

DOMINGOS DA SILVA LEITE

*Este exemplar corresponde a redação final da tese  
do aluno Domingos da Silva Leite e aprovada pela  
comissão julgadora 20/ Junho/86  
mauf*

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO  
FATOR DE COLONIZAÇÃO ( F42 ) DE *Escherichia coli*  
ENTEROTOXIGÊNICA DE ORIGEM SUÍNA.

Tese apresentada ao curso de  
Pós-Graduação em Imunologia do  
Instituto de Biologia da Uni-  
versidade Estadual de Campinas,  
para obtenção do grau de  
Mestre.

CAMPINAS

1986

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais.

Prof. Dr. TOMONASA YANO  
orientador

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Para a sua realização, nos foi concedida bolsa de mestrado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). O auxílio financeiro ao projeto foi concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através do Programa Nacional de Saúde Animal e pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

## AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Tomomasa Yano

Prof. Dr. A. F. Pestana de Castro

Profª. Dra. Marlene B. Serafim

Profª. M. Silvia V. Gatti

Prof. Dr. I. J. B. de Camargo

Profª. Dra. Julia K. Sakurada

Prof. Cleuber Franco Fontes

Profª. Margarette S. Oliveira

Manoel Bernardo da Silva

Ana Stela Menegon

Dirce Lima Gabriel

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São  
Paulo

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
Tecnológico

FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos

Colegas do Curso de Pós-Graduação e Funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas.

## ÍNDICE

|   | Página |
|---|--------|
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 01     |
| 1.1. Hemaglutinação .....   | 04     |
| 1.2. Condições que afetam a produção dos Antígenos de<br>Aderência "in vitro" ..... | 06     |
| 1.3. Características Físico-Químicas .....  | 08     |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....   | 12     |
| 2.1. Amostras .....   | 12     |
| 2.2. Antissoros .....   | 12     |
| 2.3. Prova de Microhemaglutinação Manose-Resistente .....                           | 13     |
| 2.3.1. Preparo das suspensões bacterianas .....                                     | 13     |
| 2.3.2. Padronização das hemácias .....  | 13     |
| 2.3.3. Teste .....  | 13     |
| 2.4. Seleção do Meio de Cultura .....   | 14     |
| 2.5. Fatores que Influenciam a Produção do Antígeno F42 .....                       | 14     |
| 2.5.1. Efeito da temperatura .....  | 14     |
| 2.5.2. Efeito da alanina e acetato de sódio .....                                   | 15     |
| 2.5.3. Efeito da glicose .....  | 15     |
| 2.5.4. Efeito do pH do meio mínimo A (MMA) na produção<br>do antígeno F42 .....     | 16     |
| 2.6. Purificação do Antígeno F42 .....  | 16     |
| 2.6.1. Extração do antígeno F42 .....   | 16     |
| 2.6.2. Precipitação com sulfato de amônio .....                                     | 17     |
| 2.6.3. Tratamento com desoxicolato de sódio (DOC) .....                             | 17     |

|  |    |
|--|----|
| 2.6.4. Cromatografia de exclusão molecular em<br>Sephárose 4B .....                  | 17 |
| 2.7. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida - Dodecil Sulfato<br>de Sódio (SDS) ..... | 18 |
| 2.8. Caracterização Físico-Química Parcial .....                                     | 18 |
| 2.8.1. Determinação do peso molecular .....  | 18 |
| 2.8.2. Determinação do ponto isoelétrico .....                                       | 19 |
| 2.9. Caracterização Imunológica .....  | 19 |
| 2.9.1. Imunodifusão dupla .....  | 19 |
| 2.9.2. Eletroforese e imunoeletroforese .....  | 20 |
| <br>   |    |
| 3. RESULTADOS .....  | 21 |
| 3.1. Seleção do Meio de Cultura .....  | 21 |
| 3.2. Fatores que Influenciam na Produção do Antígeno F42<br>" in vitro " .....       | 21 |
| 3.2.1. Efeito da temperatura .....   | 21 |
| 3.2.2. Efeito da glicose .....   | 22 |
| 3.2.3. Efeito do pH do MMA na produção do antígeno F42 ..                            | 22 |
| 3.2.4. Efeito da alanina e acetato de sódio .....                                    | 23 |
| 3.3. Purificação do Antígeno F42 .....   | 23 |
| 3.3.1. Extração e precipitação com sulfato de amônio ..                              | 23 |
| 3.3.2. Tratamento com desoxicolato de sódio .....                                    | 24 |
| 3.3.3. Cromatografia de exclusão molecular em<br>Sephárose 4B .....                  | 24 |
| 3.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida - SDS .....                               | 24 |
| 3.5. Resumo das Etapas de Purificação do antígeno F42 .....                          | 25 |
| 3.6. Caracterização Físico-Química Parcial do Antígeno F42 ..                        | 25 |

|  |    |
|--|----|
| 3.6.1. Determinação do peso molecular .....    | 25 |
| 3.6.2. Determinação do ponto isoelétrico ..... | 26 |
| 3.6.3. Eletroforese .....                      | 26 |
| 3.7. Caracterização Imunológica .....          | 26 |
| 3.7.1. Imunodifusão dupla .....                | 26 |
| 3.7.2. Imunoeletroforese .....                 | 27 |
| 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....                | 43 |
| 5. RESUMO .....                                | 52 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....            | 53 |

## 1- INTRODUÇÃO

A luz dos conhecimentos atuais, os colibacilos enteropatogênicos, causadores de diarréia neonatal nos animais domésticos e, em especial os isolados de suínos, caracterizam-se por serem enterotoxigênicos. As toxinas produzidas podem ser de dois tipos: termo-estável (STa e STb) e termo-lábil (LT), que são diferenciadas com base nas suas características biológicas, bioquímicas e sorológicas.

Não basta a enterotoxigenicidade para que o animal infectado por uma determinada amostra de *Escherichia coli* venha a apresentar diarréia. Sabe-se também, hoje, que estas amostras de *E. coli* possuem na sua superfície apêndices filamentosos, não flagelares, de constituição proteica, visíveis ao microscópio eletrônico ( 31 ) que, segundo DUCUID et alii ( 14 ), foram denominadas "fímbrias", também chamadas de "pili" por BRINTON ( 2 ). Nós, no presente trabalho, utilizaremos o termo fímbria, seguindo as indicações de OTTOW ( 54 ) e JONES ( 36 ).

Graças à presença nas bactérias enterotoxigênicas destas fímbrias, as mesmas apresentam a capacidade de, uma vez no trato intestinal de animais sensíveis, aderir a receptores específicos das células das vilosidades intestinais do intestino delgado, tendo como consequência a sua multiplicação, cujo aumento no número pode atingir valores consideráveis. Denominou-se a esse processo colonização que



por si impede que as bactérias aderidas sejam eliminadas rapidamente através dos movimentos peristálticos intestinais. Como consequência desta colonização, independentemente da enterotoxina produzida, acumula-se no intestino delgado dos animais infectados quantidade suficiente de enterotoxina para produzir quadros diarréicos às vezes bastante graves.

Devido a esta propriedade de aderência que leva a subsequente colonização, estas fímbrias foram também denominadas antígenos de aderência, adesinas ou ainda fatores de colonização.

SOJKA ( 61 ) descreveu o primeiro antígeno de aderência, denominado na época de K88, porque acreditava esse autor ser esse antígeno mais um dos antígenos K até então descritos dentro da classificação sorológica das *E. coli*, tendo como base os antígenos somáticos (O), flagelares H ( 67, 68 ) e capsulares ou de envoltório ( K ) (39). Em outras palavras, desconhecia-se que a estrutura do antígeno K88 era basicamente uma fímbria. Contudo a frequência com que esses antígenos ( 59 ) ocorria em amostras de *E. coli* capazes de dilatar alça ligada do intestino de leitão, fez com que se suspeitasse, o que foi comprovado posteriormente ( 37 ), que o antígeno K88 tinha envolvimento direto na patogenia da diarréia neonatal em suínos.

Em 1972, SMITH & LINGGOOD ( 60 ) descreveram em muitas amostras de *E. coli* enteropatogênicas para bezerros um antígeno K a que chamaram de "Kco" ( common K antigen), que foi posteriormente designado K99 por ORSKOV et alii ( 53 ).

A ocorrência do antígeno K88 em amostras de *E. coli* de origem suína, do K99 em amostras de origem bovina e de dois outros antígenos encontrados apenas em amostras de *E. coli* de origem humana de-

signados CFA/I ( 19 ) e CFA/II ( 15 ) fez com que EVANS et alii ( 18 ) defendessem a existência de uma certa especificidade de um determinado antígeno de aderência em relação ao hospedeiro.

Embora esta hipótese não tenha sido totalmente contrariada, sabe-se hoje que o antígeno K99 é também frequente em amostras de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) de origem suína, envolvidas na diarreia neonatal desses animais.

Mais recentemente MORRIS et alii ( 46, 47 ) relataram em algumas amostras de ETEC de origem bovina a presença de uma adesina, a qual denominaram de F41, que curiosamente vem sempre associada ao antígeno K99. Este antígeno de aderência contrariando mais uma vez a hipótese da correlação especificidade-hospedeiro já citada,, foi também descrito em amostras de ETEC de origem suína ( 65 ). Embora ainda falte um estudo mais aprofundado da importância deste último antígeno, parece evidente que os suínos, particularmente, apresentam receptores para vários fatores de colonização. Tanto isso é verdade que YANO et alii ( 70 ), em 1986, descreveram em amostras de ETEC de origem suína mais uma adesina a qual denominaram F42 que está sendo objeto de estudo no presente trabalho.

Todos esses antígenos de aderência, além da capacidade de adesão "in vivo", em células intestinais de hospedeiros sensíveis, apresentam algumas características comuns tais como, aglutinação na presença de D-manose ( 24 ) de hemácias de várias espécies animais, são codificadas somente em cultivos incubados a 37°C ( 24 ) não o sendo quando a temperatura de incubação for de 18°C ( 24 ) e são todos eles codificados por plasmídios ( 19, 52, 53 ). Porém, com relação ao antígeno F41 faltam dados conclusivos sobre esta última propriedade.

Finalmente um outro antígeno de aderência foi descrito por NAGY et alii ( 48, 49 ) em 1976 o qual foi designado 987P, igualmente importante em casos de diarreia neonatal mas que apresenta como características principais o fato de não ser hemaglutinante e nem ser codificado por plasmídios, tendo provavelmente seu locus gênico no genoma bacteriano.

Além dessas fímbrias, BRINTON ( 2 ), BRINTON ( 3 ) e DUGUID et alii ( 12 ) descreveram vários tipos de fímbrias em *Enterobacteriaceae*, baseando-se na sua morfologia e propriedades hemaglutinantes. O tipo mais comum de fímbria foi denominado de tipo I. Esta fímbria é capaz de aderir a uma grande variedade de células eucariotes ( 1, 13, 50, 58 ). As propriedades adesivas da fímbria do tipo I encontradas em *E. coli* são inibidas pela D-manose ( 24 ).

Após essas considerações gerais vejamos agora, em relação a esses antígenos de aderência, quais os achados mais relevantes relatados na literatura no que tange a: propriedade hemaglutinante, condições que afetam a produção dos antígenos de aderência "in vitro", purificação e características físico-químicas.

### 1.1 HEMAGLUTINAÇÃO

A primeira observação das propriedades adesivas das amostras de ETEC "in vitro", foi a hemaglutinação ( 14 ). STIRM et alii ( 63 ) e JONES & RUTTER ( 38 ) observaram que amostras de *E. coli* portadoras do antígeno K88 aglutinavam hemácias de cobalo na presença de D-manose quando cultivadas a 37°C mas não a 18°C e que esta reação ocorria a 4°C mas não era observada quando realizada a 37°C.

PARRY & PORTER ( 56 ) utilizaram um grande número de diferentes hemácias no ensaio de hemaglutinação frente a duas variantes sorológicas do antígeno K88 ( ab e ac ) e de preparações livre de células desses antígenos. Observaram que a variante K88ab reagia melhor com hemácias de galinha do que com cobaio e que essa hemaglutinação era estável à temperatura ambiente. Por outro lado a variante K88ac reagia com hemácias de cobaio somente quando o antígeno estava ligado à bactéria, não aglutinando essas hemácias quando em preparações livres de células.

GUINEE & JANSEN ( 26 ) descreveram uma nova variante de K88, denominada K88ad, presente em amostras de ETEC de origem suína, podendo ser diferenciada das demais variantes somente por testes sorológicos.

ISAACSON & RICHTER ( 35 ) observaram que o antígeno 987P não possui capacidade hemaglutinante frente à uma grande variedade de hemácias ( cobaio, cavalo, carneiro, humano, coelho, bovino e galinha ), nem a 4°C nem a temperatura ambiente, não sendo possível utilizar esse tipo de teste na detecção deste antígeno, em amostras que o produzem.

BURROWS et alii ( 04 ) demonstraram que amostras de ETEC de origem bovina ( K99+ ) aglutinavam na presença de D-manose hemácias de carneiro. ORSKOV et alii ( 53 ) verificaram que a propriedade hemaglutinante do antígeno K99 não era observada quando a amostra de *E. coli* era cultivada a 18°C. GAASTRA & de GRAAF ( 24 ) descreveram ainda que a hemaglutinação do antígeno K99 com hemácias de cavalo não era observada quando a reação era realizada a 37°C.

MORRIS et alii ( 44 , 45 ) descreveram que o antígeno K99 livre de células era capaz de hemaglutinar hemácias humanas, de carneiro

e de cobaio. Em contraste com esses achados, ISSACSON ( 32 ) relatou que o antígeno K99 não reagia com hemácias de cobaio, sugerindo ( 33 ) que na preparação utilizada por MORRIS e colaboradores, uma outra adesina além do K99 deveria existir. Esta observação foi confirmada por MORRIS et alii ( 46 , 47 ) que denominaram esta outra adesina de F41, a qual reagia na presença de D-manose com hemácias de cobaio e carneiro. Utilizando antígenos purificados De GRAAF & ROORDA ( 10 ) descreveram que o antígeno K99 reage fortemente com hemácias de cavalo e fracamente com hemácias de carneiro, mas não com hemácias de cobaio. Por outro lado, o antígeno F41 reage fortemente com hemácias de cobaio e fracamente com as de carneiro e cavalo.

EVANS et alii ( 16 ) observaram que amostras de ETEC CFA/I+ apresentavam hemaglutinação-manose resistente a 4°C com hemácias humanas, de bovino e de galinha, enquanto que amostras CFA/II+ aglutinavam na presença de D-manose a 4°C, hemácias de bovino e de galinha.

Para o antígeno F42, verificamos ( 70 ) que este antígeno aglutina na presença de D-manose hemácias humanas, de cavalo, carneiro, cobaio e mais fortemente as de galinha. Esta reação é estável a 4°C ou à temperatura ambiente, e instável a 37°C.

## 1.2. CONDIÇÕES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DOS ANTÍGENOS DE ADERÊNCIA "in vitro"

GUINEE et alii ( 27 , 28 ) desenvolveram um meio semi-sintético tamponado ( Meio de Minca ), contendo menor concentração de aminoácidos e carboidratos, do que os meios nutrientes comuns, verifican-

do que este meio suprime a produção do antígeno capsular ( K ), facilitando a detecção do antígeno K99 no teste de aglutinação em lâmina.

De GRAAF et alii ( 08, 11 ) observaram que o meio Minca e o meio mínimo com glicose eram melhores para se obter alta produção de K99 do que meios complexos e que , o aminoácido L - alanina , numa concentração de 1mM, inibia a biossíntese de K99 em cerca de 95%. Estes resultados foram confirmados posteriormente por CONTREPOIS et alii ( 06 ). Um outro fator que pode diminuir "in vitro" a produção da fímbria K99 é a glicose, como foi observado por GUINEE et alii ( 28 ) e ISAACSON ( 34 ). Contrariamente, em 1983 FRANCIS et alii ( 21 ) descreveram que meio mínimo contendo 1% de glicose não inibia a produção de K99, o que ocorria quando o meio mínimo era suplementado com acetato de sódio ou acetato de sódio e glicose.

A produção do antígeno de aderência F41 é também dependente da composição do meio de cultura. Assim sendo De GRAAF & ROORDA ( 10 ) e De GRAAF et alii ( 11 ) demonstraram que a presença de glicose e alanina diminuía a produção do antígeno F41 de modo semelhante ao observado para o antígeno K99.

Em contraposição fenômeno regulatório descrito para a produção das fímbrias K99 e F41, nenhum efeito inibitório por glicose e alanina tem sido descrito para a produção de K88 e 987P, a não ser a influência da temperatura que é comum para todos os antígenos de aderência. Isto é, quando as amostras portadoras desses antígenos são cultivadas a 18°C, os mesmos não são produzidos, embora fímbrias do tipo I pareçam ser produzidas também nessa temperatura ( 24 ).

Para os antígenos de aderência em ETEC de origem humana, EVANS et alii ( 17 ) demonstraram que quando as amostras de *E. coli*

CFA/I+ eram cultivadas no meio de cultura por eles idealizados (AGAR CFA), apresentavam maior produção de fímbrias do que quando cultivadas em outro meio de cultura tais como Agar peptonado ou Tergitol.

### 1.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

#### FÍMBRIA K88

O primeiro processo de isolamento do antígeno K88 foi descrito por STIRM et alii ( 62 , 64 ). O antígeno K88 foi isolado da célula bacteriana por aquecimento a 60°C por 20 minutos ou por agitação em "Blender". A purificação do antígeno K88 foi realizada por repetidas precipitações no ponto isoelétrico e ultracentrifugação . A análise química revelou que o antígeno K88 purificado era de natureza proteica, em contraste com a natureza polissacarídica de todos os outros antígenos capsulares ( K ) conhecidos até então. MOOI & De GRAAF ( 43 ) purificaram as variantes de K88 ( ab, ac, e ad ) por gel filtração em coluna de Sepharose CL-4B, demonstrando através de eletroforese em gel de poliácridamida com dodecil sulfato de sódio ( SDS ) que o peso molecular das três variantes de K88 estava em torno de 23.500 a 26.000 daltons.

#### FÍMBRIA 987P

FUSCO et alii ( 23 ) purificaram o antígeno 987P por cristalização com cloreto de magnésio ( 0,1M ), seguida de centrifugação pa-

ra separar a fímbria precipitada do sobrenadante, demonstrando que o antígeno era composto de subunidades protéicas com peso molecular de 18.900 daltons. Uma descrição mais detalhada para a purificação e caracterização do antígeno 987P foi posteriormente reportada por ISAACSON & RICHTER ( 35 ). O antígeno 987P foi removido das células bacterianas por homogeneização em "Sorvall Omni mixer" e purificado por precipitação com cloreto de magnésio. A análise química mostrou que a adesina 987P era composta de proteínas, mas continha também um aminoaçucar não identificado. A eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, apresentou uma única banda proteica com peso molecular ao redor de 20.000 daltons e ponto isoelétrico de 3,7.

#### FÍMBRIA K99

Em 1977, ISAACSON ( 32 ) descreveu um método para o isolamento e purificação do antígeno K99. O antígeno foi removido das células bacterianas por homogeneização em "Sorvall Omni mixer", sendo subsequentemente purificado por precipitação com sulfato de amônio e cromatografia em DEAE-Sephadex. O material purificado apresentou-se composto de duas subunidades protéicas, uma com peso molecular de 22.500 e outra de 29.500 daltons e de ponto isoelétrico 10,1.

De GRAAF et alii ( 09 ) também purificaram o antígeno K99 utilizando métodos de isolamento da fímbria das células bacterianas por aquecimento a 60°C por 20 minutos, gel filtração em Sepharose CL-4B e tratamento com desoxicolato de sódio. O antígeno purificado apresentou-se homogêneo em eletroforese de poliacrilamida-SDS e composto de subunidades protéicas de peso molecular de 18.400 daltons com ponto isoelétrico de 9,75.



### FÍMBRIA F41

A purificação e caracterização do antígeno F41 foi descrita por De GRAAF & ROORDA ( 10 ). O antígeno foi isolado da célula bacteriana por homogeneização em "Sorvall Omni mixer" e precipitado com sulfato de amônio. A purificação foi realizada por gel filtração em Sepharose CL-4B e tratamento com desoxicolato de sódio. O antígeno foi caracterizado como uma estrutura filamentosa, composta de subunidades proteicas com peso molecular ao redor de 29.500 daltons e ponto isoeletrico de 4,6.

### FÍMBRIA CFA/I E CFA/II

A purificação do antígeno CFA/I foi descrita por KLEMM ( 40 ) utilizando gel filtração em coluna de Sepharose 2B, verificando ser o peso molecular das subunidades de CFA/I de 14.500. Entretanto WEVERS et alii ( 69 ) reportaram que os pesos moleculares das subunidades de CFA/I e CFA/II eram de 12.000 e 13.000 daltons respectivamente. FREER et alii ( 22 ) relataram que o ponto isoeletrico do antígeno CFA/I era 4,8.

### FÍMBRIA F42

YANO et alii ( 70 ) descreveram o isolamento de amostras de *E. coli* enterotoxigênicas de origem suína, portadoras do antígeno F42, mostrando ser o referido antígeno diferente dos anteriormente descritos. Esses autores relataram algumas propriedades inerentes ao antígeno, sem no entanto concluírem a sua caracterização.

Por outro lado, foi conseguida, no Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves da EMBRAPA, a reprodução experimental da colibacilose neonatal em suínos, usando como inóculo, por via oral, amostras de *E. coli* STa+ F42+ ( dados não publicados, Pestana de Castro e colaboradores ).

Em razão disto, acreditamos que a purificação do antígeno F42 permitir-nos-á descrever mais precisamente as características estruturais, morfológicas, biológicas e antigênicas deste antígeno, que imaginamos, ser extremamente importante na etiologia da colibacilose suína no Brasil, haja visto a sua frequência relativamene alta ( 9,6% ) em amostras de ETEC ( STa+ ) de origem suína ( dados não publicados ).

Diante do exposto e em se considerando as evidências de estarmos diante de um novo fator de colonização ( 70 ), de importância relevante na patogenia da colibacilose suína, inclusive com eventuais reflexos na imunoprofilaxia desta enfermidade os seguintes objetivos nortearam a realização do presente trabalho:

- a- verificar quais as condições ótimas para a produção e detecção do antígeno F42.
- b- tentar a purificação do antígeno F42.
- c- verificar algumas características físico-químicas, biológicas e antigênicas do antígeno F42.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. AMOSTRAS

A amostra de *Escherichia coli* 567/7 enterotoxigênica ( STa+ ) de origem suína e caracterizada por YANO et alii ( 70 ), foi utilizada neste trabalho, como sendo amostra de ETEC portadora do antígeno de aderência F42. Outras amostras de *E. coli* padrão por nós utilizadas foram :B41 ( O101, K99+F41+ ); 1476 ( K12 K88ab+ ) e MS101 ( K12 ) esta última usada como controle negativo. Essas amostras foram gentilmente cedidas pelo Dr.H.W.Moon, "National Animal Diseases Laboratory", Ames, Iowa, EUA. Todas as amostras de *E. coli* foram mantidas a -70°C em meio de Infusão de Cérebro e Coração ( BHI, DIFCO Laboratories ), adicionado de 15% de glicerol ( ECIBRA ).

### 2.2. ANTISSOROS

Foram utilizados os antissoros anti-F42 anteriormente obtidos pela imunização do antígeno F42 semi-purificado em coelhos ( 70 ). Os antissoros anti-K99F41, anti-K88 foram gentilmente cedidos pela Prof. Dra.M.B.Serafim ( Departamento de Microbiologia e Imunologia, I.B., UNICAMP ).

## 2.3. PROVA DE MICROHEMAGLUTINAÇÃO MANOSE-RESISTENTE (MHMR)

### 2.3.1. Preparo das Suspensões Bacterianas

Duzentos microlitros de cultivo das amostras de *E. coli* em TSB ( Trypticase Soy Broth, DIFCO ) foram semeados em placas de Petri contendo meio de cultura solidificado pela adição de agar (DIFCO) a 2%. O crescimento bacteriano obtido após 24 horas de incubação a 37° C foi suspenso em salina fosfatada tamponada contendo 0,5% de D-manose ( INLAB ) ( PBS-M ), ajustando-se o número de células totais para aproximadamente  $5 \times 10^{10}$  células/ml.

### 2.3.2. Padronização das Hemácias

Hemácias humanas, de cobalo e de galinha, foram coletadas no dia do teste, utilizando-se solução de citrato de sódio (3.8%) como anticoagulante. As hemácias foram lavadas 3 vezes em PBS-M, e padronizada a  $1 \times 10^9$  hemácias/ml, seguindo técnica descrita por RANGEL & REPKA ( 57 ).

As hemácias de cavalo e carneiro foram coletadas asépticamente em solução de Alsever e conservadas a 4°C. Para a padronização destas hemácias procedeu-se conforme descrito acima.

### 2.3.3. Teste

Para a realização dos testes de MHMR foram utilizadas placas de microtítulo ( Falcon Plastics ) de base côncava. Suspensões

bacterianas ou antígeno F42 na forma solúvel, foram diluídas em série à razão de 2, diretamente nas placas de microtítulos, em volumes de 50 ul, utilizando-se como diluente PBS-M. Sobre estas diluições colocou-se igual volume de hemácias padronizadas. Durante toda a realização do teste, os componentes da reação foram mantidos em banho de gelo, conforme recomendado por JONES & RUTTER ( 38 ). Após uma hora de incubação nestas condições, procedeu-se a leitura do teste.

A Unidade Microhemaglutinante Manose Resistente (UMHMR) foi definida como a maior diluição do antígeno F42 que ainda era capaz de aglutinar as hemácias em teste.

#### **2.4. SELEÇÃO DO MEIO DE CULTURA**

Os seguintes meios de cultura adicionados de agar a 2%, foram estudados para se verificar em qual deles haveria maior produção do antígeno F42: Nutriente Glicosado ( A.G. ) ( 37 ), Minca ( 28 ), CFA (17), Biken ( 30 ), TSB ( DIFCO ), BHI ( DIFCO ) e Meio Mínimo A (MMA) ( 07 ) suplementado com 0,5% de glicose ( ECIBRA ). Após semeadura e padronização da suspensão bacteriana conforme descrito em 2.3.1., procedeu-se a prova de MHR de acordo com 2.3.3.

#### **2.5. FATORES QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO DO ANTÍGENO F42**

" in vitro "

##### **2.5.1. Efeito da Temperatura**

Procurando verificar o efeito da temperatura na produção do antígeno F42, a amostra de *E. coli* 567/7 foi semeada em MMA suplementado com 0,5% de glicose e agar a 2% procedendo-se a incubação a 18°C por 48 horas e a 37°C por 24 horas. O crescimento bacteriano resultante foi suspenso em PBS-M, padronizada e examinada pela MHMR frente à hemácias humanas, de cavalo, carneiro, cobaio e de galinha.

### **2.5.2. Efeito da Alanina e Acetato de Sódio**

A amostra de *E. coli* 567/7 foi cultivada em MMA sólido suplementado com 0,5% de glicose contendo diferentes concentrações de acetato de sódio ( REAGEN ) ( 100, 50, 10 e 5 mM ) ou de D-alanina ( SIGMA ) ( 10, 5 e 1 mM ). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. O crescimento bacteriano foi suspenso em PBS-M e examinado em MHMR com hemácias de galinha.

### **2.5.3. Efeito da Glicose**

Para verificar o efeito da concentração de glicose na produção do antígeno F42, utilizamos o MMA sólido, suplementado com diferentes concentrações de glicose ( 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 e 2.0 % ) no qual se semeou a amostra de *E. coli* 567/7. Suspensões obtidas a partir do crescimento bacteriano, foram examinadas pela prova de MHMR com hemácias de galinha.

#### 2.5.4. Efeito do pH do MMA na produção do antígeno F42

Em MMA sólido suplementado com 0,5% de glicose e com diferentes pH (5.4, 6.0, 7.4, 8.2 e 9.4) a amostra de *E. coli* 567/7 foi cultivada por 24 horas a 37°C. As suspensões bacterianas obtidas desses cultivos foram examinadas em MHR frente a hemácias de galinha.

### 2.6. PURIFICAÇÃO DO ANTÍGENO F42

#### 2.6.1. Extração do Antígeno F42

A obtenção do antígeno F42 solúvel, livre de células, foi realizada seguindo as indicações de STIRM et alii ( 64 ) com algumas modificações por nós introduzidas. A amostra de *E. coli* 567/7, produtora do antígeno F42 foi cultivada em MMA em Microfermentador ( New Brunswick Scientific Co., Inc ) com agitação (200 rpm ) e vigorosa aeração a 37°C por 24 horas. A cultura foi centrifugada e o sedimento foi ressuspenso em tampão fosfato 0.05M, pH 7.2 contendo 1M de NaCl (MERCK). A extração do antígeno foi realizada por incubação a 60°C em banho-maria por 20 minutos com agitação ocasional.

Após esse tratamento, o material foi centrifugado a 4°C por 20 minutos a 10.000 rpm, sendo o sedimento dispensado.

### 2.6.2. Precipitação com Sulfato de Amônio

O sobrenadante obtido, foi precipitado com sulfato de amônio ( MERCK ) em concentrações crescentes, a saber: 20, 45, 65 e 80% de saturação. Entre cada etapa, a mistura foi centrifugada e o precipitado ressuspensado em tampão fosfato 0.05M pH 7.2 e dialisado exaustivamente contra o mesmo tampão.

### 2.6.3. Tratamento com Desoxicolato de Sódio ( DOC )

Seguindo as recomendações de KORHONEN et alii ( 41 ), as frações obtidas pela precipitação com sulfato de amônio ( 45% ), foram tratadas por 72 horas a 4°C com tampão fosfato 0.05M, pH 7.2 contendo 0.5% de DOC (Desoxicolato de Sódio, MERCK ). Após esse período, o material foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C. O material solúvel em DOC foi novamente dialisado contra tampão fosfato 0,05M, pH 7.2 e examinado pela MHR frente a hemácias de galinha. A concentração proteica foi determinada pelo método de Hartree ( 29 ).

### 2.6.4. Cromatografia de Exclusão Molecular em Sepharose 4B

Três mililitros do antígeno F42 (DOC solúvel), contendo 3,6 mg de proteína foram cromatografados em coluna (2 x 95 cm) de Sepharose 4B ( PHARMACIA ) equilibrada com tampão fosfato 0.05M pH 7.2, contendo 2M de uréia ( MERCK ). O material foi eluído com o mesmo tampão, em volumes de 5 ml/tubo num fluxo de 12 ml por hora. A absorvância dessas amostras foi medida a  $\lambda = 280\text{nm}$  em espectrofotômetro



Zeiss PMQII, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico. As frações obtidas foram concentradas 5 vezes por liofilização em FREEZE DRYER New Brunswick Scientific Co, Inc. e examinadas pela MHRM com hemácias de galinha.

## **2.7. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA - SDS**

A eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, foi realizada como descrito por FAIRBANKS et alii ( 20 ) utilizando 7% de acrilamida contendo 0.1% de SDS ( WAKO CHEMICAL Co. ), 75  $\mu$ l dos antígenos F42 fração 45% e cromatografado em coluna de Sepharose 4B contendo respectivamente 2,0 e 0,6 mg de proteína por ml foram aplicados. Uma corrente elétrica de 3mA/gel foi aplicada por 2 - 3 horas. Após a corrida os géis foram fixados com solução de ácido acético-metanol-água (1:10:9 ), corados com solução de Coomassie Brilliant Blue ( SIGMA ) a 0.25% em solução de metanol a 5% e ácido acético a 10%, sendo descorados com solução de ácido acético a 7.5% e metanol a 5%.

## **2.8. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA PARCIAL**

### **2.8.1. Determinação do Peso Molecular ( PM )**

A determinação do peso molecular do antígeno F42 purificado foi realizada em gel de poliacrilamida-SDS como descrito acima, utilizando-se como padrões de PM : Soro de Albumina Bovina ( 66.000

daltons ); Ovalbumina ( 45.000 daltons ) e Mioglobina ( 16.000 daltons ) todos de procedência SIGMA.

### 2.8.2. Determinação do Ponto Isoelétrico ( pI )

O ensaio de Isoeletrofocalização foi realizado em gel de poliacrilamida como descrito por MERZ et alii ( 42 ), utilizando-se 5% de acrilamida contendo anfólitos de pH 3.0 a 10.0 ( SIGMA ). O antígeno F42 purificado foi tratado com  $\beta$ -Mercaptoetanol ( BACKER ) a 0.2% e 0.02M de EDTA ( SIGMA ) em 8M de uréia. Uma corrente elétrica inicial de 0.5mA/gel foi aplicada por 19 horas, a temperatura ambiente, durante tempo suficiente para a corrente cair a zero. Os eletrodos foram conectados de modo que o polo positivo da fonte elétrica estivesse em contato com o eletrodo imerso em solução de  $H_3PO_4$  1M e o polo negativo no eletrodo imerso em solução de NaOH 1M. Após corrida, o gel foi seccionado em segmentos de 0,2cm e eluídos em solução de cloreto de potássio a 0,01M por 2 horas a 4°C, procedendo-se a determinação do pH em pHmetro ( MICRONAL ) e leitura em espectrofotômetro ZEISS PMQII em absorvância de 280nm.

## 2.9. CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA

### 2.9.1 Imunodifusão dupla

A técnica de Imunodifusão dupla para análise sorológica comparativa, foi realizada seguindo as indicações de OUCHTERLONY (55). Uma camada 0,15cm de espessura de agar "Noble" (DIFCO ) a 1%, em sa-

lâmina fisiológica contendo 3mM de azida sódica ( RIEDEL ), foi feita sobre uma lâmina de vidro ( 7.5 X 2.5 cm ). Os orifícios no gel foram feitos com molde próprio para este fim, sendo a distância entre os orifícios padronizada. Nesses foram aplicados 20 ul dos diferentes antígenos : K88ab, K99, F41 e F42 purificados contendo respectivamente 0,5; 0,9; 0,7 e 0,6 mg de proteína por ml e dos antissoros anti-K99F41, anti-K88 e anti-F42. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 24 horas à temperatura ambiente, lavadas com salina fisiológica, secas e coradas com solução de Coomassie Brilliant Blue.

### 2.9.2. Eletroforese e Imunoeletroforese

Foram realizadas segundo as indicações de GRABAR & BURTIN ( 25 ). Uma camada de agar "Noble" de 0.15 cm de espessura, a 1% em Tampão Veronal 0.05M, pH 8.6 foi solidificada sobre lâmina de vidro ( 9 X 12 cm ). Em orifícios escavados no agar, 10 ul dos antígenos K88ab, K88ac, K99, F41 e F42 com igual concentração proteica ao descrito em 2.9.1., exceto K88ac que continha 1,1mg de proteína por ml, foram aplicados. Uma diferença de potencial de 6 volt/cm foi aplicada por 80 minutos.

A eletroforese foi revelada com ácido acético a 2%, sendo a lâmina seca e corada com solução de Coomassie Brilliant Blue. Na imunoeletroforese foram adicionados na lâmina volumes de 100 ul de cada um dos antissoros disponíveis, a saber: anti-K88, anti-K99F41 e anti-F42. Após incubação por 24 horas em câmara úmida a lâmina foi lavada várias vezes com salina fisiológica, seca e corada com solução de Coomassie Brilliant blue.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. SELEÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Verificamos que suspensões bacterianas da amostra de *E. coli* 567/7 cultivada nos meios CFA, Minca, BHI e MMA suplementado com 0,5% de glicose, reagiram com hemácias humanas, de cavalo, carneiro, cobaio e galinha (TABELA 1). Os maiores títulos hemaglutinantes foram obtidos com culturas crescidas em meio CFA e MMA suplementado com 0,5% de glicose, frente às hemácias de galinha. No entanto, quando a citada amostra foi cultivada nos meios A.G., TSB e Biken os resultados obtidos em relação a MHMR frente a diferentes hemácias foram diferentes, no que concerne a um menor título da reação como também, os resultados negativos obtidos.

#### 3.2 FATORES QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO DO ANTÍGENO F42

" in vitro "

##### 3.2.1. Efeito da Temperatura

Procuramos verificar se a temperatura de incubação do cultivo da amostra de *E. coli* 567/7, interferiria na produção do antí-

geno F42. Observamos que a amostra em estudo, quando cultivada em MMA suplementado com 0,5% de glicose e incubada a 18°C por 48 horas não apresentou a capacidade aglutinante com nenhuma das hemácias estudadas ( TABELA 2 ). Entretanto, quando esta amostra foi cultivada no mesmo meio de cultura por 24 horas a 37°C, apresentou padrão de hemaglutinação idêntico ao descrito por YANO et alii ( 70 ).

### 3.2.2. Efeito da Glicose

Para verificar se adição de glicose no MMA estimulava ou inibia a produção do antígeno F42, a amostra de *E. coli* 567/7 foi cultivada em MMA sólido suplementado com diferentes concentrações de glicose. O crescimento bacteriano foi ressuspensão em PBS-M e examinado pela prova de MHR frente a hemácias de galinha. Observou-se que a amostra em estudo quando cultivada em MMA sem glicose, não apresentou atividade aglutinante. No entanto, em todas as demais concentrações de glicose utilizadas, a amostra apresentou atividade hemaglutinante com hemácias de galinha, sem diferenças significativas nos títulos observados (TABELA 3).

### 3.2.3. Efeito do pH do MMA na Produção do Antígeno F42

Verificamos que a amostra de *E. coli* 567/7 não apresentou atividade hemaglutinante quando cultivada em pH 5.4 e 6.0 (TABELA 4). Entretanto, quando a mesma amostra foi cultivada em pH alcalino (8.2 e 9.4) foi capaz de aglutinar hemácias de galinha até o título de 1:64 ( TABELA 4 ).

### 3.2.4. Efeito da Alanina e Acetato de Sódio

Procuramos verificar se D-alanina e o acetato de sódio eram capazes de inibir a síntese do antígeno F42. Utilizamos diferentes concentrações de alanina (10, 5 e 1 mM) ou de acetato de sódio (100, 50, 10 e 5mM) adicionados ao MMA suplementado com 0,5% de glicose. O acetato de sódio interferiu diretamente sobre a amostra de *E. coli* 567/7, impedindo de se obter um bom crescimento bacteriano. Essas culturas não apresentaram atividade hemaglutinante com hemácias de galinha (TABELA 5). Utilizando o aminoácido D-alanina, verificamos que a referida amostra não apresentou atividade aglutinante mesmo quando cultivada em MMA contendo 1mM deste aminoácido (TABELA 5).

## 3.3. PURIFICAÇÃO DO ANTÍGENO F42

### 3.3.1. Extração e Precipitação com Sulfato de Amônio

A extração do antígeno F42 das células bacterianas foi realizada por incubação em banho-maria a 60°C por 30 minutos, com agitação ocasional. As frações obtidas pela precipitação com sulfato de amônio foram examinadas pela MHMR frente a hemácias de galinha (TABELA 6). Foi verificado que as frações obtidas pela precipitação com sulfato de amônio nas concentrações de 45% e 65% apresentaram maior atividade hemaglutinante. Em termos de atividade específica, determinamos que as frações precipitadas com 45% apresentaram atividade hemaglutinante 32 vezes maior que as frações obtidas pela precipitação com 65% de saturação, ou seja, das frações obtidas com 45% de saturação,

foram necessários 0,048ug de proteína para se obter uma unidade micro-hemaglutinante, enquanto que das frações obtidas com 65% foram necessários 4,7ug de proteína para se obter a mesma unidade.

### **3.3.2. Tratamento com Desoxicolato de Sódio ( DOC )**

As frações obtidas na precipitação com sulfato de amônio na concentração de 45% de saturação, foram tratadas com DOC por 72 horas a 4°C. Observamos que no material DOC solúvel, houve redução da concentração proteica, aumentando sua atividade específica no que tange a MHR frente hemácias de galinha (TABELA 7).

### **3.3.3. Cromatografia de Exclusão Molecular em Sepharose 4B**

O antígeno F42 DOC solúvel, foi aplicado em coluna de Sepharose 4B equilibrada com tampão fosfato 0,05M, pH 7.2, contendo 2M de uréia. As frações que apresentaram leitura espectrofotométrica superiores a 0,1 de densidade óptica (DO), no comprimento de onda de 280nm, foram dialisadas exaustivamente contra PBS, examinadas pela MHR frente a hemácias de galinha. Aquelas em que foram observadas títulos superiores a 1:8 foram reunidas, concentradas e estocadas a -20°C ( FIGURA 1).

## **3.4. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS**

Em estudos preliminares, verificamos que o antígeno F42 (DOC solúvel) foi incapaz de penetrar no gel de poliacrilamida, na concen-

tração utilizada (7%) (Dados não apresentados). No entanto, quando o antígeno foi tratado com SDS e aquecido a 100°C por 3 minutos, apresentou a capacidade de penetrar na matriz de poliacrilamida, onde, após corrida, observamos 3 bandas proteicas (FIGURA 2a).

O antígeno F42 eluído da cromatografia em Sepharose 4B, foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS. Verificamos que nas condições experimentais por nós utilizadas, o antígeno F42 cromatografado, apresentou uma única banda proteica (FIGURA 2b).

### **3.5. RESUMO DAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DO ANTÍGENO F42**

Na tabela 7 estão demonstrados os passos da purificação do antígeno de aderência F42. A atividade específica do material purificado foi de 3556,2 U MHMR/mg de proteína e a atividade relativa aumentou 128,8 vezes em relação ao extrato bruto e sua recuperação foi de 20% .

### **3.6. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA PARCIAL DO ANTÍGENO F42**

#### **3.6.1. Determinação do Peso Molecular ( PM )**

Em eletroforese de disco em gel de poliacrilamida-SDS o antígeno F42 apareceu homogêneo e seu PM foi estimado ser em torno de 31.000 daltons (FIGURA 3, TABELA 8).



### 3.6.2. Determinação do Ponto Isoelétrico (pI)

A determinação do pI pela técnica e isoeletrofocalização descrita no material e métodos, (2.8.2.) revelou que os segmentos com pH 3,4 e 3,2 apresentaram leitura espectrofotométrica em absorbância de 280 nm ( FIGURA 4 ).

### 3.6.3. Eletroforese

O comportamento eletroforético do antígeno F42 purificado foi comparado com os antígenos de aderência (K99, F41 e K88ab) de origem suína. Na FIGURA 5 observamos que o antígeno F42 apresentou uma única banda proteica a qual migrou ligeiramente para o cátodo, apresentando mobilidade eletroforética distinta dos demais antígenos de aderência por nós utilizados.

## 3.7. CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA

### 3.6.1. Imunodifusão Dupla

Pelo teste de imunodifusão dupla constatamos que o antígeno F42 purificado foi reconhecido pelo antissoro anti-F42 e não houve reações cruzadas com os antissoros anti-K99F41 e anti-K88ab. Do mesmo modo, o antissoro anti-F42 reconheceu somente o antígeno homólogo, não reconhecendo os antígenos K99, F41 e K88ab (FIGURA 6).

### 3.7.2. Imunoeletroforese

Na FIGURA 7 podemos observar que o antissoro anti-F42 não reconheceu os antígenos de aderência utilizados como padrões (K99, F41, K88ab e K88ac) reconhecendo apenas o antígeno homólogo. Os antissoros anti-K99F41 e anti-K88ab não reconheceram o antígeno F42 purificado. Confirmando mais uma vez a diferença sorológica entre o antígeno F42 e os antígenos de aderência de origem suína.

**TABELA 1** - Efeito do meio de cultura no teste de MHMR da amostra de *E. coli* 567/7 (a).

| Meios<br>de<br>Cultura | Hemácias |     |          |        |       |         |
|------------------------|----------|-----|----------|--------|-------|---------|
|                        | Cavalo   | Boi | Carneiro | Cobaio | Homem | Galinha |
| A.G. (b)               | 16 (j)   | -   | 32       | 8      | 16    | -       |
| TSB (c)                | - (k)    | -   | 32       | -      | -     | -       |
| CFA (d)                | 32       | -   | 64       | 128    | 128   | 32      |
| MINCA (e)              | 32       | -   | 16       | 64     | 8     | 8       |
| BIKEN (f)              | -        | -   | 64       | -      | -     | -       |
| BHI (g)                | 4        | -   | 64       | 32     | 64    | 4       |
| MMA (h)                | 32       | -   | 32       | 256    | 16    | 128     |
| PBS-M (i)              | -        | -   | -        | -      | -     | -       |

- a) a amostra foi cultivada nos diferentes meios de cultura por 24 horas a 37°C.
- b) Agar Nutriente Glicosado (37).
- c) Trypticase Soy Broth.
- d) meio de CFA ( 17 ).
- e) meio de Minca ( 28 )
- f) meio de Biken ( 30 ).
- g) Brain Heart Infusion.
- h) meio Mínimo A (07) suplementado com 0,5% de glicose.
- i) salina tamponada com 0,5% de D-manose.
- j) os títulos são representados pelo recíproco da maior diluição da suspensão bacteriana que ainda mostrava reação positiva.
- k) reação negativa.

**TABELA 2** - Efeito da temperatura de cultivo no título de MHRM  
da amostra de *E. coli* 567/7 (a)

| Temperatura<br>de<br>cultivo | Hemácias |        |          |        |         |
|------------------------------|----------|--------|----------|--------|---------|
|                              | Homem    | Cavalo | Carneiro | Cobaio | Galinha |
| 18°C                         | - (b)    | -      | -        | -      | -       |
| 37°C                         | 16 (c)   | 32     | 16       | 128    | 128     |

a) a amostra de *E. coli* 567/7 foi cultivada em MMA contendo 0,5% de glicose por 48 horas a 18°C e por 24 horas a 37°C.

b) reação negativa.

c) os títulos são representados pelo recíproco da maior diluição da suspensão bacteriana que ainda mostrava reação positiva.

**TABELA 3** - Efeito da concentração de glicose no título de MHR da amostra de *E. coli* 567/7 (a) frente à hemácias de galinha

|             |     |     |     |      |      |       |
|-------------|-----|-----|-----|------|------|-------|
| Glicose (%) | 2,0 | 1,0 | 0,5 | 0,25 | 0,10 | 0     |
| Título (b)  | 128 | 128 | 128 | 64   | 32   | - (c) |

a) a amostra de *E.coli* 567/7 foi cultivada em MMA contendo diferentes concentrações de glicose por 24 horas a 37°C.

b) os títulos são representados pelo recíproco da maior diluição da suspensão bacteriana que ainda mostrava reação positiva.

c) reação negativa.

**TABELA 4** - Efeito do pH do meio de cultura, no título de MHMR da amostra de *E. coli* 567/7 (a) frente a hemácias de galinha.

|            | pH    |     |     |     |     |
|------------|-------|-----|-----|-----|-----|
|            | 5.4   | 6.0 | 7.4 | 8.2 | 9.4 |
| Título (b) | - (c) | -   | 64  | 64  | 64  |

- a) a amostra de *E. coli* 567/7 foi cultivada em MMA com diferentes valores de pH, suplementado com 0,5% de glicose por 24 horas a 37°C.
- b) os títulos são representados pelo recíproco da maior diluição da suspensão bacteriana que ainda mostrava reação positiva.
- c) reação negativa.

**TABELA 5** - Efeito do Acetato de Sódio e D-alanina no título de MHMR da amostra de *E. coli* 567/7 (a).

|            | Acetato de Sódio (mM) |    |    |   |     | D-alanina (mM) |   |   |     |
|------------|-----------------------|----|----|---|-----|----------------|---|---|-----|
|            | 100                   | 50 | 10 | 5 | 0   | 10             | 5 | 1 | 0   |
| Título (b) | - (c)                 | -  | -  | - | 128 | -              | - | - | 128 |

a) a amostra de *E. coli* 567/7 foi cultivada em MMA com glicose (0,5%) contendo acetato de sódio ou alanina por 24 horas a 37°C, suspensas em PBS-M e examinadas pela MHMR frente a hemácias de galinha.

b) os títulos são representados pelo recíproco da maior diluição da suspensão bacteriana que ainda mostrava reação positiva.

c) reação negativa.

**TABELA 6** - Título de MHMR e concentração proteica das frações obtidas pela precipitação com Sulfato de Amônio do extrato bruto de F42 .

| Frações (%) | Título de MHMR (a) | Concentração proteica (mg/ml) | Atividade específica (UMHMR/mg/ml) |
|-------------|--------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| 20          | -(b)               | ND                            | ND                                 |
| 45          | 2048               | 2,0                           | 40960                              |
| 65          | 64                 | 6,2                           | 1280                               |
| 80          | 8                  | ND                            | ND                                 |

a) os títulos são representados pelo recíproco da maior diluição do antígeno F42 que ainda mostrava reação positiva com hemácias de galinha.

b) reação negativa.

ND-não determinada.



TABELA 7 - Purificação do antígeno de Aderência F42 da amostra de E.coli 567/77

| Etapas                                   | Proteína total (mg) | Atividade     |                       | Atividade relativa | Recuperação (%) |
|--|---------------------|---------------|-----------------------|--------------------|-----------------|
|  |                     | total (UMHMR) | específica (UMHMR/mg) |                    |                 |
| Extrato bruto                            | 1160,0              | 32.000,0      | 27,6                  | 1,0                | 100             |
| Precipitação com Sulfato de Amônio (45%) | 40,0                | 25.600,0      | 640,0                 | 23,2               | 80              |
| DOC solúvel                              | 27,9                | 21.776,1      | 780,5                 | 28,3               | 68              |
| Cromatografia em Sepharose 4B            | 1,8                 | 6.401,1       | 3.556,2               | 128,8              | 20              |

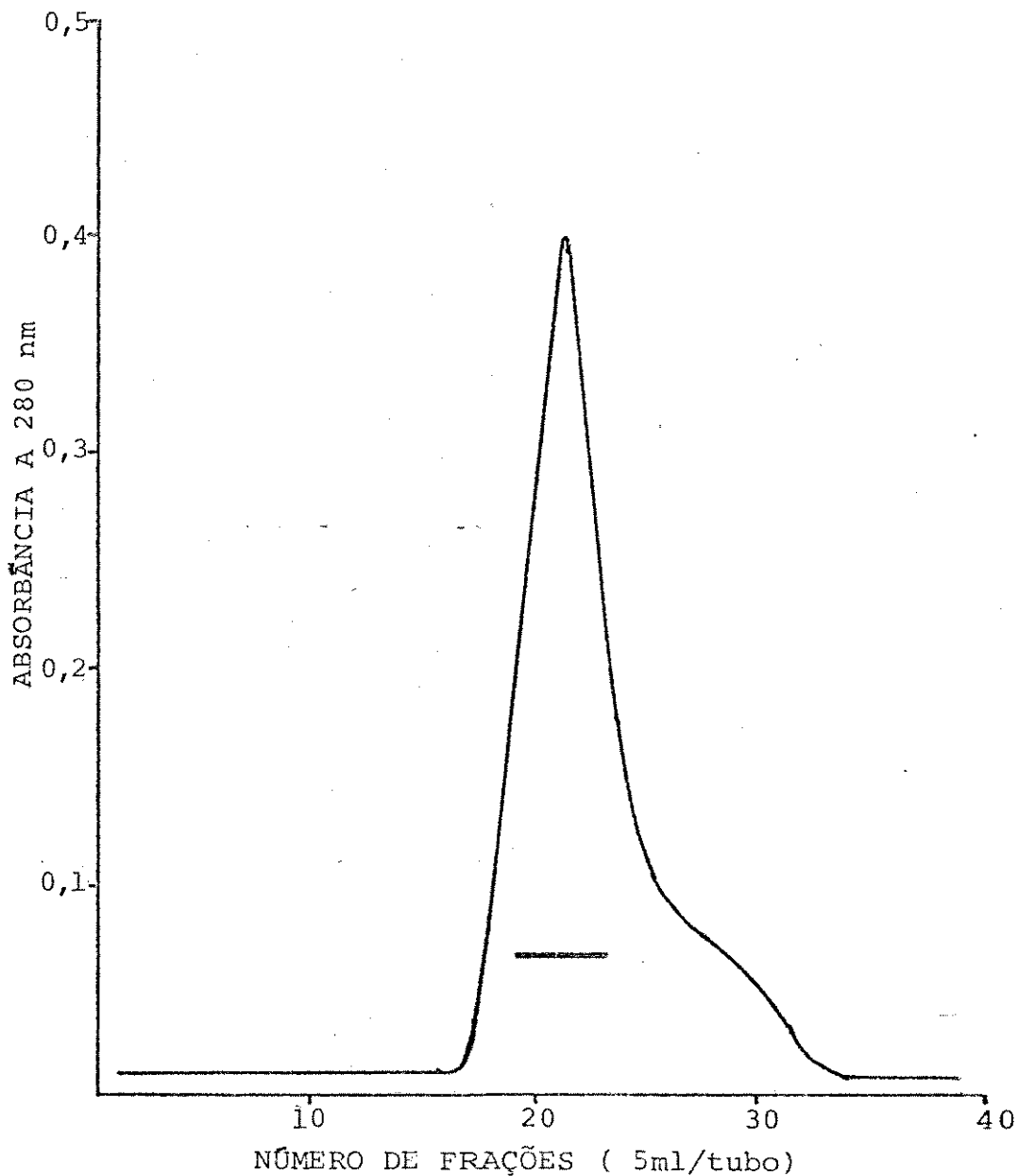
**TABELA 8** - Peso Molecular e Ponto Isoelétrico dos diferentes antígenos de aderência (a).

| Antígenos | PM     | pl      |
|-----------|--------|---------|
| K88       | 27.540 | 4,2     |
| K99       | 18.500 | 9,7     |
| 987P      | 20.000 | 3,7     |
| F41       | 29.500 | 4,6     |
| CFA/I     | 15.058 | 4,8     |
| CFA/II    | 13.000 | - (b)   |
| F42       | 31.000 | 3,2 (c) |

a) GAASTRA & De GRAAF ( 24 ).

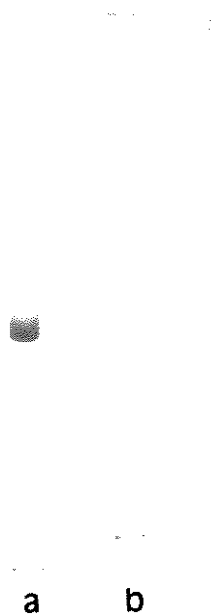
b) valor não conhecido.

c) dados obtidos no presente trabalho.



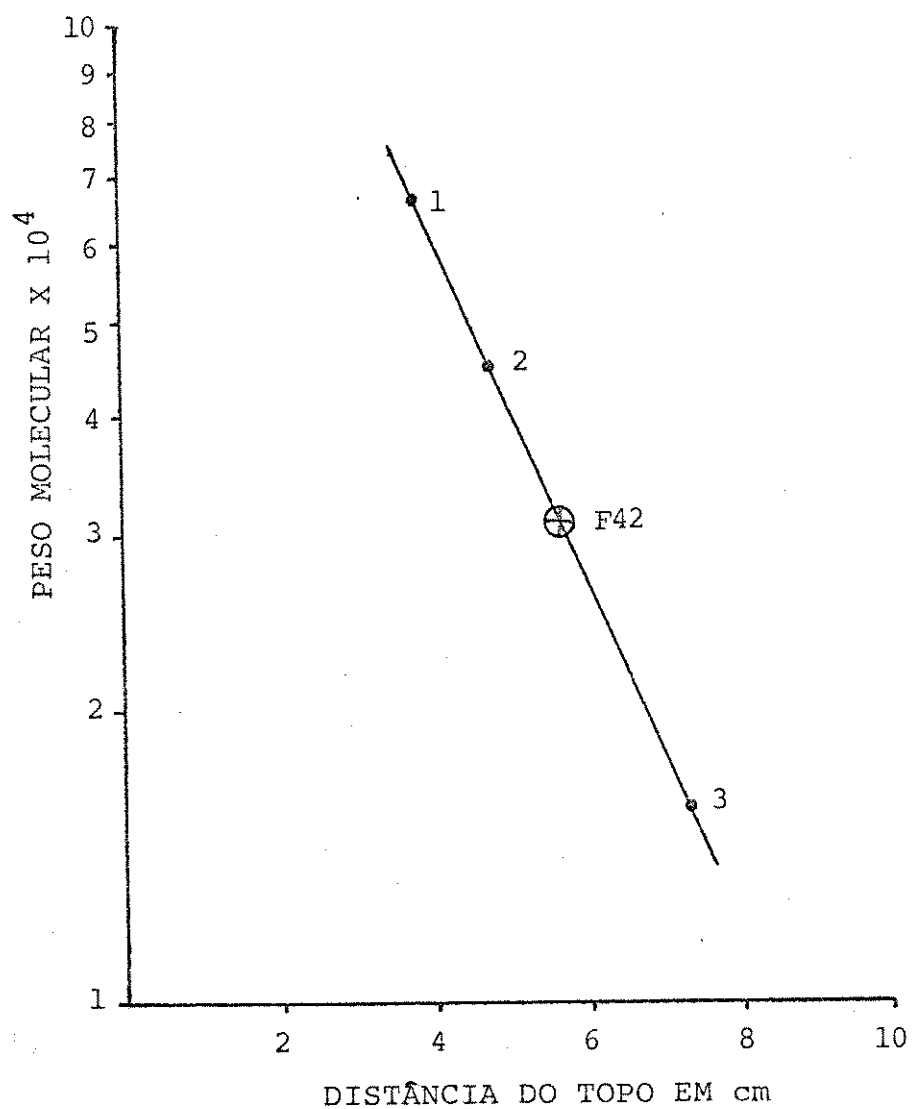
**FIGURA 1** - Perfil de eluição do antígeno F42, cromatografado em coluna de Sepharose 4B.

As frações que apresentaram D.O. superiores a 0,1 foram dialisadas e examinadas pela MHR frente a hemácias de galinha. A barra indica as frações que apresentaram títulos superiores a 1:8, as quais foram reunidas e examinadas por eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS.



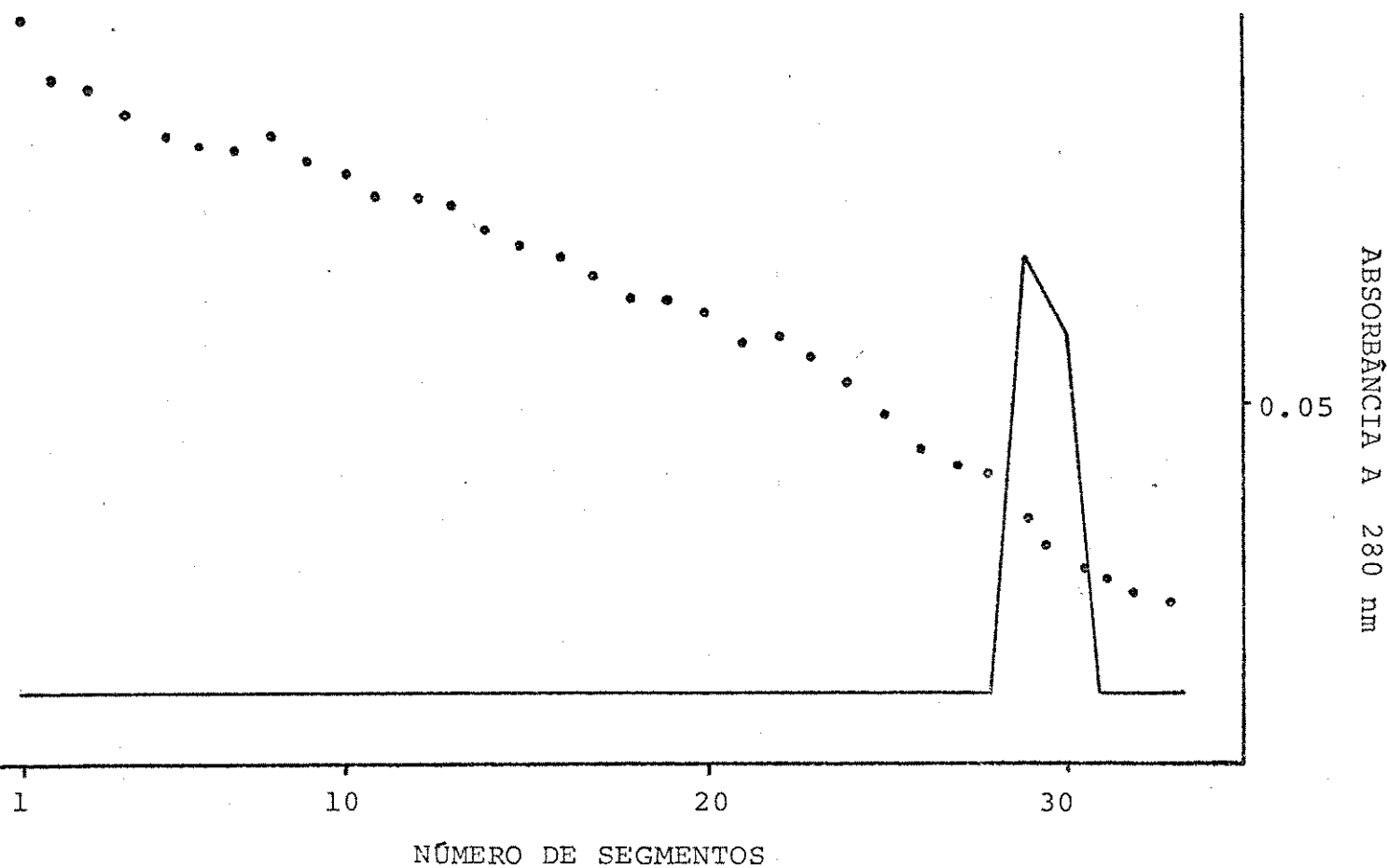
**FIGURA 2** - Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS.

a - antígeno F42 ( DOC solúvel ), b - antígeno F42 cromatografado em Sepharose - 4B.



**FIGURA 3** - Determinação do Peso Molecular do antígeno F42 purificado, por eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS:

1- Soro Albumina Bovina ( 66.000 daltons ); 2- Ovalbumina ( 45.000 daltons ); 3- Mioglobina ( 16.000 daltons ).



**FIGURA 4** - Isoeletrofocalização realizada em gel de poliacrilamida. Os pontos indicam o valor de pH obtido em cada segmento do gel. O pico indica quais os segmentos que apresentavam leitura espectrofotométrica em absorbância de 280nm.

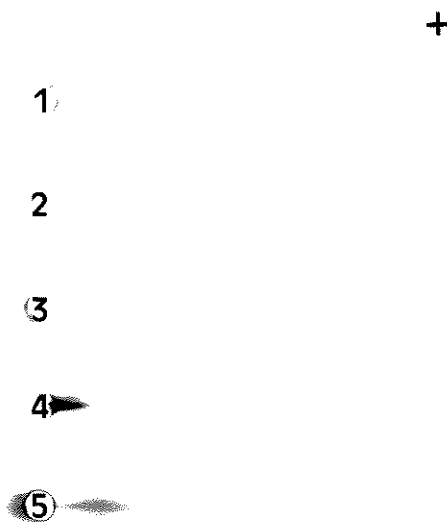
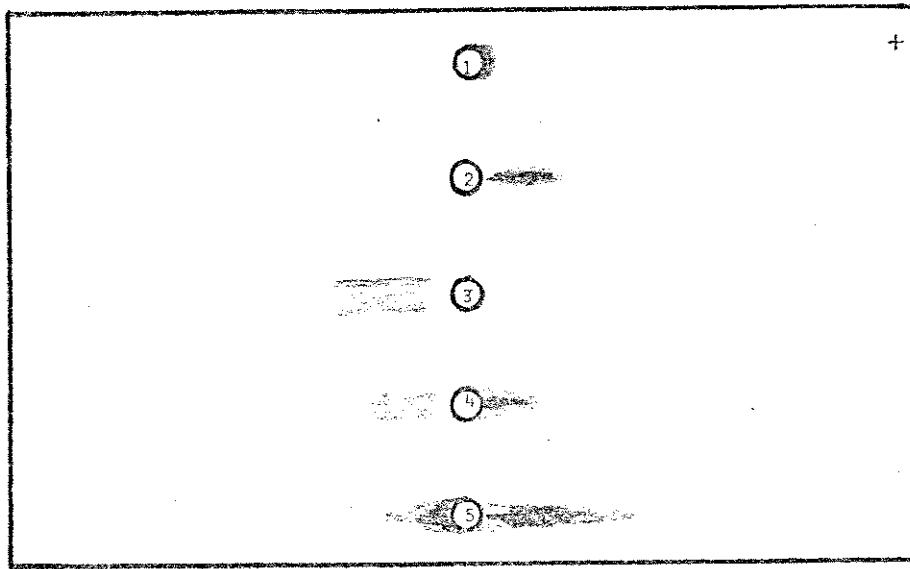


FIGURA 5 - Eletroforese em gel de agar "Noble" dos antígenos de aderência conhecidos comparados com antígeno F42.

1 - F42; 2 - F41; 3 - K99; 4 - K88ab e 5 - K88ac.

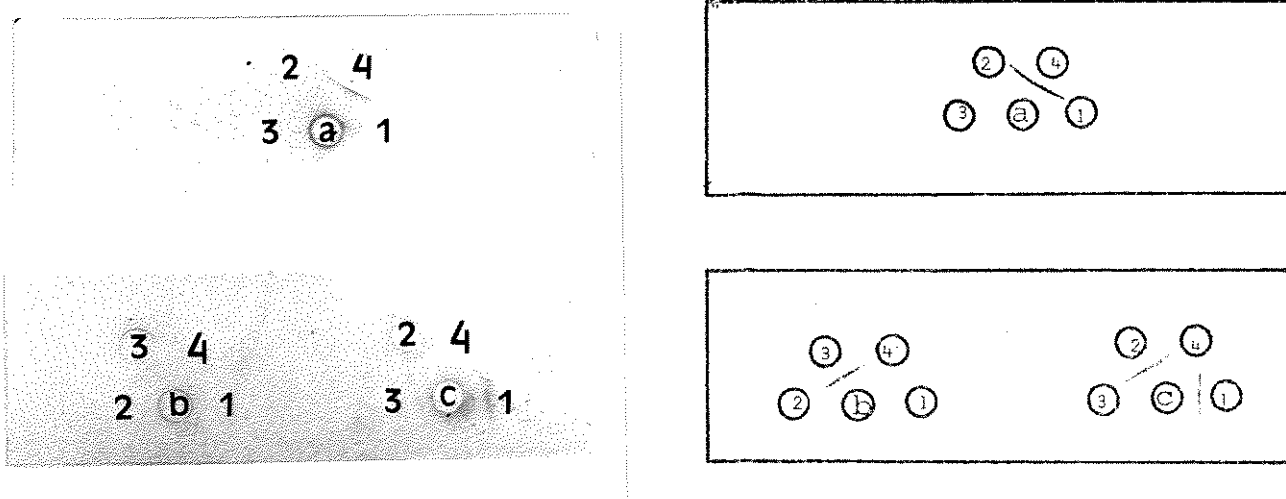
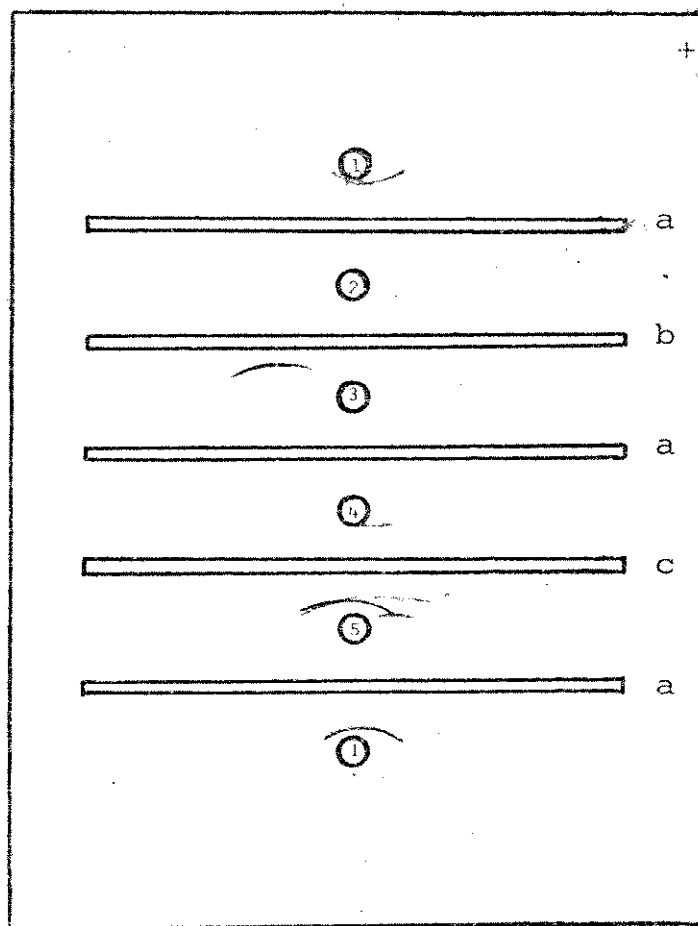
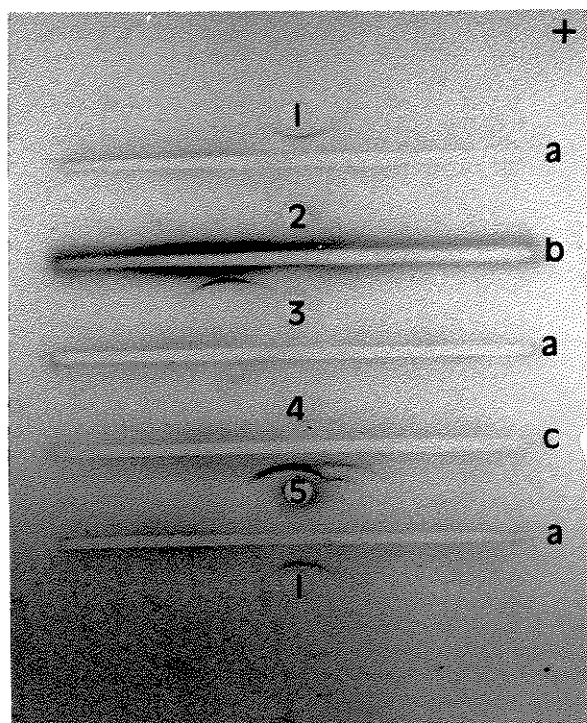


FIGURA 6 - Imunodifusão em gel de agar "Noble" dos antígenos de aderência conhecidos (1 - K99, 2 - F41 e 3 - K88ab) comparados como antígeno F42 (4) e revelados com soros anti - F42 (a), anti - K88 (b) e anti - K99F41 (c).





**FIGURA 7** - Imunoelctroforese dos diferentes antígenos de aderência e do antígeno F42 frente ao soro anti - F42 e respectivos soros homólogos. 1- F42, 2- F41, 3- K99, 4- K88ab e 5- K88ac; a- soro anti - F42, b- anti - K99F41 e c- anti-K88.

## DISCUSSÃO

Observamos que a amostra de *E. coli* 567/7 não aglutinava hemácias bovinas, quando cultivada em quaisquer dos meios de cultura por nós utilizados. Verificamos que quando a amostra de *E. coli* 567/7 foi cultivada em meios sólidos tais como CFA ( 17 ), Minca ( 28 ), BHI ou MMA ( 07 ) suplementado com 0,5% de glicose, era possível detectar a presença do antígeno F42 pela técnica de MHMR, sendo que, a melhor expressão do antígeno foi obtida quando a amostra em estudo foi cultivada em MMA adicionado de glicose, uma vez que a amostra de *E. coli* cultivada neste meio, apresentou maior título microhemaglutinante com hemácias de galinha do que quando cultivada em outros meios de cultura por nós utilizados.

Usando os meios de cultura A.G., TSB e Biken, a amostra de *E. coli* 567/7 não apresentou o padrão de microhemaglutinação descrito por YANO et alii ( 70 ), isto pode ser devido a duas hipóteses: 1- a bactéria não produziu o antígeno F42 quando cultivada nesses meios de cultura. 2- a bactéria produziu o referido antígeno, porém não nos foi possível detectá-lo pelo teste de MHMR, por motivo do aumento da produção de cápsula, o qual pode impedir a reação de hemaglutinação ( 27 ). Essa última possibilidade levantada por GUINEE et alii ( 28 ) levaram estes autores a idealizar um meio de cultura (Minca) para evitar a excessiva formação de cápsula pela amostra de *E. coli* produtora do antígeno de aderência K99.

Procuramos verificar a influência da temperatura na produção do antígeno F42, onde observamos que a amostra de *E. coli* 567/7 comportou-se de modo semelhante aos antígenos de aderência conhecidos (K88, K99, F41, 987P, CFA/I e CFA/II) não apresentando a capacidade de aglutinar hemácias quando cultivada por 48 horas a 18°C. Entretanto, quando a bactéria foi cultivada a 37°C essa capacidade foi observada (Tabela 2). Confirmando os achados descritos por YANO et alii ( 70 ) de que a amostra de *E. coli* 567/7 quando cultivada a 37°C apresentava-se recoberta por estruturas do tipo fímbrias (por observações em microscopia eletrônica) enquanto que a amostra cultivada a 18°C apresentou-se desprovida desse tipo de estruturas. E ainda, os mesmos autores, observaram que a amostra em estudo, era capaz de aderir "in vitro" à células HeLa e a enterócitos isolados de suínos, quando cultivada a 37°C, mas não quando cultivada a 18°C.

JONES & RUTTER ( 37 ) descreveram que, para a produção do antígeno K88 era necessário adicionar glicose ao meio de cultura. ISAACSON ( 34 ) relatou que 0,5% de glicose inibia a produção do fator de colonização K99, entretanto FRANCIS et alii ( 21 ) observaram que glicose a 1% não inibia a produção desse antígeno. A produção do antígeno F42 não foi alterada pela adição de glicose, mostrando ser inclusive necessária para a produção do citado antígeno, pois quando a amostra foi cultivada em MMA sem glicose, não nos foi possível detectar a presença desse antígeno na suspensão bacteriana obtida ( TABELA 3 ).

Procurando verificar o efeito do pH na produção dos antígenos de aderência K99 e F41, van VERSEVELD et alii ( 66 ) observaram que esses antígenos de aderência não eram produzidos quando a amostra de *E. coli* F18 (K99+ F41+) era cultivada em meio mínimo com pH ácido. Em pH alcalino, a produção dos antígenos foi levemente alterada, concluindo que para a melhor produção dos antígenos de aderência K99 e F41 o pH do meio de cultura seja teria que ser próximo ao neutro. Do mesmo modo, estudando o efeito da variação do pH na produção do antígeno F42 pela amostra de *E. coli* 567/7, observamos que este antígeno foi detectado quando cultivado em MMA com pH neutro e alcalino ( TABELA 4 ).

De GRAAF et alii ( 08 ) relataram que a adição de 1 mM de alanina nas formas D ou L no meio mínimo suprimia a biossíntese do antígeno K99. CONTREPOIS et alii ( 06 ) confirmaram esses achados e ISAACSON ( 34 ) descreveu que o aminoácido alanina não afeta diretamente a regulação gênica da síntese da fímbria K99, mas indiretamente, atuando sobre a membrana celular, a qual tem um papel ativo na biossíntese do antígeno de aderência K99.

Em nossos experimentos, observamos que a alanina na forma D, interfere na produção do antígeno F42 ( TABELA 5 ), isto é, quando a amostra de *E. coli* 567/7 foi cultivada em MMA contendo glicose e 1mM de D-alanina, não nos foi possível detectar a presença do antígeno F42 pelo teste de MHMR. Provalvemente, assim como para o antígeno K99, o aminoácido alanina, interfere na mesma etapa da síntese do antígeno F42 impossibilitando a amostra de *E. coli* 567/7 de expressá-lo.

A inibição da síntese do fator de colonização K99 pelo acetato de sódio, foi descrito por FRANCIS et alii ( 21 ) onde foi demonstrado que 0,07 M desse sal suprimia a síntese do antígeno K99

A nossa amostra em estudo, quando cultivada em MMA contendo 0,5% de glicose e acetato de sódio em concentrações iguais ou inferiores as usadas por FRANCIS et alii ( 21 ) também não produziu o antígeno F42.

O mecanismo pelo qual o acetato de sódio afeta a biossíntese do antígeno de aderência K99 é desconhecido. FRANCIS et alii ( 21 ) supõe que a redução da temperatura ou o acúmulo de produtos da fermentação bacteriana como acetato pode ser um sinal do tipo "feedback" levando o microrganismo a não sintetizar o antígeno de aderência quando não necessário.

Os métodos descritos por STIRM et alii ( 64 ) para a extração do antígeno de aderência K88 foram aplicados na extração do antígeno F42 e relevaram ser eficientes para esse fim. Observamos que o antígeno F42 obtido pela precipitação fracionada com 20-45% de saturação de sulfato de amônio, apresentou melhor resultado em termos de atividade biológica em relação a concentração proteica.

KORHONEN et alii ( 41 ) descreveram que o desoxicolato de sódio, insolubiliza os resíduos de lipídeos e de lipoproteínas. A eliminação desses contaminantes pelo tratamento com DOC, como uma etapa da purificação do antígeno F42, demonstrou sua eficiência em termos de 22% de atividade específica ( TABELA 7 ).

O antígeno F42 DOC solúvel foi purificado em coluna de Sepharose 4B à semelhança do descrito para as fímbrias K88 ( 43 ) K99

( 09 ) e F41 ( 10 ). O antígeno F42 deve apresentar-se em forma de agregados, pois ao realizarmos eletroforese em gel de poliacrilamida convencional, observamos que o antígeno F42 (DOC solúvel) bem como o eluído da coluna de Sepharose 4B não penetraram no gel de poliacrilamida ( dados não apresentados ). Quando o antígeno F42 foi tratado com SDS e aquecido a 100°C por 3 minutos, penetrou na matriz de poliacrilamida, demonstrando ser necessário a dissociação dos possíveis agregados para que a difusão ocorresse.

Na eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, verificamos que o antígeno F42 (DOC solúvel) apresentou 3 bandas proteicas, sugerindo existir nessa preparação de F42 pelo menos três proteínas de pesos moleculares diferentes.

Analisando o eluato obtido pela cromatografia em Sepharose 4B, por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, verificamos que nas condições experimentais por nós utilizadas, o antígeno F42 apresentou uma única banda proteica, demonstrando que a cromatografia nessa resina, separou os contaminantes do antígeno F42. Este resultado não nos foi estranho, uma vez que os trabalhos realizados para a purificação dos antígenos de aderência K99 ( 09 ) e CFA/I ( 40 ), também descreveram que estes antígenos foram eluídos na forma de agregados, apresentando-se puro em eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS.

Os resultados obtidos na determinação do peso molecular (31.000 daltons), ponto isoelétrico (em torno de 3,2) e mobilidade eletroforética (ligeiramente catódica), foram diferentes dos encontrados para os antígenos de aderência conhecidos (K88, K99, F41 e 9B7P) ( TABELA 8 ).

Pelos testes sorológicos, observamos que o antígeno F42 foi reconhecido somente pelo antisoro anti-F42, não havendo reação cruzada com os antíssoros anti-K99F41 ou anti-K88. Observou-se também que o antíssoro anti-F42 não reconheceu os antígenos K99, F41, K88ab ou K88ac utilizados como padrões.

Esses resultados confirmam os achados descritos por YANO et alii ( 70 ) os quais observaram que em testes de inibição de MHR, somente ocorreu a inibição quando o antígeno F42 foi incubado a 37°C por 60 minutos com antíssoro anti-F42.

Acreditamos que os resultados por nós obtidos, satisfazem plenamente os objetivos propostos. Assim sendo determinamos quais as condições ótimas para a produção do antígeno F42, purificamos e determinamos algumas características físico-químicas e verificamos não haver relações antigênicas entre o antígeno F42 e os fatores de colonização conhecidos de amostras de origem suína.

Ainda sob o ponto de vista básico, a caracterização definitiva deste novo antígeno de aderência, se estudando outros detalhes tais como composição e sequência de aminoácidos, a identificação de receptores em hemácias e nas células das vilosidades intestinais será altamente relevante e trata-se de assunto com relação ao qual já iniciamos estudos na área.

Sob o ponto de vista prático, nossos dados (não publicados) demonstraram que o antígeno F42 está presente em número relativamente elevado de amostras enterotoxigênicas produtoras de STa. Conforme já mencionamos anteriormente a frequência deste antígeno em 9,6% entre 156 amostras de *E. coli* de origem suína STa positiva, é considerável

sendo superior a relatada para o antígeno K99 ( O5, 51 ). A importância deste antígeno se torna mais evidente se nos for permitido citar que, em trabalhos em andamento (PESTANA de CASTRO, comunicação pessoal), foi possível reproduzir experimentalmente a infecção em leitões recém-nascidos. Estes não mamaram o colostro e foram inoculados, por via oral, com cultivos da amostra 567/7 ( F42+ STa+ ). Todos os animais inoculados, em número de 4, apresentaram diarreia aguda, com morte em menos de 72 horas. Das fezes desses animais foram isoladas 5 colônias de *E. coli* as quais foram todas F42+ e STa+ comprovando que este colibacilo era predominante no conteúdo fecal e portanto, havia provavelmente colonizado o intestino delgado dos leitões inoculados.

Esses aspectos de natureza pratica sugerem que a imunoprophylaxia da colibacilose suína precisa conter como imunógeno o antígeno F42 purificado ou semi-purificado.

Concluindo ainda sob o ponto de vista prático, nossa investigação prestou, ao nosso ver, uma colaboração importante estabelecendo quais as melhores condições para a produção do antígeno F42 e qual a metodologia para a sua purificação e caracterização. Portanto a sua inclusão sob forma semi-purificada em uma vacina contra a colibacilose suína vai depender apenas de uma opção por parte das indústrias e ou laboratórios especializados.



### CONCLUSÕES

1 - A produção do antígeno F42 pela amostra de *E.coli* 567/7 foi maior, quando a amostra em questão foi cultivada em meio Mínimo A.

2 - A semelhança do relatado para outros antígenos de aderência, a produção do antígeno F42 foi inibida em cultivos incubados a 18°C, mas não a 37°C.

3 - A não adição de glicose ao meio Mínimo A impediu a produção do antígeno F42 detectável pela prova de MHMR frente a hemácias de galinha.

4 - O pH do meio de cultura interferiu na produção do antígeno F42, que somente foi detectado por MHMR quando a amostra de *E. coli* 567/7 foi cultivada em meio Mínimo A com pH alcalino ou neutro.

5 - O aminoácido D-alanina ou acetato de sódio, quando adicionados ao meio Mínimo A, inibiram a produção do antígeno F42.

6 - Os métodos utilizados na purificação do antígeno F42 mostraram ser eficientes, uma vez que, o rendimento final obtido foi de 20% e sua atividade relativa aumentou 128,8 vezes.

7 - O Peso Molecular do antígeno F42 está em torno de 31.000 daltons e seu Ponto Isoelétrico próximo a 3,2.

8 - O antígeno F42 não apresentou semelhanças antigênicas com os antígenos de aderência conhecidos de origem animal (K88, K99 e F41).

Concluimos assim, que o antígeno F42 é um antígeno de aderência com características físico-químicas e biológicas diferentes dos antígenos de aderência conhecidos, presente em amostras de *E. coli* enterotoxigênicas de origem suína.

## RESUMO

No presente trabalho, procuramos purificar e caracterizar físico-química e biologicamente o antígeno de aderência F42 produzido pela amostra de *Escherichia coli* enterotoxigênica (STa) de origem suína, além de verificar quais as melhores condições de cultivo para a sua produção.

Verificamos que o meio Mínimo A é o meio de cultura mais apropriado para a produção do antígeno F42.

Quando a amostra de *E. coli* 567/7 foi cultivada a 37°C, produziu o antígeno F42 que apresentou atividade hemaglutinante, o mesmo não foi observado quando a amostra em estudo foi cultivada a 18°C.

A adição de D-alanina ou de acetato de sódio ao meio Mínimo, inibiu a produção do antígeno F42.

A produção do antígeno F42 é dependente da presença de glicose.

O pH do meio Mínimo deve ser neutro ou alcalino, pois em pH ácido o antígeno F42 não foi produzido.

O antígeno F42 extraído por aquecimento, foi purificado por precipitação com sulfato de amônio, tratamento com desoxicolato de sódio e cromatografia em coluna de Sepharose 4B.

Verificamos que seu peso molecular é de 31.000 daltons e ponto isoelétrico próximo ao pH 3,2.

A análise sorológica do antígeno F42, por Imunodifusão e Imunoeletroforese, mostrou que este era diferente dos antígenos de aderência de origem animal conhecidos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 01 - BLUMENSTOCK, E. & JANN, K. Adhesion of piliated *Escherichia coli* strains to phagocytes: differences between bacteria with mannose - sensitive pili and those with mannose - resistant pili. *Infec.Immun.*, 35:264-269, 1982.
- 02 - BRINTON, C.C.Jr. The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria. *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, 27:1003-1054, 1965.
- 03 - BRINTON C.C. Studies on the piliation of a human enteropathogen, *Escherichia coli*, H-10407, p.34-70. In. *Proceedings of the 13th Joint Conference on Cholera*. Publication number ( NIH ) 78-1590. Department of Health, Education and Welfare, Washigton, D.C., 1978.
- 04 - BURROWS, M.R.; SELLWOOD, R. & GIBBONS, R.A. Haemagglutinating and adhesive properties associated with the K99 antigen of bovine strains of *Escherichia coli*. *J.Gen.Microbiol.*, 96:269-275, 1976.

- 05 - CASTRO, A.F.P.; SERAFIM, M.B.; BRITO, J.R.F.; BARCELLOS, D.S.E.N. & COLLI, I.A.G. Virulence factors present in cultures of *Escherichia coli* isolated from pigs in the region of Concórdia, Santa Catarina, BRAZIL. *Pesq.Vet.Bras.*, 4(3):109 - 114. 1984.
- 06 - CONTREPOIS, M.; GIRARDEAU, J.P.; DUBOURGUIER, H.C. & GOUET, P. Mise en evidence de quelques facteurs intervenant dans la biosynthese de l'ag K99, p. 206-227. In POHL, P. & LEUNEN, J. (ed.), *Resistance and pathogenic plasmids*. C.E.C.Seminar 1981 Brussels, National Institute for Veterinary Research., 1982.
- 07 - DAVIS, B.D. & MINGIOLI, E.S. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B . *J.Bact.*, 60:17-28, 1950.
- 08 - de GRAAF, F.K.; KLAASEN-BOOR, P. & van HEES, J.E. Biosynthesis of the K99 surface antigen is repressed by alanina. *Infect. Immun.*, 30:125-128, 1980.
- 09 - de GRAAF, F.K.; KLEMM, P. & GAASTRA, W. Purification, characterization and partial covalent structure of the adhesive antigen K99 of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 33:877-883, 1981.
- 10 - de GRAAF, F.K. & ROORDA, I. Production, purification and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from the calf enteropathogenic *Escherichia coli* strain B41M. *Infect. Immun.*, 36:751-753, 1982.

- 11 - de GRAAF, F.K.; WIJNTJES, F.B. & KLAASEN-BOOR, P. Production of K99 antigen by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of antigen groups 08.09, 020, and 0101 grown at different conditions. *Infect. Immun.*, **27**:216-221, 1980.
- 12 - DUGUID, J.P.; ANDERSON, E.S. & CAMPBELL, I. Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *J. Pathol. Bacteriol.*, **92**: 107-137, 1966.
- 13 - DUGUID, J.P. & OLD, D.C. Adhesive properties of *Enterobacteriaceae*, p.185-217. In. BEACHEY, E.H. (ed), *Bacterial adherence, receptor and recognition, series B*, vol.6. Chapman and Hall. London., 1980.
- 14 - DUGUID, J.P.; SMITH, W.; DEMPSTER, G. & EDMUNDS, P.N. Nonflagellar filamentous appendages ("fimbriae") and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. *J. Pathol. Bacteriol.*, **70**:335-348, 1955.
- 15 - EVANS, D.G. & EVANS Jr, D.J. New surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups 06 and 08. *Infect. Immun.*, **21**:638-647, 1978.
- 16 - EVANS Jr, D.J.; EVANS, D.G. & DuPONT, H.L. Haemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia*

*coli* determined with human, bovine, and guinea pig erythrocytes in the presence and absence of mannose. *Infect. Immun.*, 23:336-346, 1979.

- 17 - EVANS, D.G.; EVANS Jr, D.J. & TJOA, W. Haemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea : correlation with colonization factor. *Infect. Immun.*, 18:330-337, 1977.
- 18 - EVANS, D.G.; EVANS, D.J. Jr., CLEGG, S. & PAULEY, J.A. Purification and characterization of the CFA/I antigen of enterotoxigenic *Echerichia coli*. *Infect. Immun.*, 25:738 - 748. 1979.
- 19 - EVANS, D.G.; SILVER, R.D.; EVANS Jr, D.J.; CHASE, D.G. & GORBACH, S.L. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. *Infect. Immun.*, 12:656-667, 1975.
- 20 - FAIRBANKS, G.; STECH, T.L. & WALLACH, D.F.H. Electrophoretic analysis of the major polypeptide of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10:2606-2617, 1971.
- 21 - FRANCIS, D.H.; RYAN, C.J. & FRITZMEIR, J.D. Effect of sodium acetate on expression of pill K99 by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 41:1368-1369, 1983.

- 22 - FREER, J.H.; ELLIS, A.; WADSTROM, T. & SMYTH, C.J. Occurrence of fimbriae among enterotoxigenic intestinal bacteria isolated from cases of human infantile diarrhoea. **FEMS MICROBIOL. LETT.**, **3**:277-281, 1978.
- 23 - FUSCO, P.; TO, A.; TO, S. & BRINTON Jr, C. The purification and characterization of four types of *Escherichia coli* pili and the specificity of *E. coli* for immunity, colonization and adhesion. In: MILLER, C. (ed), **XIIIth U.S. - Japan Conference on Cholera**, Atlanta, Ga., September, 1977. p.60-70. National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1978.
- 24 - GAASTRA, W. & de GRAAF, F.K. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Microbiol. Rev.**, **46**:129-161, 1982.
- 25 - GRABAR, P. & BURTIN, P. Imunoelektrophoretische analysis. Elsevier, Amsterdam., 1964.
- 26 - GUINEE, P.A.M. & JANSEN, W.H. Behavior of *Escherichia coli* K antigens K88ab, K88ac, and K88ad in immunoelectrophoresis, double diffusion, and haemagglutination. **Infect. Immun.**, **23**:700-705, 1979.
- 27 - GUINEE, P.A.M.; JANSEN, W.H. & ACTERBERG, C.M. Detection of the K99 antigen by means of agglutination and immunoelectrophoresis in *Escherichia coli* isolates from calves



and its correlation with enterotoxigenicity. *Infect.Immun.*, **13**:1369-1377, 1976.

- 28 - GUINEE, P.A.M.; VELTKAMP, J. & JANSEN, W.H. Improved Minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *Infect.Immun.*, **15**:676-678, 1977.
- 29 - HARTREE, E.F. Determination of protein : a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, **48**:422-426, 1972.
- 30 - HONDA, T.; TAGA, S.; TAKEDA, Y. & MIWATANI, T. A modified Elek test for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J.Clin.Microbiol.*, **13**:1-5, 1981.
- 31 - HOUWINK, A.L. & van ITERSOM, W. Electron microscopical observations on bacterial cytology. II. A study on flagellation. *Biochim. Biophys.Acta*, **5**:10-44, 1950.
- 32 - ISAACSON, R.E. K99 surface antigen of *Escherichia coli*: purification and partial characterization. *Infect.Immun.*, **15**:272-279, 1977.
- 33 - ISAACSON, R.E. K99 surface antigen of *Escherichia coli*: antigenic characterization. *Infect.Immun.*, **22**:555-559, 1978.

- 34 - ISAACSON, R.E. Factors affecting expression of the *Escherichia coli* pilus K99. *Infect. Immun.*, **28**:190-194, 1980.
- 35 - ISAACSON, R.E. & RICHTER, P. *Escherichia coli* 987P pilus: purification and partial characterization. *J. Bacteriol.*, **146**:784-789, 1981.
- 36 - JONES, G.W. The attachment of bacteria to the surfaces of animal cells. In: REISSIG, J.L. (ed), *Microbial Interactions, receptors and recognition, series B*, vol.3, p.139-176., Chapman and Hall, London, 1977.
- 37 - JONES, G.W. & RUTTER, J.M. Role of K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by *Escherichia coli* in piglets. *Infect. Immun.*, **6**:918-927, 1972.
- 38 - JONES, G.W. & RUTTER, J.M. The association of K88 antigen with haemagglutinating activity in porcine strains of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, **84**:135-144, 1974.
- 39 - KAUFFMANN, F. & VAHLNE, G. Ueber die Bedeutung des serologischen Formenwechsels für die Bakteriophagen-wirkung in der Coli-Gruppe. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B2*:119-137, 1945.
- 40 - KLEMM, P. Fimbrial colonization factor CFA/I protein from human enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *FEBS Lett.*, **108**:107-110, 1979.

- 41 - KORHONEN, T.K.; NURMIAHO, E.L.; RANTA, H. & SVANBORG-EDEN, C. New method for isolation of immunologically pure pili from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **27**:569-575, 1980.
- 42 - MERZ, D.C.; GOOD, R.A. & LITMAN, G.W. Segregation of membrane components using isoelectric focusing in polyacrylamid gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**:84-91, 1972.
- 43 - MOOI, F.R. & de GRAAF, F.K. Isolation and characterization of K88 antigens. *FEMS Microbiol. Lett.*, **5**:17-20, 1979.
- 44 - MORRIS, J.A.; STEVENS, A.E. & SOJKA, W.J. Preliminary characterization of cell-free K99 antigen isolated from *Escherichia coli* B41. *J. Gen. Microbiol.*, **99**:353-357, 1977.
- 45 - MORRIS, J.A.; STEVENS, A.E. & SOJKA, W.J. Isoelectric point of cell-free K99 antigen exhibiting hemagglutinating properties *Infect. Immun.*, **19**:1097-1098, 1978.
- 46 - MORRIS, J.A.; THORNS, C.; SCOTT, A.C.; SOJKA, W.J. & WELLS, G.A. Adhesion in vitro and in vivo associated with an adhesive antigen (F41) produced by a K99-mutant of the reference strain *Escherichia coli* B41. *Infect. Immun.*, **36**:1146-1153, 1982.
- 47 - MORRIS, J.A.; THORNS, C.J. & SOJKA, W.J. Evidence for two adhesive antigens on the K99 reference strain *Escherichia coli* B41. *J. Gen. Microbiol.*, **118**:107-113, 1980.

- 48 - NAGY, B.; MOON, H.W. & ISAACSON, R.E. Colonization of porcine small intestine by *Escherichia coli*; ileal colonization and adhesion by pig enteropathogens that lack K88 antigen and by some acapsular mutants. *Infect. Immun.*, **13**:1214-1220, 1976.
- 49 - NAGY, B.; MOON, H.W. & ISAACSON, R.E. Colonization of porcine intestine by enterotoxigenic *Escherichia coli*; selection of piliated forms in vivo, adhesion of piliated forms to epithelial cells in vitro, and incidence of a pilus antigen among porcine enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **16**:344-352, 1977.
- 50 - OFEK, I. & BEACHEY, E.H. Mannose binding and epithelial cell adherence of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **22**:247-254, 1978.
- 51 - OLIVEIRA, M.S.; CASTRO, A.F.P.; SERAFIM, M.B. & GIORGI, W. Manose-resistant haemagglutination and colonization factors among *Escherichia coli* strains isolated from pigs. *Vet. Rec.*, **26**:275 - 278. 1981.
- 52 - ØRSKOV, I. & ØRSKOV, F. Epsilon-carried surface antigen K88 of *Escherichia coli*. *J. Bact.*, **91**:69-75. 1966.
- 53 - ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F.; SMITH, H.W. & SOJKA, W.J. The establishment of K99, a thermolabile, transmissible *Escherichia coli* K

- antigen, previously called "Kco", possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.Sect.*, **B83**:31-36, 1975.
- 54 - OTTOW, J.C.G. Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili. *Annu.Rev.Microbiol.*, **29**:79-108, 1975.
- 55 - OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progs.Allerg.*, **5**:78, . 1958.
- 56 - PARRY, S.H. & PORTER, P. Immunological aspects of cell membrane adhesion demonstrated by porcine enteropathogenic *Escherichia coli*. *Immunology*. **34**:41-49, 1978.
- 57 - RANGEL, H.A. & REPKA, D. The use of passive haemolysis in the quantitative estimation of anti-protein antibodies. *Immunology*. **8**:618-627, 1965.
- 58 - SALIT, I.E. & GOTSCHLICH, E.C. Hemagglutination by purified type I *Escherichia coli* pili. *J.Exp.Med.*, **146**:1169-1181, 1977.
- 59 - SMITH, H.W. & HALLS, S. Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. *J.Path.Bact.*, **93**:531-543. 1967.
- 60 - SMITH, H.W. & LINGGOOD, M.A. Further observations on *Escherichia coli* enterotoxins with particular regard to those produced by atypical piglet strains and by calf and lamb strains: the

- transmissible nature of these enterotoxins and of a K antigen possessed by calf and lamb strains. *J.Med.Microbiol.*, **5**:243-250, 1972.
- 61 - SOJKA, W.J. *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. Farnham Royal: Commonwealth Agricultural Bureaux of Animal Health, Weybridge, England. 1965
- 62 - STIRM, S.; ØRSKOV, I. & ØRSKOV, F. K88, and episome-determined protein antigen of *Escherichia coli*. *Nature* (London), **209**: 507-508, 1966.
- 63 - STIRM, S.; ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I. & BIRCH-ANDERSEN. Episome-carried surface antigen K88 of *Escherichia coli*. III- Morphology. *J.Bacteriol.*, **93**:740-748, 1967.
- 64 - STIRM, S.; ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I. & MANSFA, B. Episome-carried surface antigen K88 of *Escherichia coli*. II- Isolation and chemical analysis. *J.Bacteriol.*, **93**:731-739, 1967.
- 65 - TO, S.C.M. F41 antigen among porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* strains lacking K88, K99 and 987P pili. *Infect.Immun.*, **43**:549-554. 1984.
- 66 - van VERSEVELD, H.W.; BAKKER, P.; van der WOUDE, T.; TERLETH, C. & de GRAAF. Production of fimbrial adhesins K99 and F41 by enterotoxigenic *Escherichia coli* as function of growth-rate domain. *Infect.Immun.*, **49**:159-163, 1985.

- 67 - WEIL,E.; FELIX,A. Untersuchungen uber die gewohlichen Proteusstamme und Beziehungen zu den X-Stamme. **Wien.Klin. Wochenschr.**,23:637-639, 1918..
- 68 - WEIL,E.; FELIX,A. Ueber die Doppelnatur der Rezeptoren beim Paratyphus. **Wien.Klin.Wochenschr.**,36:986-988, 1918.
- 69 - WEVERS,P.; PICKEN,R.; SCHMIDT,G.; JANN,B. GOLECKI,J.R. & KIST,. Characterization of pili associated with **Escherichia coli** 018ac. **Infect.Immun.**,29:685-691, 1980.
- 70 - YANO,T.; LEITE,D.S.; CAMARGO,I.J.B. & PESTANA de CASTRO,A.F. A probable new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic **Escherichia coli** isolated from pigs. **Microbiol.Immunol.** (Aceito para publicação).