
sol. PMS.....	1 mL

#### 4. 12. Determinação do perfil eletroforético do DNA através de Ribotipagem

Precede a esta técnica a extração do DNA genômico.

##### 4. 12. 1. *Extração do DNA genômico*

O DNA genômico foi isolado a partir de 6-8 mL de crescimento bacteriano em LB. A suspensão celular foi centrifugada e o precipitado lavado duas vezes com tampão TE. Ao precipitado seco, foram adicionados 50  $\mu$ L de lisozima a 10 mg/mL. A suspensão foi homogeneizada em vortex e incubada a 37° C por 2-3 horas. Foi adicionada uma mistura de 70  $\mu$ L de 10 % SDS e 5  $\mu$ L de proteinase K (10 mg/mL). A suspensão foi homogeneizada novamente em vortex e incubada a 65° C por 10 minutos. Então, adicionaram-se 100  $\mu$ L de NaCl 5 M e a mesma quantidade de uma solução pré-aquecida a 65° C de CTAB/NaCl. A suspensão, assim obtida, foi agitada em vortex até a formação de um líquido de aspecto leitoso e incubada a 65° C por mais 10 minutos. Após este processo, foram adicionados 750  $\mu$ L de uma solução de clorofórmio-álcool isoamílico, na proporção de 24:1, e a mistura foi agitada em vortex por cerca de 10 segundos. O material foi centrifugado a 12.000 rpm. O sobrenadante aquoso (cerca de 600  $\mu$ L) foi cuidadosamente transferido para outro tubo de reação e o DNA genômico precipitado com 0,6 volumes de isopropanol a - 20° C (cerca de 450  $\mu$ L) e a mistura foi mantida à temperatura de - 20° C por 30 minutos.



Após este período, a solução foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi, por centrifugação, duas vezes lavado com solução de etanol 70 %. Após este procedimento, o DNA foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso com movimentos cuidadosos e circulares com 100 µL de tampão TE pH 8,0. A dosagem de DNA realizou-se como descrito por Sambrook et al (1989), em que a concentração e pureza do DNA foi determinada a partir de leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280nm. Para isso, o seguinte cálculo foi realizado :

*Concentração de DNA (µg/mL) = leitura em A260nm x diluição x 50*

*Pureza do DNA = A260/A280 - foram utilizadas as linhagens que apresentaram valores entre 1,50 e 2,00 (significando não contaminação por RNA e/ou proteínas).*

O ácido nucléico extraído foi conservado à temperatura de - 20° C.

Para a determinação do perfil eletroforético, seguiu-se com a técnica da Ribotipagem.

#### 4. 12. 2. Ribotipagem

##### 4. 12. 2. 1. Digestão do DNA Genômico

Após ter-se extraído e quantificado o DNA, realizou-se a sua digestão ou com a enzima *EcoR I* ou *Hind III*, em um tubos Eppendorff separados, seguindo o protocolo abaixo :

DNA.....5 µg  
 Tampão da enzima 10x.....4 µL (concentração final 2x)  
*EcoR I*.....2 µL (40 U) ou  
*Hind III*.....2 µL (30 U)  
 Água deionizada esterilizada q.s.p....20 µL

Incubou-se a reação por 18-24 horas. Após este procedimento, toda a reação de digestão foi misturada ao tampão de ressuspensão de DNA e, então, submetida a uma eletroforese em gel de agarose a 0,7 % juntamente com o marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder <sup>(Life Technologies)</sup>. Após ter sido revelado com brometo de etídio, o gel foi fotografado e seguiu-se à transferência do DNA, nele contido, para membrana de “nylon”.

#### 4. 12. 2. 2. Transferência para membrana de “nylon”

Seguindo a metodologia descrita por Sambrook et al (1989), o gel foi denaturado por 45 minutos, com cerca de 500 mL de solução de denaturação (4.12.5.2).

Decorrido este período, o gel foi rapidamente lavado com água deionizada e neutralizado com 300 mL de solução de neutralização durante 30 minutos. Novamente, a solução foi trocada e continuou-se a neutralização por mais 15 minutos. Enquanto o gel neutralizava, folhas de papel Whatman 3MM foram cortadas em tamanho levemente maior que o do gel. Rapidamente, este papel foi molhado com tampão 10xSSC (tampão de transferência) e colocado

sobre um suporte em que o gel foi fixado para a transferência (tomando-se o cuidado para não haver a formação de bolhas, onde seria montado o aparato de transferência).

Uma membrana de “nylon” cortada exatamente no tamanho do gel foi, primeiramente, molhada em água deionizada e, posteriormente, em tampão 10xSSC, permanecendo nesta solução por cerca de 5 minutos.

O gel foi removido da solução de neutralização e colocado, invertido, sobre o suporte de transferência. Colocou-se sobre ele a membrana de “nylon” e, sobre estes, duas folhas de papel 3MM, cortados exatamente do tamanho do gel e molhados com tampão 2xSSC. Em todos estes passos tomou-se o cuidado de evitar a formação de bolhas, o que dificultaria a transferência do DNA.

Sobre este sistema foram colocados 5-8 cm de papel toalha cortados do tamanho do gel e um peso de cerca 500 g. A transferência de DNA procedeu-se durante 24 horas. Decorrido tal período, o papel toalha e o papel 3MM foram retirados e o local das canaletas do gel marcados com lápis d’água ou caneta porosa.

A membrana de “nylon” foi passada por uma solução de 6xSSC. O DNA foi fixado permanentemente à membrana, por incubação a 80° C por 2 horas ou exposição à luz ultravioleta.

#### 4. 12. 3. *Marcação do fragmento de DNA p64 com ( $\alpha$ - $^{32}$ P) dCTP*

Como sonda, nos experimentos de ribotipagem, foi utilizado fragmentos de DNA de 10 kB, originário do plasmídio p64 ( $\alpha$ - $^{32}$ P), contendo seqüências 16S 23S e 5S. A marcação da sonda foi realizada seguindo-se o protocolo de marcação. O DNA foi marcado com ( $\alpha$ - $^{32}$ P) dCTP, seguindo o protocolo abaixo :

A mistura foi aquecida a 100° C por 10 minutos e imediatamente resfriada. A esta mistura foram adicionados 1  $\mu$ L de *DNA polimerase I* Fragmento Klenow e 5  $\mu$ L de ( $\alpha$ - $^{32}$ P) dCTP.

Incubou-se a 37°C por 1 hora e congelou-se a sonda já marcada.

#### 4. 12. 4. *Hibridização da membrana de nylon com a sonda p64*

A solução de pré-hibridização foi preparada momentos antes de seu uso. Enquanto se preparava a solução, as membranas contendo o DNA digerido foram colocadas em solução 6xSSC por 2 minutos.

Após este procedimento, as membranas foram acondicionadas no interior de uma garrafa de hibridização (com seu interior contendo um filme de Repel-Silane PlusOne com o lado contendo DNA inverso ao vidro. Cada membrana foi separada uma da outra por redes de hibridização(“meshs”).

Após estarem bem acondicionadas, colocou-se dentro da garrafa a solução de pré-hibridização e incubou-se a garrafa em forno giratório<sup>(Red Roller II-Hoefer Scientific Instruments)</sup> a 42° C por 1 hora.

Decorrido tal período, toda solução de pré-hibridização foi retirada e uma solução de hibridização foi colocada. Conjuntamente, foram adicionados 75  $\mu\text{L}$  da sonda marcada com ( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ) dCTP, fervida por 5 minutos a 100° C e imediatamente resfriada. O processo de hibridização transcorreu por 4 horas à temperatura de 42° C.

Após o tempo de hibridização, a solução foi descartada em recipientes adequados e as membranas lavadas em solução de 2xSSC, 0,5 % de SDS por cerca de 5 minutos à temperatura ambiente. Transferiu-se a membrana para uma solução de 2xSSC, 0,01 % SDS e decorridos 15 minutos, transferiu-se novamente as mesmas para uma solução de 0,1xSSC 0,5 % SDS e incubou-se a 37° C por 30 minutos.

Decorrido este período, transferiu-se cada membrana para uma nova solução de 0,1xSSC, 0,5 % SDS e incubou-se a 68° C pelo mesmo período de tempo. Lavaram-se as membranas rapidamente em solução 0,1xSSC e removeu-se o excesso de líquido deixando-se as membranas repousarem sobre um papel toalha. Fixou-se a membrana, com o lado contendo DNA para cima em papel 3MM ou em filmes usados de radiografia com o auxílio de fita adesiva. Foi realizada a exposição em filme de raio X a 70° C para obtenção de bandas marcadas radioativamente. O tempo de exposição foi de 48 horas à temperatura de - 70° C.

Após isso, revelou-se o filme radiográfico e analisaram-se os resultados mediante o uso do Programa NTSys.

#### 4. 12. 5. Soluções utilizadas na técnica

##### 4. 12. 5. 1. Solução 20xSSC\* :

NaCl.....352 g

Citrato de Sódio.....176 g

Água deionizada.....2 L

##### 4. 12. 5. 2. Solução de denaturação\* :

NaCl.....1,5 M ou 29 g

NaOH.....0,5 M ou 20 g

Diluir para 1 L de água deionizada.

##### 4. 12. 5. 3. Solução de Hibridização (concentrações finais) :

-6xSSC;

-0,5 % de SDS;

-100 µg/mL de fragmento de DNA de esperma de salmão denaturado;

-50 % de formamida (aquecida a 42° C)

##### 4. 12. 5. 4. Solução de pré-hibridização (concentrações finais) :

-6xSSC;

-5x solução de Denhardt's;

-0,5 % de SDS;

-100 µg/mL de fragmento de DNA de Esperma de salmão denaturado;

-50 % de formamida (aquecida a 42° C)

4. 12. 5. 5. Solução de Denhardt's 50x concentrada :

Ficoll.....	5 g
Polivinilpirrolidona(PVP).....	5 g
Soralbumina bovina(fração V).....	5 g
Água deionizada.....	500 mL

Esterilizar por filtração e guardar a - 20° C.

4. 12. 5. 6. Solução de Neutralização\* :

Trizma base.....	1 M
NaCl.....	2 M

O ajuste do pH(=7,4) foi realizado com HCl.

\* - Estas soluções foram autoclavadas a 120° C por 20 minutos.

4. 12. 5. 7. Solução de CTAB/NaCl :

Brometo de cetramônio "Sigma-H5882" "CTAB".....	8 g
NaCl.....	4,1 g

Ambos os componentes foram dissolvidos em 80 mL de água deionizada aquecida a 65° C, sendo o volume completado para 100 mL.

#### 4. 13. Mutagênese com transposon TnphoA

A linhagem bacteriana DT (Tetraciclina-Tc<sup>R</sup>; Estreptomicina-Sm<sup>R</sup>), receptora, foi inoculada em 3,0 mL de meio LB e incubada a 37° C por 15 horas em presença dos antimicrobianos para os quais a mesma era resistente. Uma diluição na proporção de 1 : 20 da amostra doadora (pRT 733 : Ampicilina-Ap<sup>R</sup>; Canamicina-Km<sup>R</sup>) 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 µL de amostra doadora (pRT 733) e 300 µL receptora (DT) foram centrifugados a 12.000 rpm por 2 minutos e os precipitados lavados com meio LB para completa retirada dos antimicrobianos e, a seguir, ressuspensos delicadamente em 100 µL de meio LB.

As duas linhagens foram misturadas e depositadas sobre uma membrana de filtro (0,2 µm) 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

A seleção dos mutantes Km<sup>R</sup> Tc<sup>R</sup> foi feita em placas contendo meio LA adicionado de 40 µg/mL de XP (5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato) e os antibióticos Km (50 µg/mL) e Tc (200 µg/mL). Colônias azuis obtidas neste meio de cultura foram estriadas em placas contendo LA adicionado com XP, Km e Tc e incubados a 37° C por 18 horas. As colônias azuis Km<sup>R</sup> isoladas, indicando a produção de fosfatase alcalina, foram estocadas em meio semi-sólido para análise



dos perfis eletroforéticos de proteínas de membrana, plasmídios e experimentos biológicos (testes de adesão e invasão em células HeLa.

#### 4. 14. Cura de plasmídios através de tratamento com brometo de etídio

Com a finalidade de se tentar correlacionar a presença de plasmídios com características de patogenicidade, a linhagem DT foi submetida à técnica descrita por Tomoeda et al. (1968) para a eliminação de plasmídio.

Para esta finalidade, a linhagem bacteriana foi inoculada em 3,0 mL de meio LB e incubada a 37° C por 12-18 horas. A seguir, uma alíquota com 100 µL dessa cultura foi transferida para tubos contendo meio LB com concentrações crescentes de brometo de etídio<sup>(79)</sup> (0, 1, 2, 5, 10, 50 %) sendo os mesmos incubados a 37° C por 12-18 horas. Do tubo contendo 10 % de brometo de etídio, o qual foi o de maior concentração que apresentou crescimento bacteriano após o período citado, 100 µL da cultura bacteriana foram transferidos para outro meio LB com 10 % de brometo de etídio e este incubado a 37° C por 12-18 horas. Este processo foi repetido por mais duas vezes e a bactéria inoculada com o auxílio de alça de Drigalski em placa contendo meio LA. As colônias que, então, cresceram neste meio foram transferidas para outras placas contendo meio LA adicionado ou com o antimicrobiano estreptomicina ou com o tetraciclina. Estas placas foram incubadas a 37° C por 12-18 horas e as colônias isoladas, analisadas quanto ao perfil plasmidial.

#### 4. 15. Microscopia eletrônica

O teste de microscopia eletrônica foi realizado para a linhagem uropatogênica DT após ter sido feito o teste de invasão da mesma.

Preparou-se o cultivo de células HeLa em garrafas conforme já descrito no item 4. 6. 2. Inoculou-se a linhagem DT em meio LB e incubou-se a 37° C por 15 horas. Então, adicionou-se 1,0 mL de crescimento bacteriano ao cultivo de células, enriqueceu-se o meio com soro fetal bovino e incubou-se por 3 horas a 37° C. Após este período, descartou-se o meio da garrafa com o crescimento bacteriano virando a mesma de “boca” para baixo sobre um descarte, lavou-se com PBS 0,1 M, pH 7,4 e fixou-se por 30 minutos com uma solução de glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Lavou-se, novamente, com PBS 0,1 M em 3 séries de 5 minutos.

Descartou-se a solução de glutaraldeído e fez-se a raspagem das células cultivadas na garrafa, com o auxílio de um raspador celular<sup>(Cell Scraper, Inter Med, Nunc, USA)</sup>, em 1,0 mL de PBS 0,1 M. Colocaram-se estas células em tubos “Eppendorff”, os quais foram centrifugados por 5 minutos a 1.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se ao sedimento 1,0 mL de tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 1 %, em agitação, por 30 minutos.

Após esta procedimento, centrifugou-se por 5 minutos a, aproximadamente, 2.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento com PBS 0,1 M por 3 séries de 5 minutos. Lavou-se com água deionizada. Preparou-se uma solução de 2 % de agarose e incluiu-se o material. Esperou-se o endurecimento da agarose e cortou-se o “bloco” segundo a localização do sedimento no bloco. Fez-se, então, a desidratação dos cortes da seguinte maneira : álcool 70 % por 30 minutos, álcool 80 % por 30 minutos, álcool 90 % por 30 minutos, álcool absoluto por 30 minutos (2 séries), óxido de propileno por 30 minutos (2 séries), óxido de propileno : Epon (resina), 1:1, por 60 minutos e Epon durante toda uma noite, sendo que nas fases com Epon foi utilizado um rotor para que houvesse agitação constante. Seguiu-se os procedimentos para a observação ao microscópio eletrônico, que foram o feitiço de microcortes no material e a sua coloração.

---

## 5. Resultados

### 5. 1. Determinação da resistência a drogas antimicrobianas

Na Tabela II podemos constatar as resistências das linhagens uropatogênicas frente aos antimicrobianos, segundo publicação de Mendonça et al. (1996)<sup>(66)</sup>, as quais foram confirmadas neste trabalho.

A linhagem uropatogênica DT apresentou-se resistente à canamicina na concentração de 10 µg/mL e à tetraciclina na concentração igual e/ou menor a 100 µg/mL. E em todas as concentrações de estreptomicina apresentou-se resistente.

As concentrações testadas , em µg/mL, foram : 10, 20, 50, 100, 200 e 500.

---

Tabela II. Drogas antimicrobianas às quais as linhagens uropatogênicas se mostraram resistentes.

linhagem de <i>E. coli</i> uropatogênica :	antibiótico :
DT	Tc, Sm, Ap, Na
28	Tc, Sm, Ap, Na, Km
33	Sm, Ap, Km
46	Sm, Ap, Km
63	Na
66	Sm, Na
81	Tc, Sm, Ap, Na, Km
154	Na
168	Tc, Sm, Ap, Km
178	Tc, Sm, Ap, Km
189	Tc, Sm, Ap, Na, Km
198	Tc, Sm, Ap, Km
202	Sm, Ap, Na

Onde Tc-tetraciclina; Sm-estreptomicina; Ap-ampicilina; Na-ácido nalidixico; Km-canamicina.

## 5. 2. Extração de plasmídios das linhagens uropatogênicas.

### Eletroforese em gel de agarose

A extração de plasmídios permitiu que fosse feita a eletroforese em gel de agarose, onde pode-se observar o perfil eletroforético das diferentes linhagens de *E. coli* uropatogênicas. Tais linhagens apresentaram plasmídios de pesos moleculares diferentes e que podem ser observados na figura 1.

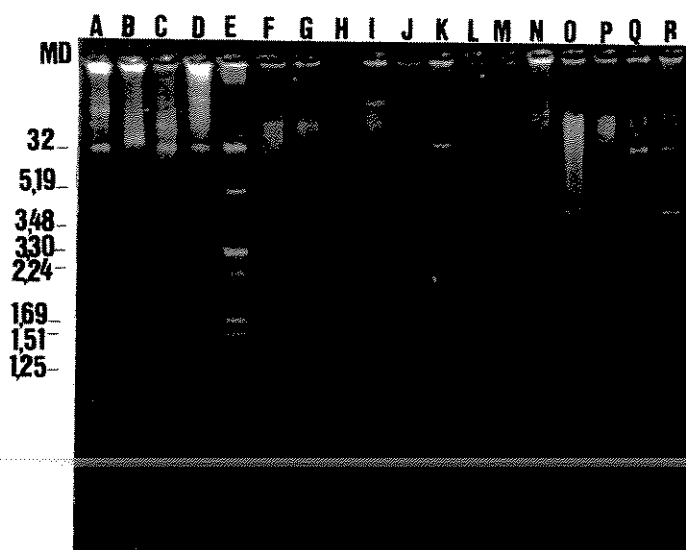


Figura 1: Gel de agarose (0,7 %) da eletroforese de DNA plasmidial das linhagens de *E. coli* uropatogênicas. A (pR1); B (pR40a); C (p307); D (pRA1); E (V517); F (DT); G (28); H (33); I (46); J (63); K (66); L (81); M (154); N (168); O (178); P (189); Q (198); R (202).

Tabela III. Pesos moleculares dos plasmídios observados no gel de eletroforese de agarose (0,7 %).

linhagem	peso molecular (MD)
DT	32/ 23/ 20
28	32/ 29
33	32
46	40/ 23/ 12
63	32/ 29
66	36/ 23
81	32/ 29
154	40/ 29
168	29/ 23/ 18/ 6/ 2/ 1
178	32/ 26
189	32/ 29/ 23
198	29/ 20/ 10/ 8/ 4/ 1
202	29/ 20/ 10/ 8/ 4/ 1

### 5. 3. Testes de adesão e invasão em células HeLa

O resultados dos testes de adesão e de invasão das diferentes linhagens bacterianas encontram-se descritos nas Tabelas IV e V e nas figuras 2, 3, 4, 5 e 6.

Assim, para o teste de adesão em 6 horas e que veio confirmar os resultados conseguidos com o teste em 3 horas, nove linhagens (DT, 28, 33, 46, 66, 168, 178, 189, 202) apresentaram adesão positiva na presença e na ausência de D-manose; uma linhagem apresentou adesão positiva somente na presença de D-manose (154); e três linhagens apresentaram adesão negativa na presença e na ausência de D-manose (63, 81, 198).

O tipo de adesão apresentado por estas linhagens, quando comparado com os padrões (figuras 2B, 2C e 2D), foram : DT (adesão agregativa, figuras 2E e 2F); 28 (adesão difusa, figura 3A e adesão agregativa, figura 3B); 33 (adesão difusa, figuras 3C e 3D); 46 (adesão agregativa, figuras 3E e 3F); 63 (adesão negativa, figuras 4A e 4B); 66 (adesão agregativa, figuras 4C e 4D); 81 (adesão negativa, figuras 4E e 4F); 154 (adesão agregativa, figura 4A, e adesão negativa, figura 5B); 168 (adesão agregativa, figuras 5C e 5D); 178 (adesão agregativa, figuras 5E e 5F); 189 (adesão agregativa, figuras 6A e 6B); 198 (adesão negativa, figuras 6C e 6D); 202 (adesão agregativa, figuras 6E e 6F).



As linhagens que apresentaram adesão positiva foram, então, testadas quanto à invasão e observadas ao microscópio óptico.

A Tabela V demonstra os resultados obtidos com o teste de invasão. Deste modo, observou-se que daquelas linhagens que apresentaram invasão positiva, cinco (DT, 28, 66, 178, 189) invadiram na presença e na ausência de D-manose. A invasão negativa na presença e na ausência de D-manose foi observada em quatro linhagens (33, 46, 178, 189).

Quando da realização do teste de adesão, pode-se observar ao microscópio óptico que determinadas linhagens uropatogênicas, DT e 168, causavam uma destruição severa das camadas de células HeLa. A linhagem uropatogênica 168 além de provocar este dano, o fez muito rapidamente, já que a sua adesão foi testada sob diversos tempos de multiplicação e observou-se esta característica mesmo nos menores tempos. Tal característica pode ser constatada na figura 5C e 5D. Frente a este fato, decidiu-se realizar a microscopia eletrônica da linhagem DT quanto à invasão para a confirmação ou não dos resultados obtidos com a microscopia óptica.

Tabela IV : Capacidade de adesão em células HeLa das linhagens de *E. coli* uropatogênicas.

Linhagens	3 horas		6 horas		tipos de adesão	
	SM	CM	SM	CM	SM	CM
DT	+	+	+	+	AE	AE
28	+	+	+	+	AD	AE
33	-	-	+	+	AD	AD
46	+	+	+	+	AE	AE
63	-	-	-	-	AN	AN
66	+	+	+	+	AE	AE
81	-	-	-	-	AN	AN
154	+	-	+	-	AE	AN
168	+	+	+	+	AE	AE
178	+	+	+	+	AE	AE
189	+	+	+	+	AE	AE
198	-	-	-	-	AN	AN
202	-	-	+	+	AE	AE

SM = sem manose; CM = com manose; AE = adesão agregativa; AD = adesão difusa; AN = adesão negativa, + = positivo, - = negativo.

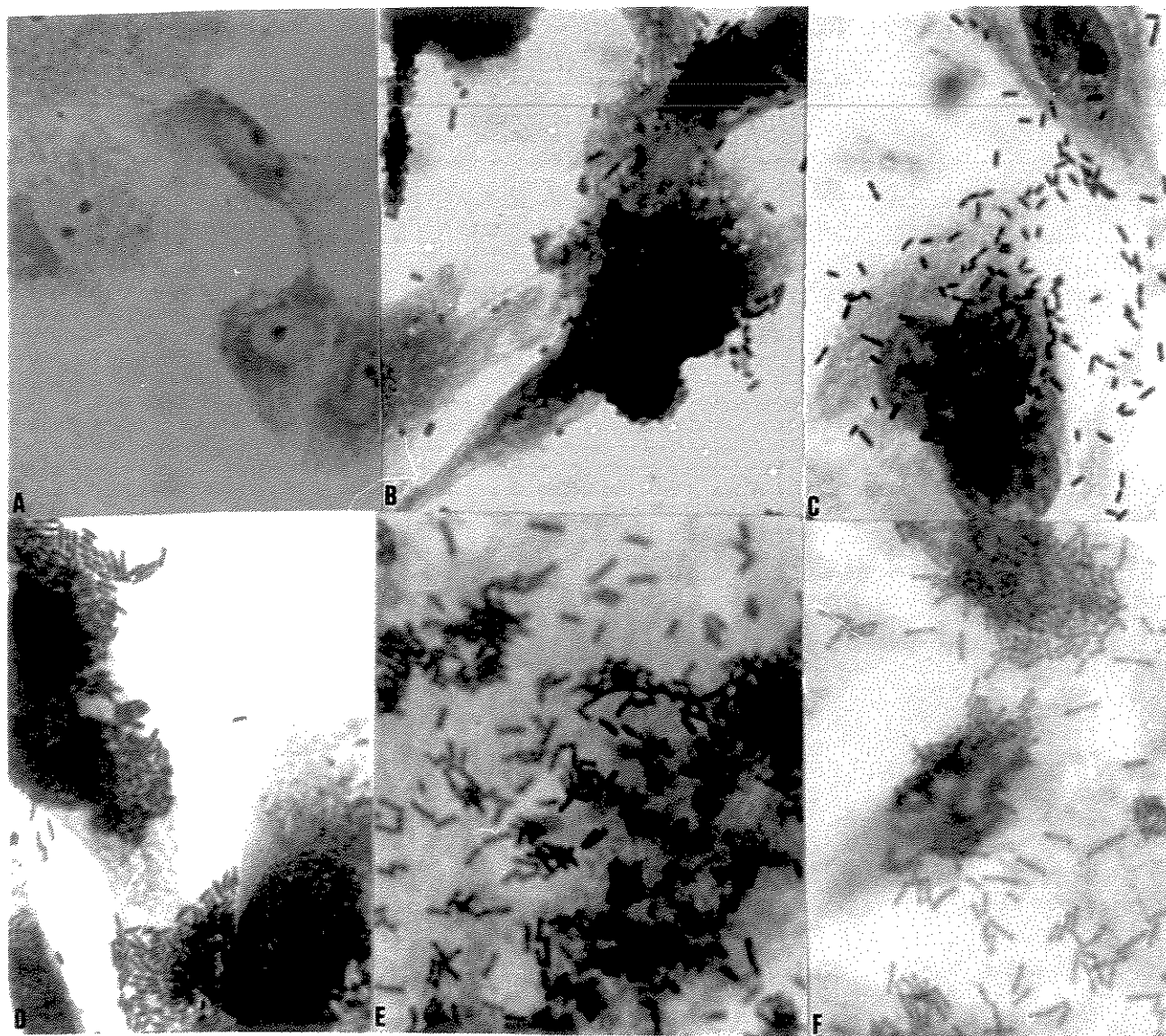


Figura 2.A : Cultivo de células HeLa (controle sem bactérias); Adesão em células HeLa : B : padrão de adesão localizada; C : padrão de adesão difusa; D : padrão de adesão enteroagregativa; E : Adesão da linhagem de *E. coli* uropatogênica DT na ausência de manose; F : Adesão da linhagem de *E. coli* uropatogênica DT na presença de manose.

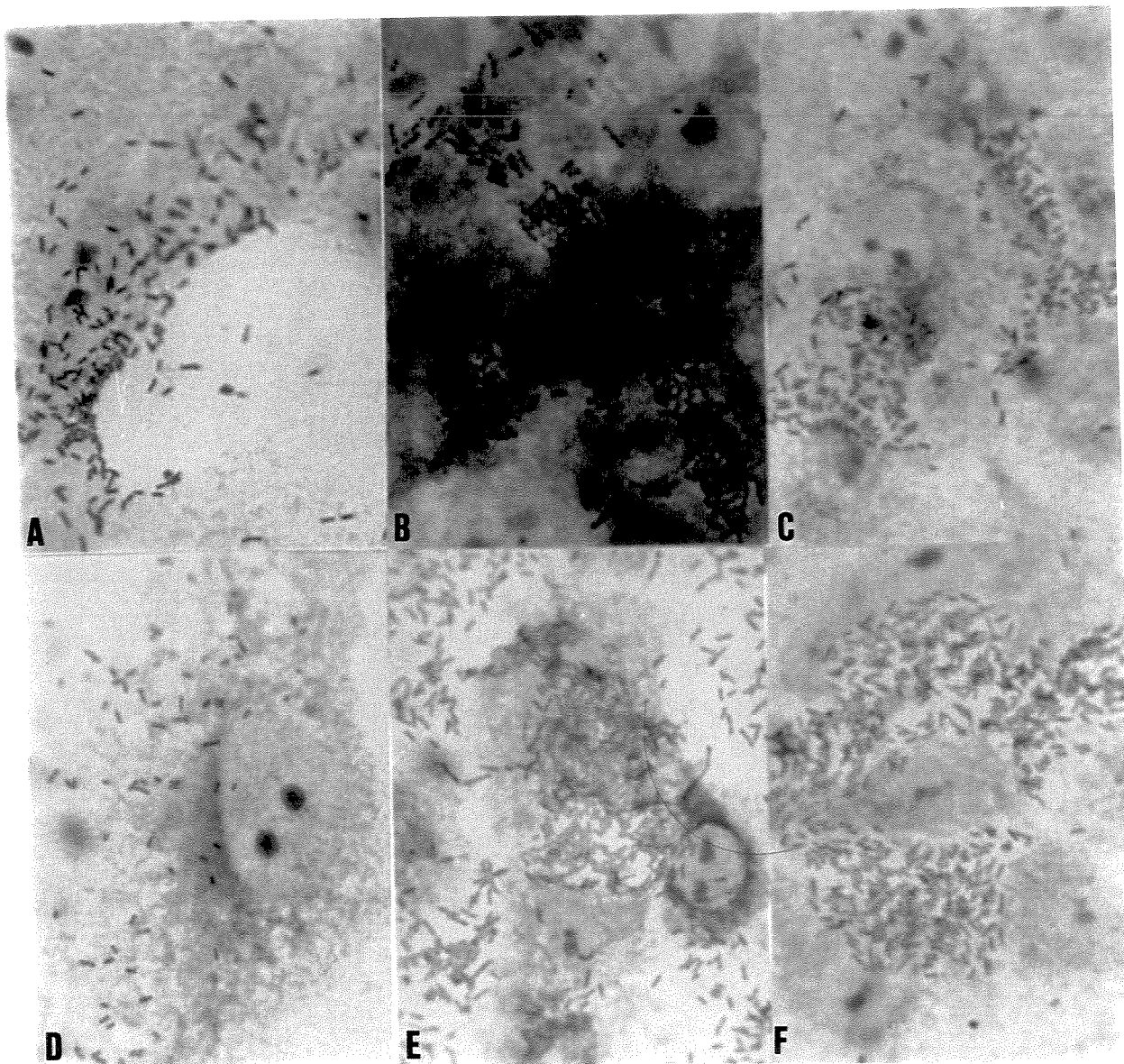


Figura 3. Adesão das linhagens de *E. coli* uropatogênicas em células HeLa. A : linhagem 28 na presença de manose; B : linhagem 28 na ausência de manose; C : linhagem 33 na ausência de manose; D : linhagem 33 na presença de manose; E : linhagem 46 na ausência de manose; F : linhagem 46 na presença de manose.



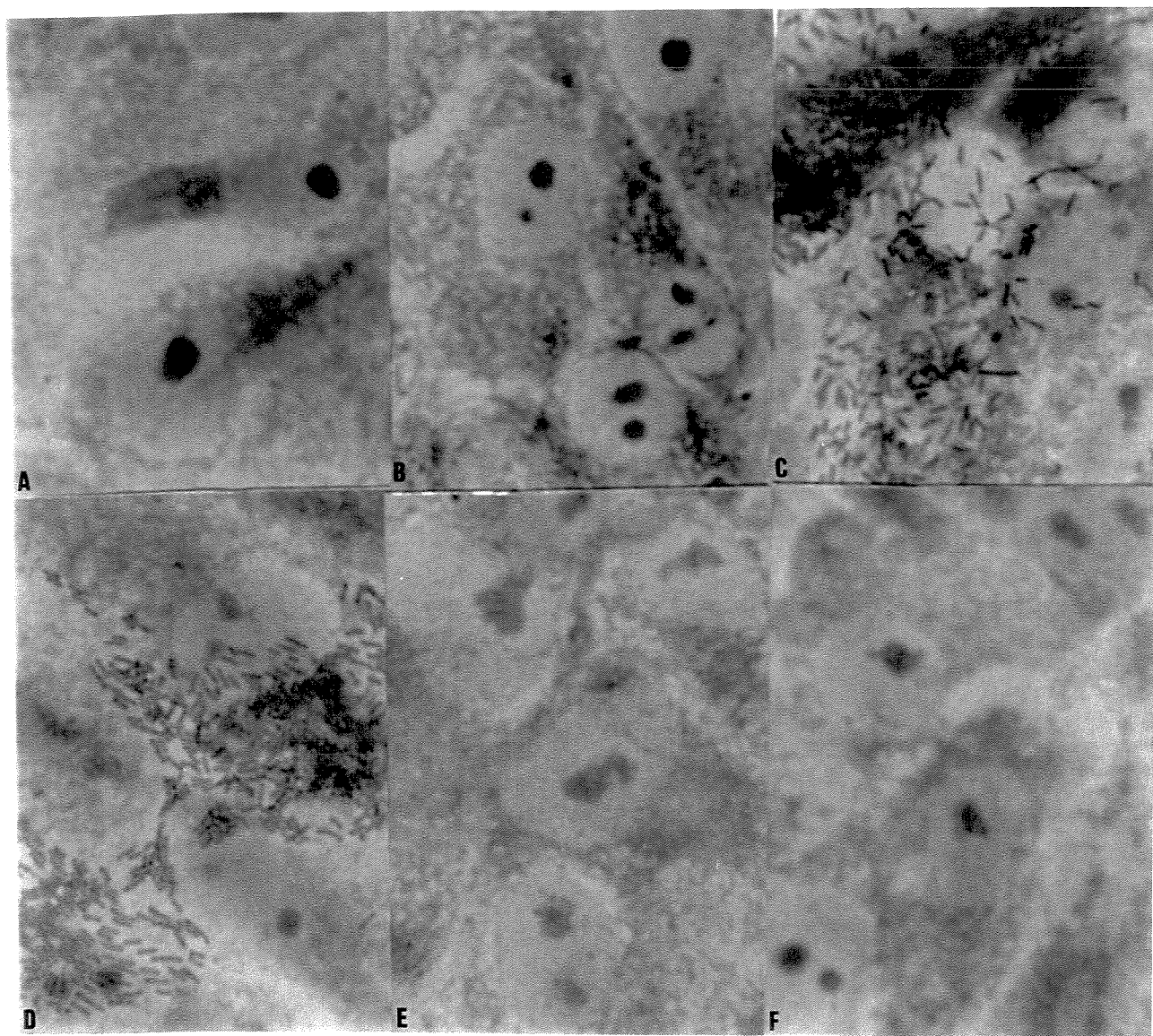


Figura 4. Adesão das linhagens de *E. coli* uropatogênicas em células HeLa. A : linhagem 63 na ausência de manose; B : linhagem 63 na presença de manose; C : linhagem 66 na ausência de manose; D : linhagem 66 na presença de manose; E : linhagem 81 na ausência de manose; F : linhagem 81 na presença de manose.

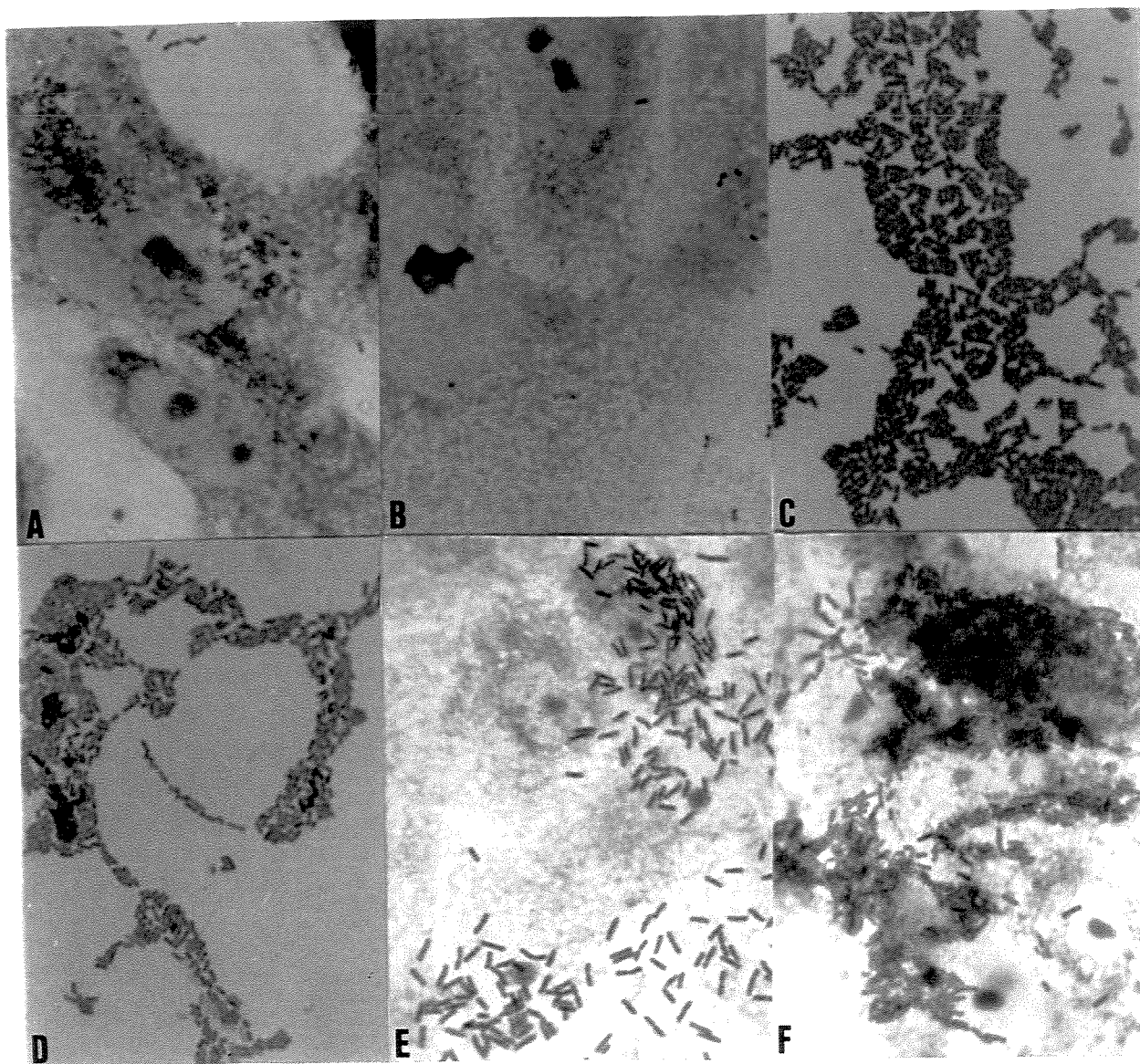


Figura 5. Adesão das linhagens de *E. coli* uropatogênicas em células HeLa. A : linhagem 154 na ausência de manose; B : linhagem 154 na presença de manose; C : linhagem 168 na ausência de manose; D : linhagem 168 na presença de manose; E : linhagem 178 na presença de manose; F : linhagem 178 na ausência de manose.

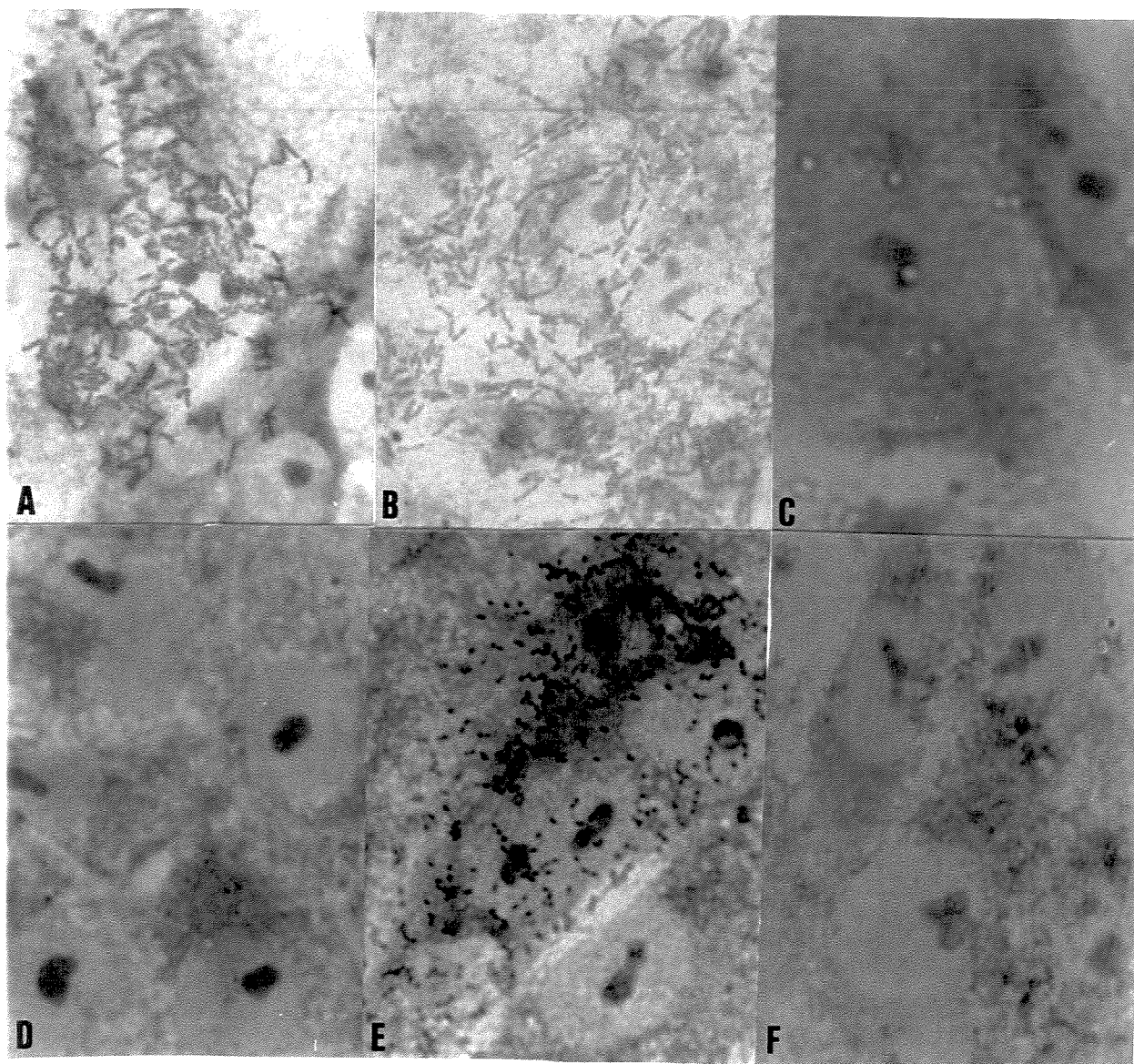


Figura 6. Adesão das linhagens de *E. coli* uropatogênicas em células HeLa. A : linhagem 189 na ausência de manose; B : linhagem 189 na presença de manose; C : linhagem 198 na ausência de manose; D : linhagem 198 na presença de manose; E : linhagem 202 na ausência de manose; F : linhagem 202 na presença de manose.



Tabela V : Capacidade de invasão de células HeLa das linhagens de *E.coli* uropatogênicas.

Linhagens	SM	CM
DT	+	+
28	+	+
33	-	-
46	-	-
66	+	+
168	+	+
178	-	-
189	-	-
202	+	+

SM = sem manose; CM = com manose.



#### 5. 4. Adesão de *Escherichia coli* em células uroepiteliais *in vitro*

Os resultados obtidos com este teste foram os mesmos observados nos testes de adesão com células HeLa, isto é, pode-se observar ao microscópio óptico diversas células uroepiteliais humanas colonizadas intensamente por bactérias da linhagem DT, demonstrando a capacidade de adesão da mesma.

#### 5. 5. Produção de sideróforos e fixação do corante vermelho de Congo

Os resultados obtidos com os testes de produção de sideróforos e da fixação do corante vermelho de congo para as linhagens *E. coli* uropatogênicas podem ser observados na Tabela VI. Segundo a referida Tabela, quatro linhagens apresentaram a capacidade de produção do sideróforo aerobactina (DT, 63, 189, 198) e as demais não apresentaram esta característica. Pode-se observar, ainda, que apenas duas linhagens (28 e 81) não foram capazes de fixar o corante vermelho de congo e as demais fixaram este corante.

#### 5. 6. Produção de hemolisina

Os resultados obtidos com o teste de verificação da produção de hemolisina pelas linhagens uropatogênicas de *E. coli* pode ser observado na Tabela VI. Deste modo, seis linhagens não foram

capazes de produzir hemolisina (33, 63, 81, 178, 198 e 202) e sete linhagens produziram esta toxina (DT, 28, 46, 66, 154, 168 e 189).

Tabela VI : Produção de sideróforo aerobactina, fixação do corante vermelho de congo e produção de hemolisina.

Linhagens	A	VC	H
DT	+	+	+
28	-	-	+
33	-	+	-
46	-	+	+
63	+	+	-
66	-	+	+
81	-	-	-
154	-	+	+
168	-	+	+
178	-	+	-
189	+	+	+
198	+	+	-
202	-	+	-

Onde: aerobactina = A, corante vermelho de congo = VC, hemolisina = H,  
+ = positivo, - = negativo.

### 5. 7. Extração de isoenzimas

A eletroforese das diferentes linhagens de *E. coli* uropatogênicas para as isoenzimas ADK (adenilato quinase), IDH (isocitrato desidrogenase),  $\alpha$ -EST (alfa-desidrogenase), PGI (fosfoglicoisomerase), HEX (hexoquinase), MDH (malato desidrogenase) e G6PDH (glicose-6-fosfato desidrogenase) permitiu a obtenção de diferentes perfis eletroforéticos. Segundo estes perfis, foi possível, no programa de computador NTSys, a confecção do dendograma que se apresenta na figura 7. O dendograma permitiu agrupar as diferentes linhagens de *E. coli* causadoras de infecção urinária em dois grupos (A e B).

---

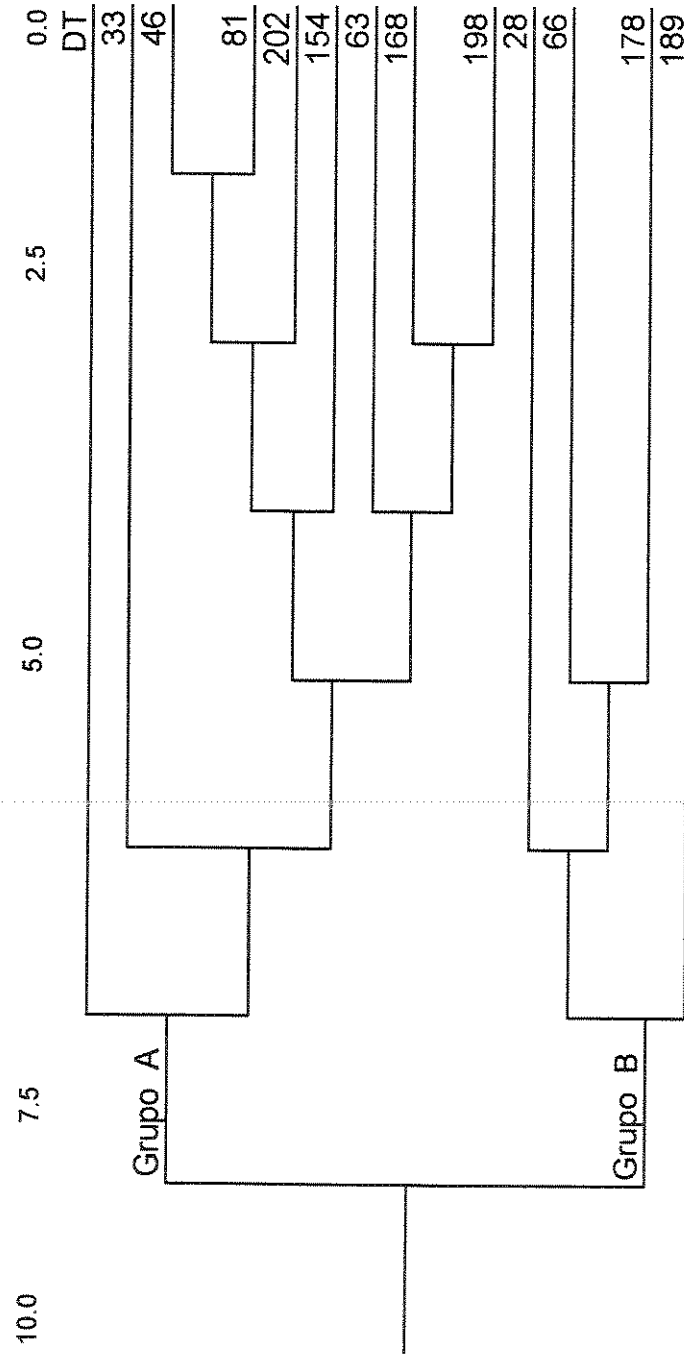


Figura 7. Dendrograma das dissimilaridades genéticas das linhagens de *E. coli* uropatogênicas, segundo o perfil eletroforético de isoenzimas.

## 5. 8. Determinação do perfil eletroforético do DNA através de Ribotipagem

A extração do DNA genômico e posterior ribotipagem das linhagens uropatogênicas de *E. coli*, permitiu a obtenção de um perfil eletroforético que foi utilizado no programa de computador NTSys para a confecção de um dendograma.

Apresentam-se as figuras 8 e 9 que reproduzem os aspectos radiográficos quando da digestão do DNA genômico pelas enzimas *Eco R I* e *Hind III*, respectivamente, a partir dos quais foi feito o dendograma. Segundo estas figuras (8 e 9), constatou-se uma melhor digestão do DNA com a utilização da enzima *HIND III*.

O resultado obtido com este teste pode ser observado na figura 10. A análise deste dendograma permitiu agrupar as diferentes linhagens de *E. coli* causadoras de infecção urinária em dois grupos (C e D).

---

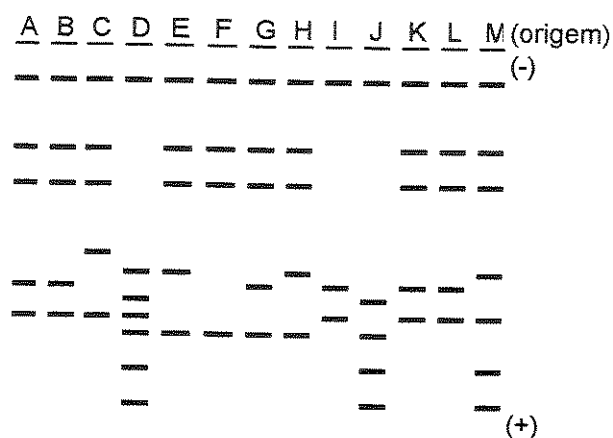


Figura 8. Gráfico representativo do aspecto radiográfico da eletroforese em gel de agarose (0,7 %), quando da utilização da enzima Eco R I para a digestão do DNA genômico. A:DT; B:28; C:33; D:46; E:63; F:66; G:81; H:154; I:168; J:178; K:189; L:198; M:202.

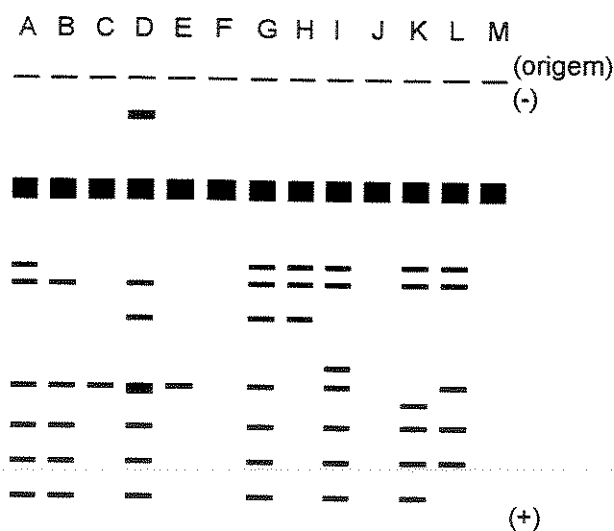


Figura 9. Gráfico representativo do aspecto radiográfico da eletroforese em gel de agarose (0,7 %), quando da utilização da enzima Hind III para a digestão do DNA genômico. A:DT; B:28; C:33; D:46; E:63; F:66; G:81; H:154; I:168; J:178; K:189; L:198; M:202.

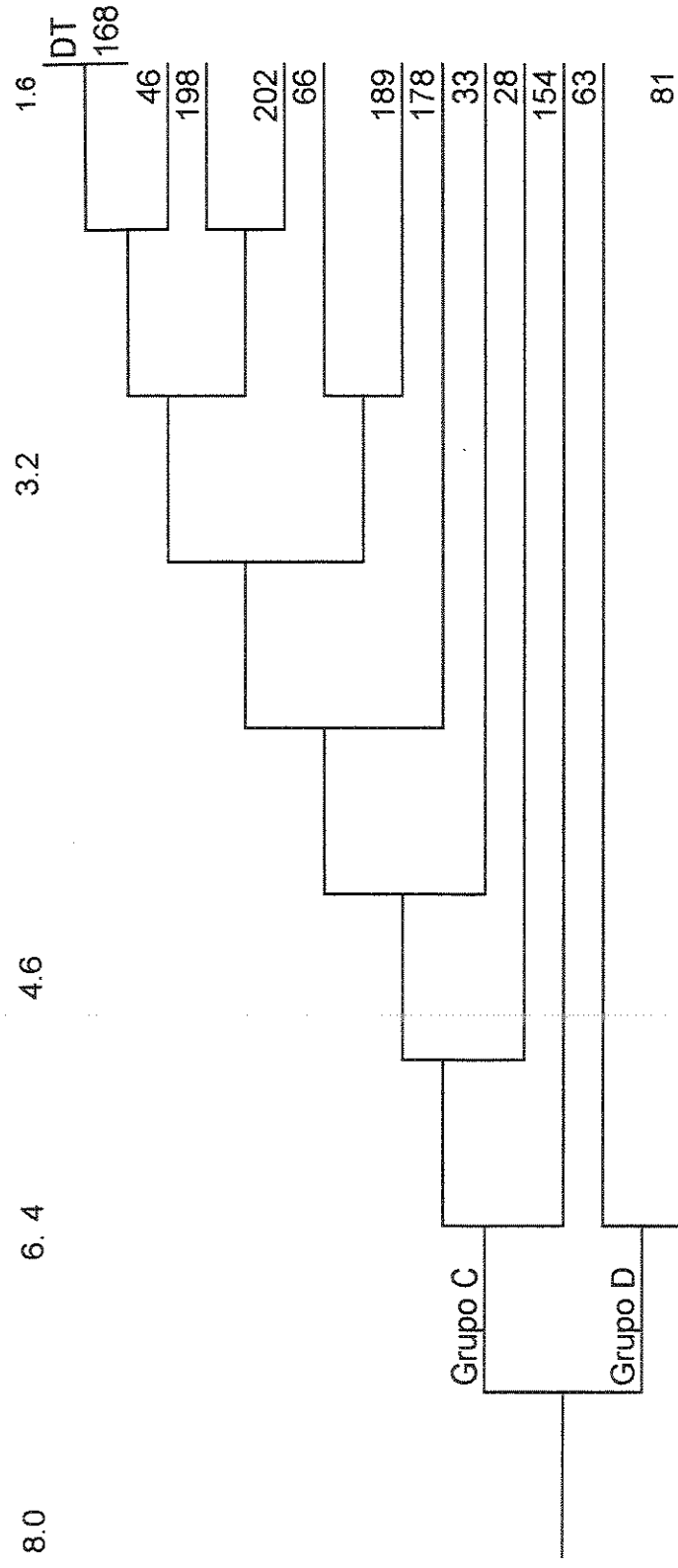


Figura 10. Dendrograma das dessemeilhaças genéticas das linhagens de *E. coli* uropatogênicas, segundo a técnica de Ribotipagem.



## 5. 9. Mutagênese

O processo utilizado para a obtenção de mutantes a partir da linhagem DT, através do transposon TnphoA, produziu 31 linhagens azuis Km<sup>R</sup>

O teste de adesão realizado nestas linhagens demonstrou que cinco delas (10, 12, 15, 16, 18) haviam perdido a capacidade de adesão em presença de D-manose, mas não em ausência deste açúcar, como pode ser observado na Tabela VII.

Tabela VII : Adesão em células HeLa dos mutantes da linhagem DT.

Linhagens mutantes (mut.):	6 horas	
	SM	CM
mut. A	+	+
mut. B	+	+
mut. 1	+	+
mut. 2	+	+
mut. 3	+	+
mut. 4	+	+
mut. 5	+	+
mut. 6	+	+
mut. 7	+	+
mut. 8	+	+
mut. 9	+	+
mut. 10	+	-
mut. 11	+	+
mut. 12	+	-
mut. 13	+	+
mut. 14	+	+
mut. 15	+	-
mut. 16	+	-
mut. 17	+	+
mut. 18	+	-
mut. 19	+	+
mut. 20	+	+
mut. 21	+	+
mut. 22	+	+
mut. 23	+	+
mut. 24	+	+
mut. 25	+	+
mut. 26	+	+
mut. 27	+	+
mut. 28	+	+
mut. 29	+	+

+ = positivo, - = negativo.

#### 5. 10. Cura de plasmídios através do tratamento com brometo de etídio

Este processo foi utilizado com a finalidade de se conseguir linhagens mutantes, a partir da linhagem DT, através da possível eliminação de plasmídios.

O resultado foi a obtenção de duas linhagens (TC1 e TC2) que apresentaram-se sensíveis ao antimicrobiano tetraciclina, sugerindo uma possível perda de plasmídio destas linhagens quando comparadas à linhagem selvagem.

#### 5. 11. Extração de DNA plasmidial (DT e mutantes)

A eletroforese em gel de agarose da linhagem DT e mutantes, obtidos como descritos no item 5.9, permitiu a obtenção do perfil eletroforético plasmidial que pode ser observado nas figuras a seguir.

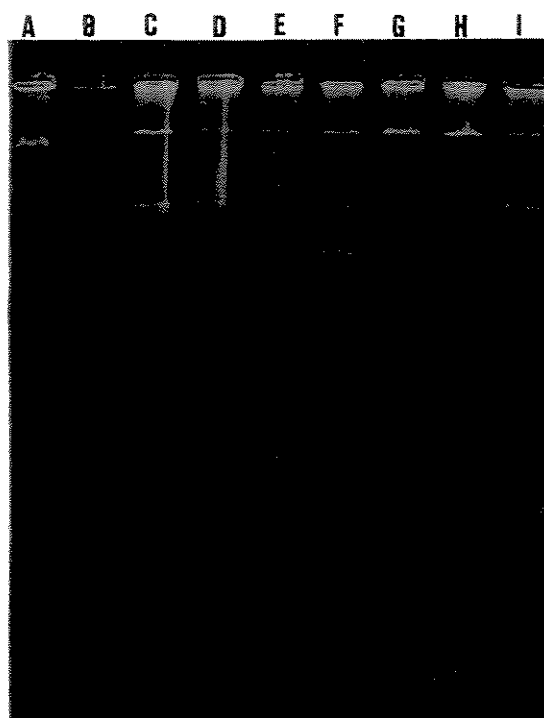


Figura 11. Gel de agarose (0,7 %) da eletroforese de DNA plasmidial das linhagens de *E. coli* uropatogênicas DT e mutantes. A : V 517; B : p307; C : DT; D : mut. A; E : mut. B; F : mut. 1; G : mut. 2; H : mut. 3; I : mut.

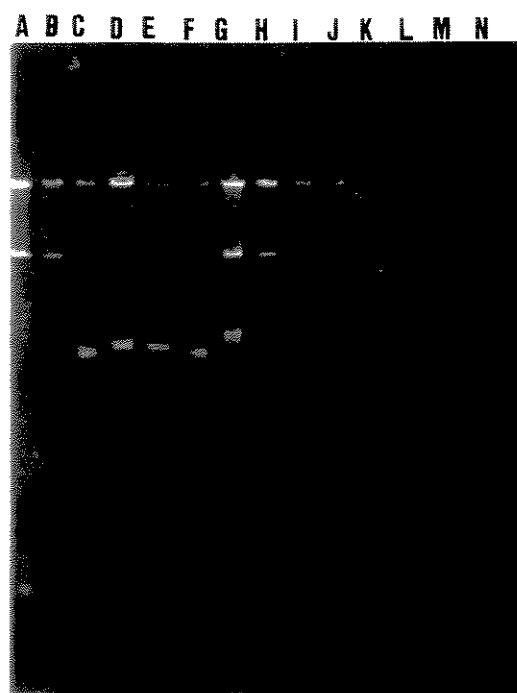


Figura 12. Gel de agarose (0,7 %) da eletroforese de DNA plasmidial das linhagens de *E. coli* uropatogênicas DT e mutantes. A : DT; B : DT (Sm+Tc); C : mut. 1; D : mut. 2; E : mut. 3; F : mut.4; G : mut. 5; H : mut. 6; I : mut. 7; J : mut. 8; K : mut. 9; L : mut. 10; M : mut. 11; N : mut. 12.

Sm-estreptomicina, Tc-tetraciclina.

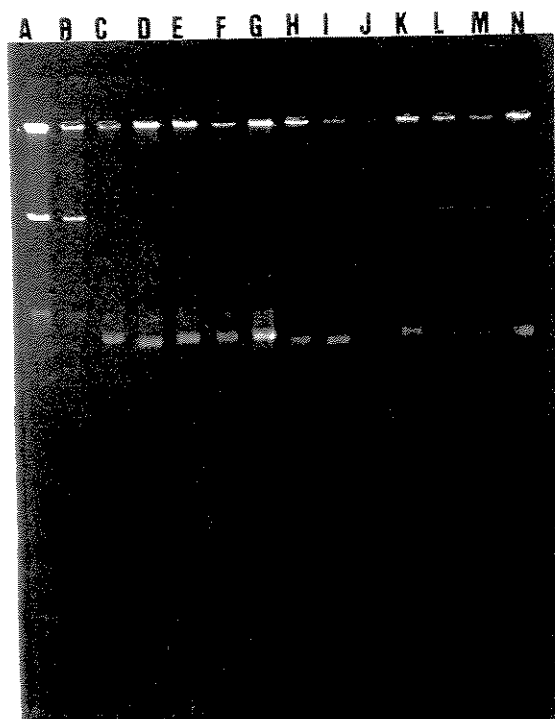


Figura 13. Gel de agarose (0,7 %) da eletroforese de DNA plasmidial das linhagens de *E. coli* uropatogênicas DT e mutantes. A : DT; B : DT (Sm+Tc); C : mut.13; D : mut. 14; E : mut. 15; F : mut. 16; G : mut. 17; H : mut. 18; I : mut. 19; J : mut. 20; K : mut. 21; L : mut. 22; M : mut. 23; N : mut.24.

Sm-estreptomicina;Tc-tetraciclina.

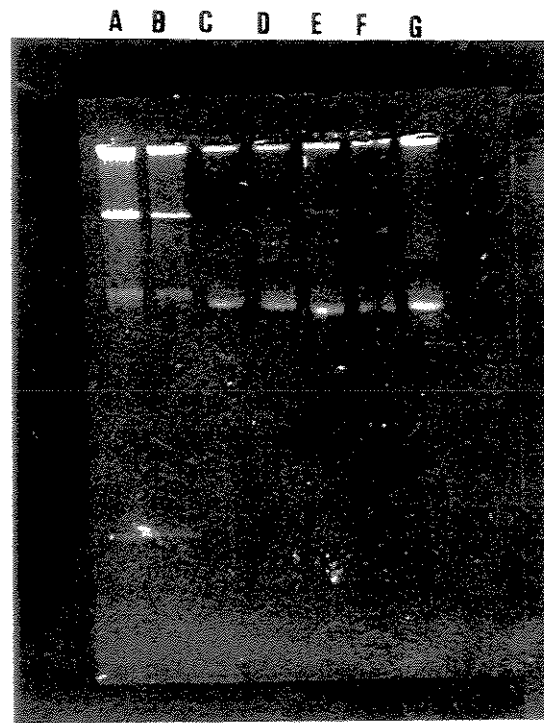


Figura 14. Gel de agarose (0,7 %) da eletroforese de DNA plasmidial das linhagens de *E. coli* uropatogênicas DT e mutantes. A : DT; B : DT (Sm+Tc); C : mut. 25; D : mut. 26; E : mut. 27; F : mut. 28; G : mut. 29.

Sm-estreptomicina; Tc-tetraciclina.

## 5. 12. Microscopia eletrônica

O procedimento da microscopia eletrônica foi feito com a linhagem uropatogênica DT para que se pudesse constatar a capacidade invasora desta bactéria, uma vez que em teste de invasão observado ao microscópio óptico pode-se constatar resultado falso positivo.

Porém, ao se analisar o resultado obtido por esta técnica (figura 15), concluiu-se que a linhagem uropatogênica DT é não invasiva, já que não se pode observar a bactéria no interior de células HeLa.

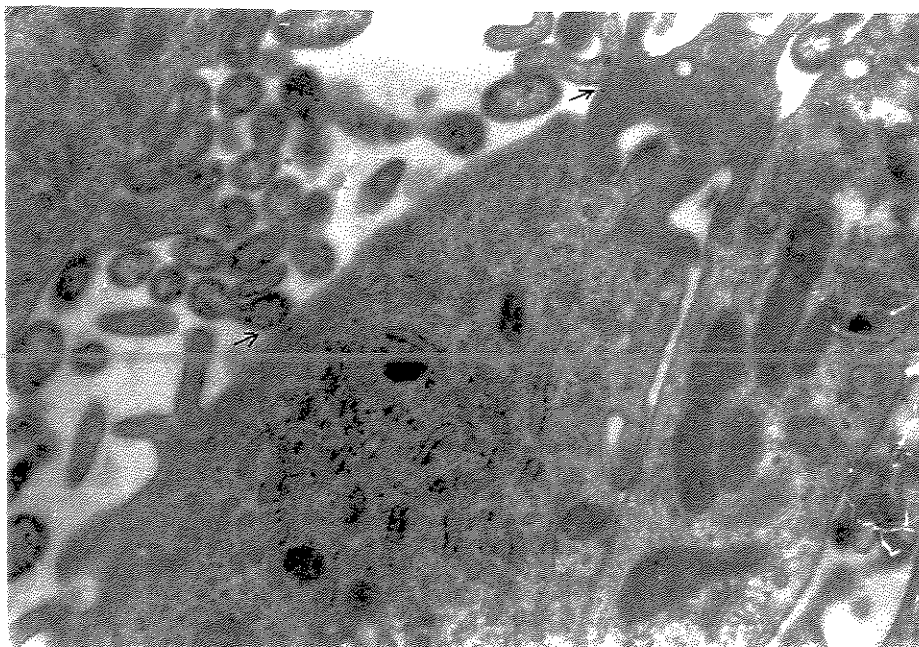


Figura 15 : Microscopia eletrônica do teste de invasão em células HeLa da linhagem uropatogênica DT. As setas mostram a bactéria aderida à superfície celular.



## 6. Discussão

A patogenicidade das linhagens de *Escherichia coli* causadoras de Infecções do Trato Urinário (ITU) está possivelmente associada a diversos fatores de virulência como, por exemplo, adesão às células epiteliais do hospedeiro, produção de hemolisina, produção de aerobactina, absorção do corante vermelho de Congo e resistência a antimicrobianos.

A adesão em células uroepiteliais do hospedeiro tem sido demonstrado como sendo um fator primordial para que uma linhagem bacteriana inicie sua infecção<sup>(2,10,14,16,19,24,32,33,34,43,46,50,53,64,69,74,85,88,102,104)</sup>. Esta adesão é feita através de fimbrias que podem pertencer a diversos tipos como : 1, P, Dr, S , F1C, G e X (M e G). Segundo Johnson (1991)<sup>(44)</sup>, as fimbrias tipo 1 estão presentes em 71 % da linhagens bacterianas isoladas de pacientes com sinais clínicos de cistite. Perugini e Vidotto (1996)<sup>(75)</sup> encontraram esta adesina em 87,5 % das linhagens isoladas de pacientes com cistite e 100 % das de pielonefrite. Leathart e Gally (1998)<sup>(56)</sup> encontraram a porcentagem de 80 % para os mesmos casos clínicos deste tipo de adesina. O tipo de adesão que é característica desta fimbria é a adesão difusa<sup>(43)</sup>.

A fimbria tipo P, segundo Brudastov (1994)<sup>(13)</sup> e Bingen (1998)<sup>(5)</sup>, está presente em 30 % das linhagens bacterianas isoladas de

pacientes com cistite e em 70 % e 80 % das linhagens bacterianas isoladas de pacientes com pielonefrite, respectivamente.

Johnson (1991)<sup>(44)</sup> relatou em seus estudos que as fimbrias Dr estão presentes em 26 a 50 % das linhagens de pacientes com cistite e em 6 % das linhagens de pacientes com pielonefrite. Ainda segundo este autor, as fimbrias S estão mais relacionadas às linhagens causadoras de meningite e bacteremia, sendo que os outros tipos fimbriais estão presentes em um número mais reduzido nas infecções de ITU.

Neste trabalho, os testes de adesão realizados em células HeLa cultivadas *in vitro* para as linhagens de *E. coli* uropatogênicas, observou-se que 9 apresentaram adesão manose resistente, o que indica que estas não possuem expressão de fimbrias do tipo 1 ou que possuem outro tipo de fimbria além desta. No entanto, a adesão tipo 1 é caracterizada como difusa e a maioria das adesões neste trabalho se apresentaram de forma agregativa. Foi encontrada somente uma linhagem (154) que apresentou-se como manose sensível, sugerindo a expressão de fimbria tipo 1. Este resultado diverge daqueles encontrados nos trabalhos descritos por Johnson (1991)<sup>(44)</sup>, Perugini e Vidotto (1996)<sup>(75)</sup>, Learthart e Gally (1998)<sup>(56)</sup>, nos quais a expressão deste tipo de fimbria foram, respectivamente, 26 a 50 %, 87, 5 % a 100 % e 80 %.

Os resultados sugerem que a fimbria presente nestas linhagens de *E. coli* possa ser do tipo P ou Dr. No entanto, para que tal

característica seja confirmada é necessário que outros testes sejam realizados.

Uma característica marcante neste teste de adesão foi a apresentada pela linhagem 168. Esta linhagem provocou uma destruição celular tão acentuada que, ao se observar ao microscópio, constatou-se a presença somente das bactérias, pois as células já haviam sido eliminadas. Como esta linhagem apresenta a produção de hemolisina (Tabela VI), acredita-se que, à semelhança do descrito por Falbo *et al.* (1992)<sup>(28)</sup>, esta enzima poderá ser a responsável por tal característica.

Verificou-se, também, que o tipo de adesão encontrada em quase todas as linhagens foi a do tipo agregativa. Segundo Nataro e Kaper (1998)<sup>(43)</sup>, a adesão enteroagregativa é característico daquelas linhagens que são responsáveis pela produção de diarreia do tipo mucosa em humanos. Como estas linhagens são causadoras de cistite ou pielonefrite, a possibilidade de que as mesmas sejam de origem fecal e que, portanto, atuem como linhagens patogênicas secundárias não pode ser descartada<sup>(104)</sup>. A produção de hemolisina por estas linhagens ainda não está claramente associada à virulência, porém vários estudos (Blum *et al.*, 1995<sup>(10)</sup>; Falbo *et al.*, 1992<sup>(28)</sup>; Hughes *et al.*, 1983<sup>(41)</sup>; Mendonça *et al.*, 1996<sup>(66)</sup>) concluíram que as linhagens que apresentavam a capacidade de produção desta toxina eram visivelmente mais virulentas que as que não a produziam, uma vez que a hemolisina pode atuar como fator de liberação de ferro das células do hospedeiro através da ruptura dos eritrócitos e outros tipos celulares.

Nestes estudos, tal característica também foi associada à capacidade de adesão em células epiteliais na presença de manose. Hughes *et al.* (1983)<sup>(41)</sup> examinaram a produção de hemolisina como um fator de virulência em ITU assintomáticas e sintomáticas com casos de ITU. Estes autores observaram que as linhagens hemolíticas apresentavam-se, na maioria, como adesão manose resistente. Estes autores, ainda, concluíram que a produção de hemolisina determina a atividade citotóxica da linhagem uropatogênica e que, quando associada à característica de resistência à manose, tal microrganismo possui elevado potencial de virulência. Falbo *et al.*<sup>(28)</sup> também estudaram a expressão de genes que codificam a produção desta associação à adesão manose resistente, concluindo que são ligadas. Segundo estes estudos, estas características são codificadas por genes presentes em regiões conhecidas como “ilhas de patogenicidade” (*Pais*). Esta afirmação também é feita por Blum *et al.*<sup>(10)</sup>, em seus estudos.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que das treze linhagens analisadas, 7 produziram hemolisina. Ao se associar produção de hemolisina e adesão positiva na presença de manose em células HeLa neste trabalho, observou-se que dentre aquelas linhagens que produziram tal substância, 6 apresentaram este tipo de adesão. Tais resultados confirmam aqueles encontrados pelos estudos de Hughes *et al.* (1983)<sup>(41)</sup>, Falbo *et al.* (1992)<sup>(28)</sup> e Blum *et al.* (1995)<sup>(10)</sup>, segundo os quais estas características estariam associadas à virulência das linhagens e codificadas por genes localizados nas *Pais*. No entanto, este trabalho não pode afirmar, como fizeram os autores citados, que

estas características são expressas juntamente nas “ilhas de patogenicidade”, já que não foi feito nenhum teste para se verificar a presença das mesmas.

Outra característica possivelmente associadas à virulência de linhagens de *E. coli* causadoras de ITU é a capacidade de produção de aerobactina, um sideróforo que possibilita que as bactérias obtenham o ferro necessário a sua sobrevivência a partir das células do hospedeiro<sup>(42)</sup>.

Johnson (1991)<sup>(44)</sup> relatou que linhagens de *E. coli* que apresentam o sistema aerobactina conseguem sobreviver mesmo em condições com baixas concentrações de ferro. Demonstrou, ainda, que há uma associação para a expressão de aerobactina e a fimbria P, mas não existe tal associação entre a aerobactina e a hemolisina. Segundo Johnson, isto ocorre porque as regiões gênicas para a expressão de aerobactina diferem conforme o fator de virulência em associação com a mesma.

Os resultados da análise das treze linhagens de *E. coli* estudadas demonstraram que dentre estas, 4 apresentaram a produção de aerobactina. Se dentre estas linhagens que apresentaram aerobactina se observar a capacidade de produção de hemolisina, verifica-se que 2 linhagens o fizeram. Porém, se se voltar a analisar aquelas linhagens que produziram hemolisina (7), constata-se que apenas 2 apresentaram aerobactina. Portanto, os resultados encontrados neste trabalho corroboram com aqueles relatados por Johnson (1991)<sup>(44)</sup>, uma vez que

parece não existir uma associação entre a expressão de aerobactina e hemolisina.

Ao se correlacionar a capacidade de adesão manose resistente, em células HeLa, com a produção de aerobactina, verifica-se que dentre as linhagens que apresentaram aerobactina, apenas 2 linhagens aderiram. Frente a estes resultados não se pode afirmar que, necessariamente, estes fatores estejam associados.

A absorção por bactérias do corante vermelho de Congo, em meio de cultura, é um teste que pode indicar a existência de um possível fator de virulência, uma vez que estudos já realizados<sup>(74)</sup> nesta área indicam que linhagens consideradas mais virulentas apresentam a capacidade de absorção deste corante.

O estudo das treze linhagens de *E. coli* analisadas neste trabalho mostrou que, dentre elas, 11 foram capazes de absorver o corante vermelho de Congo. Este resultado confirma aquele encontrado por Payne and Finklestein (1977)<sup>(74)</sup>.

Ao se correlacionar a absorção deste corante com outros possíveis fatores de virulência constatou-se que, dentre estas linhagens (11), 6 produziram hemolisina, 4 apresentaram produção de aerobactina e 8 apresentaram capacidade de adesão manose resistente em células HeLa. Estes resultados sugerem que pode haver uma correlação entre a capacidade de adesão e de absorção do corante vermelho de congo, já que um grande número de linhagens (8) apresentaram a duas características. Também há uma porcentagem significativa na associação do corante e capacidade de produção de

hemolisina. No entanto, não se pode afirmar que os genes responsáveis pela expressão destes fatores de virulência estejam localizados em uma mesma região gênica como em “ilhas de patogenicidade”, uma vez que não foram realizados testes para verificar esta característica.

Os resultados dos testes de hemolisina, aerobactina, vermelho de Congo e adesão foram analisados conjuntamente e se verificou que 2 (DT, 189) das treze linhagens apresentaram resultados positivos para os testes citados, sugerindo que as mesmas poderiam apresentar uma identidade genética.

A estrutura clonal das linhagens de *E. coli* estudada neste trabalho foi analisada segundo o perfil eletroforético plasmidial, o perfil eletroforético de DNA através de ribotipagem e o perfil de isoenzimas, sendo os mesmos de grande importância na caracterização de cada linhagem e na análise da existência de semelhanças evolutivas ou não entre elas.

Segundo Selander *et al.* (1986)<sup>(85)</sup>, o perfil eletroforético de isoenzimas tem sido o método utilizado para estudos genéticos de populações e sistemas eucarióticos e, mais recentemente, na análise da diversidade genética e na estrutura de populações naturais de uma variedade de espécies bacterianas. Em sua publicação, este autor questiona a capacidade do teste em revelar a verdadeira variação genética dentre as diversas espécies. O objetivo primário destas investigações foi estimar a relação genômica dentre as diversas linhagens. Para este propósito, um grande número de locus enzimáticos

foram utilizados, minimizando o erro estimado nos resultados da variação interlocus, na diversidade e na taxa de mudança evolutiva.

O perfil eletroforético de isoenzimas das linhagens em questão nos permitiu, a construção de um dendograma segundo as dessemelhanças genéticas das linhagens de *E. coli* uropatogênicas neste trabalho.

Este dendograma separou tais linhagens em dois grupos distintos, A e B. Ao se correlacionar estes grupos com os testes de hemolisina, aerobactina, vermelho de Congo e adesão, encontramos uma característica predominante somente no grupo B no que diz respeito ao teste de adesão, uma vez que todas as linhagens do mesmo (28, 66, 178, 189) apresentaram resultado positivo para este teste na ausência e na presença de manose.

Uma consideração, a qual pode ser feita, diz respeito às linhagens que apresentaram adesão sensível : todas elas (63, 81, 154, 198) apresentam-se no grupo A.

Através do dendograma verificou-se que as linhagens DT, 189, as quais apresentaram todos os resultados positivos para os testes já citados, o que poderia sugerir uma possível semelhança entre elas, não possuíam identidade genética uma vez que pertencem a grupos diferentes (A, B; respectivamente).

A linhagem 168 que apresentou como característica particular, no teste de adesão, a grande destruição celular localiza-se no grupo A, onde verifica-se que a capacidade de lise celular não pode



ser usada como técnica de identificação, apesar desta ser uma característica de patogenicidade.

O perfil eletroforético do DNA através de ribotipagem é outro teste que indica possíveis semelhanças genéticas para que se possa estabelecer uma possível origem comum entre as linhagens estudadas. Segundo Sarafian *et al.* (1991)<sup>(82)</sup>, a principal vantagem do método de ribotipagem é que uma simples investigação pode ser utilizada para estudar fragmentos genéticos de restrição de RNAr de muitas espécies bacterianas diferentes, pois o RNAr tem sido altamente conservado durante a evolução do que o restante do genoma. Ainda segundo este autor, a ribotipagem fornece um sistema altamente reproduzível e é referência de um teste seguro<sup>(82)</sup>. Portanto, este teste é mais preciso ao comparar as dessemelhanças genéticas de linhagens do que o teste de isoenzimas.

Também este dendograma separou as treze linhagens estudadas neste trabalho em dois grupos C e D, diferentes daqueles obtidos com a análise do perfil eletroforético de isoenzimas. Segundo a sua análise, observou-se que as únicas linhagens (63, 81) pertencentes ao grupo D apresentaram adesão negativa e não são capazes de produzir hemolisina, porém apresentam maior dessemelhança genética quando estudadas através da técnica de ribotipagem do que através de isoenzimas. Esta característica se reflete, também, em relação às outras linhagens estudadas.

As linhagens DT e 189 apresentaram-se, neste teste, no grupo C, representando um menor grau de dessemelhança genética quando comparado ao teste de isoenzimas.

Observou-se neste teste, também, que a linhagem 168 pertence ao grupo C e está junto a linhagem DT, o que pode sugerir uma semelhança genética maior, entre as mesmas, do que aquela verificada no dendograma de isoenzimas.

Linhagens que apresentaram perfis plasmidiais semelhantes também foram analisadas segundo estes testes. É o caso das linhagens 198 e 202. As dessemelhanças genéticas apresentaram-se maiores no dendograma de isoenzimas do que naquele segundo a técnica de ribotipagem.

A extração do DNA plasmidial nos auxilia na análise dos possíveis fatores de virulência, uma vez que correlacionando os testes para estes fatores com o perfil eletroforético no gel de agarose podemos verificar o aparecimento ou desaparecimento de plasmídios que estariam relacionados com estes fatores.

A análise do perfil plasmidial das linhagens de *E. coli* uropatogênicas mostrou algumas linhagens semelhantes como é o caso da 198 e 202. No entanto, apesar dos perfis serem semelhantes para DNA plasmidial, quando correlacionamos estes com os resultados do teste de adesão, observamos os resultados são opostos. O fato da linhagem 198 apresentar adesão negativa e a linhagem 202 adesão manose resistente sugere que a característica de adesão não é de caráter plasmidial. Estas linhagens apresentam resultados opostos

também para o teste de aerobactina, também indicando um caráter não plasmidial. No entanto, os resultados são semelhantes para os testes de hemolisina e absorção do corante vermelho de congo.

Vários estudos<sup>(34,40,64,91,93,106)</sup> relataram que linhagens de *E. coli* responsáveis por ITU agridem as camadas uroepiteliais dos hospedeiros através de sua adesão, e possível invasão, às células deste epitélio. Estas linhagens também podem produzir toxinas, como a hemolisina, que são prejudiciais às células uroepiteliais, uma vez que podem ocasionar a ruptura das mesmas.

Por esta razão, o teste de invasão foi realizado com as linhagens (DT, 28, 33, 46, 66, 168, 178, 189, 202) que apresentaram resultado positivo para o teste de adesão em células HeLa.

Os resultados deste teste, quando analisados ao microscópio óptico, mostraram que dentre as 9 linhagens 5 delas aparentemente invadiram as células HeLa, demonstrando que possivelmente estas foram capazes de lisar a camada de células HeLa e, talvez, poderiam também causar destruição uroepitelial. Dentre estas linhagens encontrou-se a linhagem 168, confirmando mais uma vez sua capacidade acentuada de destruição celular.

A linhagem DT por ter sido isolada de um caso de pielonefrite, foi mais estudada.

A microscopia óptica do teste de invasão da linhagem DT mostrou um resultado positivo, no entanto, o resultado para este mesmo teste na microscopia eletrônica mostrou resultado negativo. Frente a este fato, este trabalho sugere que, para se obter uma maior

segurança do resultado, seja feita a microscopia eletrônica para todos os testes de invasão que possam ser observados à microscopia óptica, além do teste de sensibilidade à gentamicina.

A mutagenicidade da linhagem DT com o transposon TnphoA resultou em 31 linhagens mutantes as quais foram testadas quanto à capacidade de adesão em células HeLa e caracterizadas segundo seus perfis plasmidiais. Os resultados dos testes de adesão mostraram que dos 31 mutantes, 5 apresentaram adesão manose sensível, indicando que o processo de mutagênese com o transposon TnphoA foi capaz de inibir a expressão de um outro tipo de fimbria que não a do tipo 1, a qual ainda se encontra presente, porém todos os testes realizados com estas linhagens (SDS-page e proteínas de superfície) não indicaram uma possível ausência de uma ou mais subunidades protéicas.

Analisando-se os perfis plasmidiais da linhagem DT e de seus mutantes, verificamos que muitos deles perderam o plasmídio de maior peso molecular presente na linhagem selvagem. Tal característica poderia explicar a perda de adesão naquelas cinco linhagens mutantes, porém a perda deste plasmídio também ocorreu em outros mutantes que aderem na presença de manose. Este fato sugere que a perda de adesão naqueles mutantes não está relacionado àquele plasmídio.

Verificou-se o surgimento de uma nova molécula plasmidial, a qual foi encontrada nas linhagens mutantes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, que sugere duas possibilidades : (1) um estado original de recombinação

entre plasmídios diferentes<sup>(37)</sup>, o qual, devido ao processo de mutagênese, tornou-se instável originando, agora, um plasmídio de menor peso molecular; (2) uma integração estável de plasmídio no cromossomo bacteriano que, devido ao processo de mutagênese, excisou-se, originando o plasmídio em questão.

## 7. Conclusão

Através deste trabalho pudemos concluir que uma característica comum à maioria das linhagens estudadas (9) é a adesão manose resistente e que as mesmas o fazem, em grande parte, através da forma agregativa.

Também concluímos que a linhagem DT não é do tipo invasiva e que para a confirmação desta característica nas demais linhagens seria conveniente a observação do teste ao microscópio eletrônico ou a confecção de teste de sensibilidade à gentamicina.

A associação de fatores como a produção de hemolisina, absorção do corante vermelho de Congo e a presença de aerobactina, demonstrou haver uma possível relação com o aumento de patogenicidade nas linhagens bacterianas que a apresentaram. No entanto, não foi possível, através das técnicas realizadas neste estudo, verificar se tais fatores de patogenicidade são expressos através das regiões ditas “ilhas de patogenicidade”.

Com relação à estrutura clonal das linhagens de *E. coli* uropatogênicas, não foi possível estabelecer semelhanças genéticas características dentre elas através dos perfis eletroforéticos de isoenzima, de ribotipagem e de DNA plasmidial.

Através do perfil eletroforético do DNA plasmidial concluímos que a característica de adesão não é de caráter plasmidial.

## Abstract

Thirteen *E. coli* strains isolated from Clinical Hospital patients of the State University of Campinas (UNICAMP) that suffered of urinary tract infection or pyelonephritis, were studied regarding their biochemical characteristics (isoenzymes electrophoretic profile), molecular characteristics (plasmid profiles, DNA profile by PFLP of rRNA) and pathogenicity characteristics (hemolysin and aerobactin production, *in vivo* absorption of Congo red dye and *in vivo* capacity of adherence and invasion in HeLa cells). One strain was mutagenised in order of locating possible genes involved with pathogenicity. The results obtained by isoenzymes and RFLP electrophoretic profiles allowed the construction of dissimilarity dendograms of different strains. With the exception of adherence capacity, none of the others studied characteristics could be associated with pathogenicity.

---

## 8. Referências Bibliográficas

1. Alonso, P., Blanco, J., Blanco, M. and Gonzalez, E. A. (1987). Frequent production of toxin by *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections-relation with haemmagglutination. **FEMS Microbiol. Lett.** **48** : 391-396.
2. Bartková, G., Ciznár, I. Lehotská, V. and Kernová, T. (1994). Characterization of adhesion association surface properties of uropathogenic *Escherichia coli*. **Folia Microbiol.** **39.** (5) : 373-377.
3. Bertin, Y. (1996). Rapid and specific detectation of F 17 related pili and adhesin genes in diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.** **34.** (12) : 2921-2928.
4. Beutin, L., Zimmermann, S. and Gleier, K. (1996). Rapid detection and isolation of Shiga- like toxin (verocytotoxin)- producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. **J. Clin. Microbiol.** **34.** (11) : 2812-2814.



5. Bingen, E. (1998). Virulence determinantes of uropathogenic *Escherichia coli*. **Arch. Ped.** **5** (SUPPL. 3) : 279S-281S.
  
6. Blanco, J., Alonso, M. P., Blanco, J. E. , González, E. A. and Garabal, J. I. (1992). Establishment of three categories of P-fimbriated *Escherichia coli* strains that show different phenotype and belong to particular O serogroups. **FEMS Microbiol. Lett.** **99** : 131-136.
  
7. Blanco , J., Alonso, M. P., Blanco, M. and González, E. A. (1991). Mecanismos de patogénesis de los *Escherichia coli* causantes de infecciones extraintestinales. **Enferm. Infect. Microbiol. Clin.** **9** : 640-651.
  
8. Blanco, J., Alonso, M. P., González, E. A., Blanco, M. and Garabal, J. I. (1990). Virulence factors of bacteraemic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotising factor (CNF) by P-fimbriated strains. **J. Med. Microbiol.** **31** : 175-183.
  
9. Blanco, J., Blanco, M., Alonso, M. P., Blanco, J. E., González, E. A. and Garabal, J. I. (1992). Characteristics of haemolytic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotizing type 1 (CNF1). **Rev. Microbiol.** **143** : 869-878.

10. Blum, G., Falbo, V., Caprioli, A. and Hacker, J. (1995). Gene clusters encoding the cytotoxinecrotizing factor type 1, P-fimbriae and alfa hemolysin from pathogenic island II of the neuropathogenic *Escherichia coli* strain J 96. **FEMS Microbiol.** **126** : 189-196.
  
11. Blum,H., Falbo, V., Caprioli, A. and Hacker, J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis.** **8** : 93-99.
  
12. Boyd, E. F. and Hartl, D. L. (1998). Chromossomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. **J. Bacteriol.** **180.** (5) : 1159-1165.
  
13. Brudastov, Y. A. and Duryabin, D. G. (1994). Biological significance of anticomplementary activity of bacteia. **Zhurnal Mikrobiol. Epid. Imun. O.** (suppl.) : 28-32.
  
14. Bullit, E. and Makowski, L. (1995). Strutural polymorphism of bacterial adhesion pili. **Nature.** **373** : 164-167.

15. Caprioli, A., Falbo, V., Ruggeri, F. M., Minelli, F., Ørsov, I. and Donelli, G. (1989). Relationship between cytotoxic necrotizing factor production and serotype in hemolytic *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.** **27** : 758-761.
16. Carnoy, C. and Moseley, S. L. (1997). Mutational analysis of receptor binding mediated by the Dr family of *Escherichia coli* adhesins. **Mol. Microbiol.** **23**. (2) : 365-379.
17. Chen, J. Y., Zhan, L., Su, Q. and Renn, Z. (1994). Molecular cloning of the adherence gene cluster from uropathogenic *Escherichia coli* and preparation of its antisera. **Weishengwu Xuebao.** **34**. (6) : 422-427.
18. Chen, J. Y., Su, Q., He, J. M. (1994). Studies on virulence factors of *Escherichia coli* isolated from urine. **Zong. Weish. He Mian. Z.** **14**. (6) : 380-382.
19. Connel, H., Agace, W., Klemm, P., Schembri, M. Marild, S. and Svanborg, C. (1996). Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for urinary tract. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **93** : 9827-9832.

20. Curtiss, III, R., Morelli, A.T. and Gilig, P. A. (1989). Genetic analysis of pathogenesis of enteric bacteria. In Owen, P. & Foster, T. J. (ed). **Immun. Mol. Gen. A. of Bact.** (6) : 67-81.
  
21. De Rycke, J., González, E. A., Blanco, J., Oswald, E., Blanco, M. and Boivin, R. (1990). Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.** **28** : 694- 699.
  
22. Domingue, G., Roberts, J. A., Laurica, R., Ratner, M. H., Bell, D. P., Suarez, G. M., Kallenius, G. and Svenson, S. (1995). Pathogenic significance of P -fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections. **J. Urol.** **133** : 983-989.
  
23. Drasar, B. S. and Hill , M. J. (1974) . Human intestinal flora. The distribution of bacterial flora in the intestine. London, Academic Press. 36-43.
  
24. Eden, C. S., Eriksson, B. and Hanson, L. A. (1977). Adhesion of *Escherichia coli* to human uroepithelial cells *in vitro* . **Infect. Immun.** **18.** (3) : 767-774.
  
25. Edwards, P. R. and Ewing, W. H. (1972). Identification of *Enterobacteriaceae*. **Burges Plublishing Co.**

26. Elliott, S. J., Srinivas, S., Albert, M. J., Alam, K., Robins, B. R. M., Gunzburg, S. T., Mee, B. and Chang, B. J. (1998). Characterization of the roles of hemolysin and others toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic *Escherichia coli* linked to human diarrhea. **Infect. Immun.** **66**. (5) : 2040-2051.
  
27. Ewing, W. H. Edwards and Ewing's identification of enterobacteriaceae, 4th edition. Elsevier Science Publishing, Co., Inc., New York. 1986.
  
28. Falbo, V. Famiglietti, M. and Caprioli, A. (1992). Gene block encoding production of cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin in *Escherichia coli* isolates from extraintestinal infections. **Infect. Immun.** **60**. (6) : 2182-2187.
  
29. Fantinatti, F., Silveira, W. D. and de Castro, A. F. P. (1994). Characteristics associated with pathogenic of avian septicaemic *Escherichia coli* strains. **Vet. Microbiol.** **41** : 75-86.
  
30. Flatau, G., Lemichez, E., Gauthier, M., Chardin, P., Paris, S., Fiorentini, C. and Boquet, P. (1997). Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. **Nature.** **387** : 729-733.

31. Finlay, B. B. and Falkow, S. (1989). Common themes in microbial pathogenicity. **Microbiol. Rev.** **53** : 210-230.
  
32. Foxman, B., Zhang, L., Palinn, K., Tallman, P. and Marrs, C. F. (1995). Bacterial virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates from first time urinary tract infection. **J. Infect. Diseases.** **171** : 1514-1521.
  
33. Garcia, M. I., Labgne, A. and Bouguenec, C. L. (1994). Nucleotide sequence of the afimbrial adhesin encoding AFA 3 gene cluster and its translocation via flanking IS 1 insertion sequences. **J. Bacteriol.** **176**. (24) : 7601-7613.
  
34. Goluszko, P., Popov, V., Selvarangan, R., Nowicki, S., Pham, T. and Nowicki, B. J. (1997). Dr fimbriae operon of uropathogenic *Escherichia coli* mediate microtubule-dependent invasion to the HeLa epithelial cell line. **J. Infect. Dis.** **176** : 158-167.
  
35. Hacker, J., Oehler, G. B., Mühldorfer, I. and Tschäpe, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Mol. Microbiol.** **23**. (6) : 1089-1097.

36. Hagberg, L., Jodal, U., Korhonen, T. K., Janson, G. L., Lindberg, U. and Eden, C. S. (1981). Adhesion, hemagglutination and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections. **Infect. Immun.** **31**. (2) : 564-570.
37. Hardy, K. G. Plasmids. A practical approach, 2nd edition. IRL Press, Oxford University Press. 1993.
38. Harry, E. G. and Hemsley, L. A. (1965). The association between the presence of septicaemic strains of *Escherichia coli* in respiratory and intestinal tracts of chicken and the occurrence of coli septicemia. **Vet. Record.** **77** : 35-40.
39. Hison, G. and Williams, P. H. (1989). Adhesins of pathogenic *Escherichia coli*. In Hapwood, D. A. & Chater, K. E. **Gen. of Bact. Div. 14** : 287-307. London, Academic Press.
40. Hopkins, W. J., Fitzpatrick, A. G., McCarthy, D., Haine, J. E. and Uehling, D. T. (1996). Lipopolysaccharide-responder C 3H mouse strains are equally susceptible to na induced *Escherichia coli* urinary tract infection. **Infect. Immun.** **64**. (4) : 1369-1372.

41. Hughes, C., hacker, J., Roberts, A. and Goebel, W. (1983). Hemolysin production as a virulence marker in symptomatic and asymptomatic urinary tract infections by *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** **39.** (2) : 546-551.
  
42. Iwahi, T., Abe, Y. and Tsuchiya, K. (1982). Virulence of *Escherichia coli* in ascending urinary tract infection in mice. **J. Med. Microbiol.** **15** : 303-316.
  
43. James, P. N. and James, B. K. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Cl. Microbiol. Rev** : 142-201.
  
44. Johnson, J. R., (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol. Rev.** **4.** (1) : 80-128.
  
45. Johnson, J. R., Roberts, P. L. and Stamm, W. E. (1987). P-fimbriae and other virulence factors in *Escherichia coli* urosepsis- association with patients characteristics. **J. Infect. Dis.** **156** : 225-229.
  
46. Johnson, J. R., Skubitz, K. M., Nowicki, B. J., Palaz, K. J. and Rakita, R. M. (1995). Nonlethal adherence to human neutrophils mediated by Dr. antigen-specific adhesins of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** **63.** (1) : 309-316.



47. Johnson, J. R., Stapleton, A. E., Russo, T. A., Scheutz, F., Brown, J. J. and Maslow, J. (1997). Characteristics and prevalence within serogroup O 4 of a J 96-like clonal group of uropathogenic *Escherichia coli* O 4: H 5 containing the class I and class III allele of *pap G*. **Infect. Immun.** **65**. (6) : 2153-2159.
  
48. Johnson, J., Brown, J. J., Carlino, U. and Russo, T. A. (1998). Colonization with and acquisition of uropathogenic *Escherichia coli* as revealed by polymerase chain reaction-based detection. **J. Infect. Dis.** **177**. (4) : 1120-1124.
  
49. Jouve, M., Garcia, M. I., Courcoux, P., Labigne, A., Gounon, P. and Le Bouguenec, C. (1997). Adhesion and invasion of HeLa cells by pathogenic *Escherichia coli* carrying the *afa-3* gene cluster are mediated by AfaE and AfaD proteins, respectively. **Infect. Immun.** **65**. (10) : 4082-4089.
  
50. Kisielius, P. V., et al. (1989). *In vivo* expression and variation of *Escherichia coli* type 1 and P pili in the urine of adults with acute urinary tract infections. **Infect. Immun.** **57**. (6) : 1656-1662.

51. Kreft, B., Placzek, M., Doehn, C. Haecker, J., Schimit, G, Wasenauer, G., Daha, M. R., Woude, F. J. and Sack, K. (1995). S fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* bind to primary human renal proximal tubular epithelial cells but not induce expression of intercellular adhesion molecule 1. **Infect. Immun.** **63.** (8) : 3235-3238.
52. Kuhar, I., Grabnar, M. and Zgur, B. D. (1998). Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli* in fecal strains from intestinal infections and healthy individuals. **FEMS Microbiol. Lett.** **164.** (2) : 243-248.
53. Laemmli, U., K. (1970). Cleavage of structural genes during the assembly of the head of bacteriophage T 4. **Nature.** **227** : 680-685.
- 
54. Lanne, B., Olsson, B. M., Jovall, P. A., Angström, J. Lindres, H., Marklund, B. I., Bergström, J. and Karlsson, K. A. (1995). Glycoconjugate receptors for P-fimbriated *Escherichia coli* in the mouse. **J. Biol.Chemistry.** **270.** (15) : 9017-9025.

55. Le Bougenec, C. et al. (1992). A rapid and specific detection of the *pap*, *afa* adhesins-encoding operons in uropathogenics *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** **30** : 1189-1193.
  
56. Leathart, J. B. S. and Gally, D. L. (1998). Regulation of type fimbrial 1 expression in uropathogenic *Escherichia coli* : Heterogeneity of expression through sequence changes in the fim switch region. **Mol. Microbiol.** **28**. (2) : 371-381.
  
57. Levine, M. M. (1985). *Escherichia coli* infections. **New Engl. J. Med.** **313** : 445-447.
  
58. Levine, M. M. (1984). *Escherichia coli* infection. In **Bacterial Vaccines**. **7** : 187, London Academic Press.
  
59. Levine, M. M. & Edelman, R. (1984). Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea : epidemiology and pathogenesis. **Epidem. Rev.** **6**: 31-51.
  
60. Levine, M. M. (1987). *Escherichia coli* that cause diarrhea-Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic and Enteroadherent. **J. Infect. Dis.** **15** : 377-389.

61. Li, M., Mizuochi, U., Naide, Y. et al. (1995). The primary research on the attachment and adhesin's expression of type E. *coli*. **Weishengwu Xue Bao** .15. (1) : 99-101.
  62. Martin, C. et al. (1997). Human uropathogenic and bovine septicaemic *Escherichia coli* strains carry an identical F 17-related adhesin. **Res. Microbiol.** 148 : 55-64.
  63. Matsumoto, T. (1998). Virulence factors and host responses in urinary tract infections. **J. UOEH.** 20. (10) : 45-60.
  64. McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Donnenberg, M. S. and Kaper, J. B. (1995). A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc.Natl.Sci.USA.** 92 : 1664-1668.
- 
65. McIver, C. J. and Tapsall, J. W. (1995). Virulence and other phenotypic characteristics of urinary isolates of cysteine-requiring *Escherichia coli*. **J. Microbiol.** 42 : 39-42.
  66. Mendonça, S, Seixas, C. S., Nogueira, P. A., Fantinatti, F, Oliveira, U. M. and Sliveira, W. D. (1996). Pathogenic characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains. **Braz. J. Gen.** 19 : 365-372.

67. Mitsumori, K., Terai, A., Yamamoto, S. and Yoshida, O. (1997).  
Virulence characteristics and DNA fingerprints of *Escherichia coli* isolated from women with acute uncomplicated pyelonephritis. **J. Urol.** **158.** (6) : 2329-2332.
  
68. Mobley, H. L. T., Island, M. D. and Massad, G. (1994). Virulence determinants of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*.  
**Kidney Intern.** suppl.0 (47) : S 129-S 136.
  
69. Mouriño, N., Madrid, C., Balsaobre, C., Prenafeta, A., Muñoa, F., Blanco, J., Blanco, M. and Juarez, A. (1996). The Hha protein as a modulator of expression of virulence factors in *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** **64.** (7) : 2881-2884.
  
70. Nimmich, W., Voight, W. and Seltsmann, G. (1997).  
Characterization of urinary *Escherichia coli* O 75 strains. **J. Cl. Microbiol.** **35.** (5) : 1112-1117.
  
71. Ørskov, I. and Ørskov, F. (1985). *Escherichia coli* to HeLa cells.  
**Infect. Immun.** **45** : 534-536.
  
72. Ørskov, I and Ørskov, F. (1977). Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. **Bacteriol. Reviews.** **41:** 667-710.

73. Otto, G., Sandberg, T. Marklund, B. I., Ulleryd, P. and Savanborg, C. (1993). Virulence factors and *pap* genotype in *Escherichia coli* isolates from women with acute pyelonephritis with or without bacteremia. **Clin. Infect.Dis.** 17 : 448-456.
  
74. Payne, S.M. and Finklestein, R.A. (1977). Detection and differentiation of iron-responsive avirulent mutants on congo red agar. **Infect. Immun.** 18 : 94-98.
  
75. Perugini, M. R. and Vidotto , M. C. (1996). Frequency of *pap* and *pil* operons in *Escherichia coli* strains with urinary infections. **B. J. Med. Biol. Res.** 29 : 351-357.
  
76. Pham, T., Kaul, A., Hart, A., Goluszko, Moulds, J, Nowicki, S., Lublin, D. and Nowicki, B. J. (1995). *dra*-Related X adhesins of gestacional pyelonefritis-associated *Escherichia coli* recognize SCR-3 and SCR-a domains of recombinant decay accelerating fator. **Infect.Imun.**63. (5) : 1663-1668.
  
77. Puzová, H., Siegfried, L., kmetová, M., Filka, V., Takácová and Durovicová, J. (1994). Fimbriation , surface hydrophobicity and serum resistance in uropathogenic strains of *Escherichia coli*. **FEMS Immun. Med. Microbiol.** 9 : 223-230.

78. Rhen, V. V., Elo, J., Väisänen, E., Siitonen, Ørskov, I., Ørskov, F., Svenson, S. B., Mäkelä, P. H. and Korhonen, T. K. (1984). P-fimbriated clones among uropathogenic *Escherichia coli* strains. **Infect. Immun.** **43.** (1) : 149-155.
79. Robins-Browne, R. M. (1987). Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. **Reviews Inf. Dis.** **9:** 28-53.
80. Saarela, S., Taira, S. et al. (1995). The E.coli G-fimbrial lectin protein participates both in fimbrial biogenesis and in recognition of the receptor N-acetyl D-glucosamine (1995). **J. Bact.** **177.** (6) : 1477-1484.
81. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning-a laboratory manual. 2nd. ed. V.1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
82. Sarafian *et al.* (1991). Molecular characterization of *Haemophilus ducreyi* by ribosomal DNA fingerprinting. **J. Clin. Microb.** **29.** (9) : 1949-1954.
83. Scaletsky, I. C. A., Silava, M. L. M. and Trabulsi, L. R. (1984). Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.** **45** : 534-536.

84. Schaechter, M. et al. Mechanisms of Microbial Disease, 2nd edition. Williams & Wilkins, Co., Maryland. 1993.
85. Selander, R. K., Caugant, D. A., Ochman, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N. and Whittam, T. S. (1986). Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Appl. Environ. Microbiol.** **51.** (5) : 873-884.
86. Silveira, W. D., Fantinatti, F. and de Castro, A.F. P. (1994). Transposon mutagenesis and membrane protein studies in an avian colisepticaemic *Escherichia coli* strain . **Braz. J. Gen.** **17.** 9-14.
87. Söderhall, M., Normark, S., Ishikawa, K., Karisson, K. A., teneberg, S., Winberg, J. and Möllby, R. (1997). Induction of protective immunity after *Escherichia coli* bladder infection in primates : Dependence of the globoside-specific P-fimbrial tip adhesin and its cognate receptor. **J. Clin. Invest.** **100.** (2) : 364-372.



88. Sperandio, V. and Silveira, W. D. (1993). Comparison between enterotoxigenic *Escherichia coli* strains expressing F42, F41 and K99 colonization factors. **Microbiol. Immunol.** **37** : 869-875.
89. Stapleton, A . E., Stroud, M. R., Hakomori, S. I., Stamm, W. E. (1998). The globoseries glycosphingolipid sialosyl globoside is found in urinary tract tissues and is a preferred binding receptor *in vitro* for uropathogenic *Escherichia coli* expressing pap-encoded adhesins. **Infect. Immun.** **66.** (8) : 3856-3861.
90. Striker, R., Nilsson, U., Stonecipher, A., Magnusson, G. and Hultgren, S. J. (1995). Structural requirements for the glycolipid receptor of human uropathogenic *Escherichia coli*. **Molec.Microbiol.** **16.**(5) : 1021-1029.
91. Susa, M., Kreft, B., Wasenauer, G., Ritter, A., Hacker, J. and Marre, R. (1996). Influence of cloned tRNA genes from a uropathogenic *Escherichia coli* strain on adherence to primary human renal tubular epithelial cells and nephropathogenicity in rats. **Infect. Immun.** **64.** (12) : 5390-5394.
92. Sussman, M. The virulence of *Escherichia coli*. Reviews and methods. The Society for General Microbiology by Academy Press. 1985.

93. Swenson, D. L., Bukanov, N. O., Berg, D. E. and Welch, R. A. (1996). Two pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* J 96: cosmid cloning and sample sequencing. **Infect. Immun.** **64.** (9) : 3736-3743.
94. Taylor, R. K., Manoil, C. and Mekalanos, J. J. (1989). Broad-host-range vectors for delivery of Tnpho A-Use in Genetic analysis of secret virulence determinants of *Vibrio cholerae*. **J. Bacteriol.** **171** : 1870-1878.
95. Toledo, M. R. F. et al. (1992). EPM-modificação do meio de Rugai e Araújo para atualização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glucose, ácido sulfúrico e triptofano desaminase. **Rev. Microbiol.** **13** : 309-315.
96. Toledo, M. R. F. et al. (1992). Um meio para a realização dos testes de motilidade, indol, lisina descarboxilase. **Rev. Microbiol.** **13** : 230-253.
97. Trabulsi, L. R. Microbiologia, 2<sup>a</sup> ed. Livraria Atheneu Editora. 1991.
98. Trabulsi, L. R. et al. (1984). *Escherichia coli* enteropathogenica. **Adel. Microbiol. Enf. Infect.** **3**: 62-95

99. Vaisanen, V., Tallgren, L. G., Makela, P. H., Kallenius, G. Hultberg, H., Elo, J., Siitonen, A., Svanborg-Eden, C., Svenson, S. B. and Korhonen, T. (1981). Mannose-resistant haemagglutination and P antigen recognition are characteristics of *Escherichia coli* causing primary pyelonephritis. **Lancet,ii** : 1366-1369.
  
100. Van den Bosch, J. F. et al. (1992). Virulence of urinary and fecal *Escherichia coli* relation to serotype, haemolysis and haemmagglutination. **J. Hyg. Camb. 88** : 567-577.
  
101. Vilamu, M. and Vives, R.J. Cell viability and metabolic activity during starvation-survival of uropathogenic *Escherichia coli* in artificial urine (1994) **Biomed.Lett. 50.** (197) : 7-15.
  
102. Vilamu, M. and Vives, R.J. Fluorogenic assay for immediate presumptive detection of *Escherichia coli* in urine. **Kidney Int. suppl. O .** (47) : S 129-S 136.
  
103. Vranes, J. Hemagglutination ability and adherence to the Buffalo green monkey cell line of uropathogenic *Escherichia coli*. **APMIS. 105.** (11) : 831-837.

104. Wu, X., Sun, T. T. and Medina, J. J. (1996). *In vitro* binding of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to uroplakins Ia and Ib:relation to urinary tract infections. **Proc. Natl . Acad. Sci. USA. 93** : 9630-9635.
105. Yuri, K., Nakata, K., Katae, H., Yamamoto, S. and Hasegawa, A.. (1998). Distribution of uropathogenic virulence factors among *Escherichia coli* strains isolatede from gogs and cats. **J. Vet. Med. Sc. 60.** (3) : 287-290.
106. Zhang, L., Foxman, B., Tallman, P., Cladera, E., Le Bouguenec, C. and Marrs, C. F. (1997). Distribution of *drb* genes coding for Dr binding adhesins among uropathogenic and fecal *Escherichia coli* isolates and identification of new subtypes. **Infect. Immun. 65.** (6) : 2011-2018.
-