

81276

**BC/18636**  
**IB/81276**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO



MARCELO BROCHI

CLONAGEM E DELEÇÃO DO GENE LT<sub>B</sub> DE *Escherichia coli*  
DE ORIGEM SUÍNA PARA SER UTILIZADO COMO CARREADOR DE  
EPÍTOPOS ANTIGÊNICOS

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato(a)  
*Marcelo Brochi*  
e aprovada pela Comissão Julgadora. *[Signature]*  
17/12/92

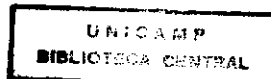
Tese apresentada ao Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética.

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira.

T/UNICAMP

B782<sub>C</sub>

Campinas, 1992.



UNIDADE	IB/175
N.º CHAMADA	B782c
V.	
TEL.	18636
PROG.	261/93
C	<input type="checkbox"/>
	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 100.000,00
DATA	30/04/93
N.º CPD	

*OK*

CM 000375924

BIB:000055231

||||| DEDICO

A meus pais Antônio e Neide,  
pelo apoio e compreensão de  
sempre e sem os quais este  
trabalho não teria sido  
possível.

||||| REFLEXÃO

"Vocês vêem coisas e perguntam o  
porquê, mas eu sonho coisas que  
nunca existiram, e pergunto, por  
que não ?

*George Bernard Shaw.*

## **AGRADECIMENTOS:**

Agradeço ao Prof. e amigo de todas as horas Dr. Wanderley Dias da Silveira pela excelente orientação, incentivo, dedicação, paciência, amizade no dia a dia do laboratório e por ter me iniciado na vida científica como primeiro orientador.

À meu irmão Maurício e família por terem me aguentado por mais de dois anos, sem reclamações, em sua residência, o que me propiciou, além da agradável convivência, a economia necessária para a compra deste microcomputador, que tem sido meu instrumento de trabalho nesses últimos três meses.

À Lú, pela convivência, incentivo, apoio, compreensão e amor nas horas difíceis e pela ajuda na redação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Renato Bonatelli Jr., pela sua influência e participação em minha formação científica, pela acolhida e agradável convivência no laboratório de Genética de Fungos Filamentosos e pela participação como membro da banca examinadora desta Dissertação.

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pela participação indireta e direta na minha formação acadêmica e pela participação como membro da banca examinadora desta Dissertação.

Aos amigos, companheiros e cientistas do laboratório de Biologia Molecular Bacteriana, Fabiana Fantinatti, Sergio de Mendonça, Paulo Moretti, Vanessa Sperandio (loira), Paulo Afonso Nogueira, Patrícia Orlandi, Cristiana Simão Seixas, Eneida de Abreu Parizoto e Cleide Marques Ferreira pela agradável convivência, companherismo, amizade, ajuda, discussões e sugestões ao longo deste trabalho.

Ao agora pesquisador inglês Gilson Paulo Manfio que esteve por

muito tempo entre nós e foi o responsável por grandes ajudas.

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano pela agradável convivência, pela ajuda nos momentos necessários e pelo uso das dependências, equipamentos e materiais de seu laboratório sempre que se tornou necessário (quase sempre).

À Prof(a) e futura Doutora Maria Silvia Vicari Gatti pelas sugestões, pela amizade e incentivo ao longo deste trabalho, assim como das facilidades concedidas ao uso de seu laboratório e equipamentos, principalmente da importantíssima água miliQ.

À Prof. Dr. Yoko Bomura Rosato pela participação como membra da pré-banca examinadora desta dissertação.

Aos amigos Bia, Camilo, Cabeça, Fernando Cónsoli, Andrés, Germano, Guilherme, Luciano, Maria Helena, Nanci, Édson, Édson Kemper, Gonçalo e Luís Zerbini, residentes ou não à Rua Alberto de Salvo, 402, pelo companheirismo e sobretudo pela amizade e apoio de sempre.

À Prof(a). Dr(a). Lucila Costallat Ricci pelas sugestões e concessão do soro anti-CT para "western Blot" assim como de outros materiais que se tornaram necessários.

À Prof(a) Dr(a) Marlene Braide Serafim pelo uso das dependências, equipamentos e materiais de seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Edgar Zanolli pelas longas conversas filosóficas, companheirismo e amizade.

Aos Professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Dr. Domingos da Silva Leite e Dr(a) Clarice Arns pela amizade e colaboração.

Aos funcionários Ana Stella Menegon Degrossoli, Isildinha Greggio Colli e Manoel Bernardo da Silva, pela amizade, colaboração e inestimável ajuda.

Ao chefe do Departamento de Microbiologia e Imunologia Prof. Dr. Antônio Fernando Pestana de Castro, pelas facilidades concedidas para o uso das dependências deste Departamento.

Aos demais Professores e Funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia pela agradável convivência e colaboração.

## ÍNDICE

1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. <i>Escherichia coli</i> associada com infecções extra-intestinais.....	5
2.2. <i>E. coli</i> associada com infecções em aves.....	6
2.3. <i>E. coli</i> associada com infecções intestinais.....	7
2.3.1. <i>E. coli</i> enteropatogênicas clássicas (EPEC).....	8
2.3.2. <i>E. coli</i> enterohemorrágicas (EHEC).....	11
2.3.3. <i>E. coli</i> enteroaderentes (EAEC).....	13
2.3.4. <i>E. coli</i> enteroinvasivas (EIEC).....	14
2.3.5. <i>E. coli</i> enterotoxigênicas (ETEC).....	15
2.3.5.1. Enterotoxinas produzidas por ETEC.....	16
2.3.5.2. Adesinas ou fatores de colonização em ETEC.....	22
2.4. Doenças causadas por <i>E. coli</i> em suínos.....	30
2.5. Vacinas contra ETEC.....	32
2.5.1. Vacinas baseadas em antígenos fimbrianos.....	35
2.5.2. Vacinas anti-toxinas de ETEC.....	37
2.5.3. Associação entre antígenos toxóides e fimbrianos.....	42
2.5.4. Uso de linhagens atenuadas de <i>Salmonella</i> como carreadoras de antígenos para imunização.....	43
2.5.5. A situação atual.....	47
3. Material.....	48
3.1. Plasmídios e linhagens bacterianas.....	48
3.2. Meios de cultura e soluções de uso geral.....	50
3.3. Soluções para extração plasmidial e eletroforese de DNA.....	54
3.4. Tampões e soluções para biologia molecular.....	56
3.5. Soluções para sequenciamento de DNA.....	60



3.6. Tampões e soluções para extração e eletroforese de proteínas.....	60
3.7. Soluções para coloração em prata de SDS-PAGE.....	63
3.8. Soluções para imuno-hemólise-passiva.....	67
3.9. Soluções para "Western Blot".....	68
4. Métodos.....	72
4.1. Extração plasmidial em pequena escala.....	72
4.2. Visualização plasmidial em gel de agarose.....	73
4.3. Amplificação plasmidial.....	73
4.4. Extração plasmidial em larga escala.....	74
4.5. Precipitação de DNA.....	75
4.6. Equilíbrio de fenol para extração plasmidial.....	75
4.7. Purificação de DNA plasmidial através de extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico.....	76
4.8. Purificação de DNA plasmidial através de ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cézio.....	77
4.9. Extração de brometo de etídeo de preparações de DNA.....	77
4.10. Dosagem da concentração de DNA em amostras purificadas.....	77
4.11. Digestão de DNA com enzimas de restrição.....	78
4.12. Purificação de fragmentos de DNA em agarose tipo VII.....	78
4.13. Defosforilação de DNA vetor plasmidial.....	79
4.14. Clonagem molecular do gene <i>eltB</i> (LT <sub>B</sub> ).....	80
4.15. Transformação bacteriana.....	80
4.16. Análise dos clones obtidos.....	81
4.17. Deleção da porção carboxi-terminal do gene <i>eltB</i> (LT <sub>B</sub> ), correspondente à subunidade B da toxina LT.....	82
4.18. Ligaçãõ de "linker" para restabelecimento do sítio de restrição.....	83
4.19. Sequenciamento de DNA.....	84
4.20. Montagem, condições de corrida eletroforética para gels de	

sequenciamento e sensibilização de filmes radiográficos.....	86
4.21. Revelação de filmes radiográficos.....	87
4.22. Extração de proteínas totais de <i>Escherichia coli</i> .....	88
4.23. Precipitação de proteínas do sobrenadante de culturas.....	88
4.24. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida.....	89
4.25. Coloração de prata de SDS-PAGE.....	91
4.26. Imuno-hemólise-passiva.....	91
5. Resultados.....	95
5.1. Clonagem do gene <i>eltB</i> no plasmídeo pUC18.....	95
5.2. Deleção da porção carboxi-terminal do gene <i>eltB</i> .....	97
5.3. Subclonagem do gene <i>eltB</i> digerido em pUC18.....	98
5.4. Sequenciamento do gene <i>eltB</i> digerido com ExoIII.....	99
5.5. Clonagem do gene <i>eltB</i> digerido e intacto no vetor de expressão pKK2233.....	100
5.6. Extração de proteínas totais e sobrenadante de culturas contendo plasmídios pSB3 e pSB4.....	101
5.7. Detecção da produção de LT <sub>B</sub> através de técnicas imunológicas...103	
5.8. Análise da capacidade das proteínas LT <sub>B</sub> intacta e digerida de serem reconhecidas e reagirem com anticorpos anti-LT <sub>B</sub> , detectada através de "Western Blot".....	103
6. Discussão.....	115
7. Resumo.....	122
8. Summary.....	124
9. Referências Bibliográficas.....	126

-Figura 6- Eletroforese em gel de agarose (1,4%) demonstrando a clonagem do gene LT<sub>B</sub> deletado, após tratamento com a enzima ExoIII, no vetor plasmidial pUC18, construindo-se o plasmídio pSB2.....110

-Figura 7- Sequência nucleotídica da subunidade B da toxina Ltermo-lábil (LTp) produzida por amostras de *Escherichia coli* de origem suína.....111

-Figura 8- Eletroforese em gel de agarose (1,4%) demonstrando a clonagem dos genes LT<sub>B</sub> intacto e deletado no vetor de expressão plasmidial pKK2233, entre os sítios EcoRRI e HindIII, construindo-se os plasmídios pSB3 e pSB4.....112

-Figura 9- Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (13%) na presença de SDS para a detecção da produção e secreção da toxina LT no sobrenadante de culturas bacterianas.....113

-Tabela 4- Detecção da produção da subunidade B de LT em diferentes linhagens de *Escherichia coli* construídas por clonagem do gene elt<sub>B</sub> intacto ou deletado, em diferentes vetores de clonagem ou expressão.....114

## 1. INTRODUÇÃO

Com o acúmulo de conhecimentos na área de Biologia Molecular e o advento das técnicas de Engenharia Genética, um grande impulso foi dado ao desenvolvimento de vacinas. Ao contrário das técnicas convencionais, baseadas na produção de bacterinas e toxóides, foi possível e está sendo realizado, através de manipulações genéticas a nível molecular, o desenvolvimento de vacinas de subunidades, carregando diferentes epítomos de diferentes microrganismos patogênicos. Dessa maneira, são evitados efeitos tóxicos indesejáveis, frequentemente observados na administração de vacinas vivas atenuadas ou mortas (bacterinas).

Com relação a infecções bacterianas, amostras de *Escherichia coli*, além de serem constituintes normais do sistema digestivo, estão frequentemente associadas a infecções intestinais e extra-intestinais. Dentre estas, o grupo das *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) é considerado o maior causador de diarreia infantil em países subdesenvolvidos. Estima-se que nestas áreas 775.000 crianças morrem a cada ano como consequência destas infecções (ROBBINS & FREEMAN, 1988).

Grandes prejuízos na criação de animais como bovinos, suínos e ovinos são decorrentes de infecções por amostras de ETEC. Altos índices de mortalidade de animais recém nascidos são verificados e, os animais coalescentes destas infecções exibem grande perda de peso.

A utilização de antibióticos e a melhoria das condições sanitárias, nem sempre são possíveis de serem empregadas no combate a essas infecções e, em muitos casos, não são efetivas no seu controle.

Desta forma, o desenvolvimento de vacinas que visem o controle efetivo desta moléstia são necessários, e o emprego de técnicas de Engenharia Genética foram e estão sendo utilizadas com esse intuito.

Uma promissora linha de pesquisa, no desenvolvimento de vacinas contra ETEC e também outros microrganismos, é a utilização da subunidade B da toxina LT de *E. coli* como proteína carreadora de epítomos antigênicos. Esta linha de pesquisa foi utilizada por SCHÖDEL & WILL (1990), onde a porção carboxi-terminal de LT<sub>B</sub> foi ligada à epítomos antigênicos do núcleo capsídeo do vírus da hepatite B. Semelhante técnica foi utilizada por CLEMENTS (1990) na construção de um gene híbrido LT<sub>B</sub>-ST, no desenvolvimento de uma vacina potencial contra infecções por amostras de ETEC.

Assim sendo, este trabalho teve como objetivo a construção e expressão, por técnicas de Engenharia Genética, de um gene correspondente a subunidade B de LT, para ser utilizado como proteína carreadora de diferentes epítomos antigênicos, possibilitando o desenvolvimento de vacinas contra diferentes microrganismos patogênicos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em 1885, o médico alemão T. Escherich isolou do trato intestinal de crianças saudáveis um bacilo que, mais tarde, se tornaria um dos organismos mais estudados, conhecidos e utilizados pela ciência moderna (NEIDHARDT, 1990). A bactéria gram negativa *Escherichia coli*, nome dado, mais tarde, em homenagem a seu descobridor, pertence à família *Enterobacteriaceae* e é o anaeróbico facultativo mais abundante da microbiota intestinal normal de mamíferos e aves, desempenhando um importante papel na manutenção e fisiologia do mesmo (DRASAR & HILL, 1974).

Atualmente, esse microrganismo é um dos mais utilizados em experimentos científicos, principalmente na área da genética, em virtude principalmente do alto grau de conhecimentos adquiridos, com relação a sua estrutura química, sua fisiologia e genética e das facilidades encontradas para manutenção e manipulação do mesmo em laboratório (NEIDHARDT, 1990). Desta forma, por exemplo, *E. coli* é o microrganismo hospedeiro de maior uso, até o momento, para a amplificação e expressão de genes quiméricos construídos por técnicas de engenharia genética.

Com relação à patogenicidade, *E. coli* era tido até o final do século passado como um microrganismo essencialmente não patogênico. Em 1897, Lesage (Apud GONZALEZ & BLANCO, 1977) levantou as primeiras evidências que apontavam esse microrganismo como um agente patogênico.

Em 1940 uma epidemia de diarreia em crianças recém-nascidas representou um importante problema clínico na Europa e na América do Norte. As primeiras análises para detecção e implicação de *Shigella* e *Salmonella*, agentes reconhecidamente patogênicos na

época, falharam e, mais uma vez *E. coli* foi novamente reconhecido como o agente patogênico (BRAY, 1945; BRAY & BEAVAN, 1948 Apud: LEVINE, 1987).

Uma série de investigações posteriores foram realizadas e, em 1950, um grande número de linhagens de *E. coli* foram implicadas como agentes causadores de diarreia infantil e o termo *E. coli* enteropatogênica foi proposto por Neter et al. (1955).

Hoje sabe-se que algumas linhagens de *E. coli* são capazes de causar diferentes doenças em diferentes animais. O que diferencia essas linhagens das não patogênicas é a presença de um ou mais fatores de virulência, que conferem às bactérias que os possuem, a capacidade de causar doença. Dentre os fatores de virulência de *E. coli*, podemos citar desde a produção de adesinas, fímbrias ou fatores de colonização que possibilitam à bactéria aderir e colonizar a mucosa de diferentes tecidos do hospedeiro, até a produção de toxinas, hemolisinas, aerobactinas, enteroquelinas, capacidade de resistência ao soro e outros.

Dessa forma, *E. coli* pode causar infecções intestinais produzindo diarreias agudas em mamíferos, como também infecções extra-intestinais em humanos, tal como cistite, pielonefrite, e doenças respiratórias em aves (LEVINE, 1984)

Antes da descrição dos diferentes grupos de *E. coli* patogênicos, é importante citar o esquema proposto por KAUFFMAN (1940) para diferenciar linhagens distintas desta bactéria com base nos diferentes antígenos lipopolissacarídicos, flagelares e polissacarídicos, conhecidos como antígenos O, H e K respectivamente. Atualmente são conhecidos 171 antígenos O e 56 antígenos H (LEVINE, 1987). Juntos, eles constituem o sistema O:H, que tem desempenhado um importante papel

nos estudos de epidemiologia e patogenicidade de *E. coli*. Este sistema de identificação, entretanto, vem sendo seriamente questionado. Análises eletroforéticas de proteínas de membrana externa (ACHTMAN et al., 1986; ACHTMAN et al., 1983) e enzimas solúveis em água (CAUGHANT et al., 1985; SELANDER et al., 1987) revelaram que muitos sorogrupos, baseados em simples determinantes antigênicos, são geneticamente heterogêneos, e mesmo bactérias com perfis eletroforéticos muito próximos, podem pertencer a diferentes sorotipos, o que vem dando grande suporte ao conceito clonal (ACHTMAN & PLUSCHKE, 1986).

## 2.1. *Escherichia coli* ASSOCIADAS COM INFECÇÕES EXTRA-INTESTINAIS

Dentre as *E. coli* causadoras de infecções extra-intestinais estão englobadas aquelas causadoras de infecções do trato urinário, também conhecido pela sigla UTI do inglês "Urinary Tract Infection" (JOHNSON, 1991) e aquelas causadoras de meningite (LEVINE, 1984).

UTI é a forma mais comum de infecção extra-intestinal causada por *E. coli* e este é o agente causador mais frequente de UTI em humanos. Estima-se que 12% dos homens e de 10 a 20% de mulheres sofrem em pelo menos uma fase da vida, infecção sintomática do trato urinário, sendo que muitos casos podem levar ao óbito. (JOHNSON & STAMM, 1989; LIPSKY, 1989). Amostras de *E. coli* isoladas de casos de UTI podem ser categorizadas de acordo com a severidade do quadro clínico que causam (JOHNSON, 1991). Assim, pielonefrite é classificado como o caso mais grave de UTI, cistite é mais moderado e ainda existe uma terceira categoria englobando bactérias que apresentam um quadro infeccioso



assintomático.

As amostras de *E. coli* uropatogênicas pertencem a sorogrupos específicos, especialmente O1, O2, O4, O6, O7, O8, O18 (GREEN & THOMAS, 1981) e estes estão geralmente associados à capacidade de produção de fímbrias e hemolisinas, o que sugere a ação sinérgica dos diferentes fatores de virulência (JOHNSON, 1991).

As amostras de *E. coli* causadoras de meningites, afetam por sua vez, crianças recém-nascidas numa frequência de 1 em 2000 a 4000 nascimentos. Essas amostras invadem a circulação sistêmica até atingir as meninges, podendo levar à criança a morte. Essas linhagens geralmente pertencem aos sorotipos O1, O7, O18, O75 (LEVINE, 1984).

## 2.2. *Escherichia coli* ASSOCIADAS COM INFECÇÕES EM AVES.

Em aves, a bactéria *E. coli* usualmente infecta o trato respiratório, onde bactérias virulentas atravessam a mucosa, chegam à corrente sangüínea, causando uma variedade de doenças, incluindo colisepticemia, pericardite e aerossaculite (HENSLEY et al., 1967; SOJKA & CARNAGHAM, 1961) podendo levar a ave à morte, causando grandes prejuízos à criação desses animais para fins econômicos.

Muitas amostras associadas com colibacilose de aves domésticas pertencem a um número limitado de sorotipos, sendo os mais comuns O1, O2 e O78 (CLOUD et al., 1986), exibem certos padrões de fermentação de carboidratos (GYMAH & PANIGRAHY, 1988) e expressam adesinas específicas (ARP et al., 1980; NAGARAJA et al., 1983; NAVEH et al., 1983).

### 2.3. *Escherichia coli* ASSOCIADAS COM INFECÇÕES INTESTINAIS

As amostras de *E. coli* enteropatogênicas formam um grupo heterogêneo de organismos que causam infecções intestinais e diarreia por mecanismos diversos. Muitos autores concentraram esforços no sentido de classificar as diferentes classes de *E. coli* enteropatogênicas. Em LEVINE (1987) está descrito o sistema de classificação mais adotado no momento. Este sistema de classificação está baseado nas diferentes propriedades de virulência, diferentes interações com a mucosa intestinal, diferentes síndromes clínicas, diferenças em epidemiologia e distintos sorotipos O:H apresentados por este grupo de *E. coli*. Dessa forma as *E. coli* enteropatogênicas são classificadas em 4 grandes grupos: *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) e *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC). O sistema de classificação descrito em LEVINE (1987) também inclui um quinto grupo, as *E. coli* enteroaderentes (MATHEWSON et al, 1985; MATHEWSON et al, 1986), embora tal grupo necessite de maiores dados para ser definitivamente aceito como tal.

Embora as 5 categorias de *E. coli* patogênicas sejam distintas em muitos aspectos, elas exibem entre si algumas características em comum, tais como: propriedades de virulência cruciais codificadas em plasmídios; interação com a mucosa epitelial característica; produção de citotoxinas ou enterotoxinas; dentro de cada categoria, as linhagens tendem a pertencer a determinados sorotipos O:H.

Segue-se uma breve descrição dos 5 grupos de *E. coli* enteropatogênicos com ênfase ao grupo das *E. coli* enterotoxigênicas.

### 2.3.1. *Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICAS CLÁSSICAS (EPEC)

Alguns estudos apontam esse grupo de *E. coli* como um dos principais causadores de diarreia em crianças recém-nascidas, sendo responsável por um dos quadros clínicos mais severos entre as *E. coli* enteropatogênicas (TOLEDO et al., 1983).

As EPEC não produzem toxinas LT, ST ou proteínas de invasão semelhantes à EIEC e *Shigella* (GOLDSCHMIDT & DUPONT, 1976; GURWITH et al., 1977). Inicialmente, a ausência desses fatores de virulência, em linhagens de EPEC sorotipos clássicos, conhecidas desde 1950, levou muitos autores a concluírem que tais linhagens não eram patogênicas. Segundo esses autores, essas linhagens não seriam as responsáveis pelo quadro diarreico, apresentado pelos hospedeiros de onde foram isoladas, mas sim, outras amostras de *Escherichia coli*, pertencentes a outros grupos reconhecidamente enteropatogênicos, não isolados e identificados naquela ocasião, seriam as responsáveis. A perda de fatores de virulência, sofrida por tais linhagens, durante anos de estoque, desde a época em que foram isoladas, era também uma outra hipótese, levantada alguns autores, para explicar tal fato (ESCHEVERRIA et al., 1976; SACK, 1976). LEVINE e colaboradores (1978) entretanto, demonstraram definitivamente que linhagens sorotipos clássicos de EPEC eram patogênicas por mecanismos outros que os exibidos por ETEC e EIEC, ao observarem a ocorrência de diarreia em voluntários sadios alimentados com *E. coli* sorotipo clássico de EPEC, após estas terem sido estocadas por tempo superior a 7 anos.

POLOTSKY et al. (Apud: LEVINE, 1987) e LEVINE & EDELMAN (1984) descreveram a ultraestrutura da lesão histopatológica, causada por linhagens de EPEC. Esta estrutura envolvia a aderência da

bactéria no enterócito, que por sua vez envolvia a superfície externa da bactéria, formando uma estrutura conhecida como pedestal (LEVINE & EDELMAN, 1984; ULDHEN & ROLLO, 1980; ROTHBAUM et al., 1982). O resultado desta interação é a destruição das microvilosidades intestinais impedindo a normal absorção de fluídos da luz intestinal, ocasionando uma diarreia não absorptiva, independente da atividade de enterotoxinas.

Muitas características das lesões causadas por EPEC se assemelham com os efeitos de certos hormônios sobre as células da mucosa intestinal (MATSUDAIRA & BURGESS, 1982). A atividade desses hormônios, em última instância, leva ao acúmulo de cálcio intracelular e a ativação da proteína fosfolipídica quinase C dependente de cálcio (PKC) que por sua vez atuam sobre o citoesqueleto celular, alterando sua estrutura. Tais alterações foram implicadas com o efluxo de íons intestinais (FONDACARO & HENDERSON, 1985; FONDACARO, 1986). Com bases nestas observações, BADWIN e colaboradores (1990) propuseram que EPEC exerceria sua atividade patogênica alterando, de alguma maneira, a quantidade de cálcio intracelular, ativando PKC e proteínas relacionadas.

Característica marcante das linhagens de EPEC é a capacidade de adesão em células "Hep 2", uma característica não exibida por ETEC, EIEC, EHEC ou linhagens da flora normal (CRAVIOTO et al., 1979). Esta propriedade de adesão em células "Hep 2" foi mais tarde ligada à presença de um plasmídio de 60MDa (BALDINI et al., 1983) e a esse plasmídio foi atribuído o nome EAF do inglês "EPEC Adherence factor".

LEVINE et al. (1985) correlacionaram a presença deste plasmídio com a codificação de uma proteína de 94KDa, e que esta

estaria associada à patogenicidade de EPEC e consequentemente com a adesão em células "Hep 2". Anticorpos dirigidos contra essa proteína não impediram a adesão de linhagens de EPEC em células "Hep 2" (CHART et al., 1988), o que levou à pesquisa de outros componentes da superfície bacteriana, que poderiam também estarem associados à adesão a células Hep 2 e à patogenicidade.

Algumas amostras de EPEC possuem fímbria tipo I, entretanto EPECs isoladas de pacientes com diarreia não exibem, geralmente, hemaglutinação manose sensível (GRAVIOTO et al., 1979; SCOTLAND et al., 1983) e fímbrias no geral não parecem estar envolvidas com a adesão a células Hep 2 (SCOTLAND et al., 1983).

Na tentativa de desenvolver um "probe" para identificar e diferenciar linhagens de EPEC, foi clonado um fragmento correspondente a 1 kilobase do plasmídeo EAF (NATARO et al., 1985). Estudos conduzidos no Chile demonstraram que quando este fragmento era usado como sonda, ocorria a hibridização em 75% das amostras suspeitas de serem EPEC (LEVINE, 1987).

Estudos também conduzidos no Chile demonstraram que o sorotipo do qual pertencia a bactéria era muito importante na determinação da patogenicidade de EPEC (LEVINE, 1987). Assim, na sua grande maioria, *E. coli* EAF<sup>+</sup> não pertencentes a sorotipo de EPEC, não eram patogênicas, o que demonstra a existência de outros fatores de virulência, possivelmente ligados ao sorotipo.

A produção de verotoxina ou também conhecida como "Shiga-Like Toxin" por amostras de EPEC é controversa. MARQUES et al. (1986), CLEARY et al. (1985) e O'BRIEN & HDLMES (1987) reportaram que alguns sorotipos de EPEC produzem verotoxina e que esta teria alguma importância na patogenicidade. LEVINE (1987) no entanto classificou

tais amostras como EHEC.

A grupo das EPEC é subdividido em duas classes: as que possuem o plasmídio EAF e apresentam aderência localizada em células "Hep 2" pertencem à classe I e, os sorotipos de EPEC que não apresentam o plasmídio EAF, não apresentam aderência localizada em células "Hep 2" mas são causadoras de diarreia pertencem à classe II (NATARO et al., 1985).

### 2.3.2. *Escherichia coli* ENTEROHEMORRÁGICAS (EHEC).

As *E. coli* enterohemorrágicas, não produzem toxinas LT e ST, não são invasivas e apresentam quadro clínico diferentes dos exibidos pelos outros grupos de *E. coli* patogênicos (RILEY et al., 1982; WELLS et al., 1983). São responsáveis pela causa de um severo quadro de colite hemorrágica (RILEY et al., 1982) e também são implicadas com doença do sistema urinário em humanos, conhecida como síndrome urêmica hemolítica (KARMALI et al., 1983; GRANSDEN et al., 1986; REMIS et al., 1984). Os estudos iniciais identificaram o sorotipo O157:H7 como o agente causador, um sorotipo ainda não descrito como patogênico na época. Hoje são conhecidos outros sorotipos (LEVINE et al., 1987; BOPP et al., 1987; KARMALI et al., 1985; SMITH et al., 1987).

Linhagens de EHEC são caracterizadas pela presença de um plasmídio de 60 Md e produção de altos níveis de uma citotoxina para células Hela e Vero (O'BRIEN et al., 1983; JOHNSON et al., 1983).

A presença do plasmídio parece estar associada à produção de uma fímbria não hemaglutinante que capacita a bactéria a aderir a

células intestinais Henle 407 e parece estar associada à patogenicidade (KARCH et al., 1987). Este plasmídeo foi utilizado para a construção de um "probe" de DNA para a identificação de EHEC (LEVINE, 1987) e estudos preliminares demonstraram que tal "probe" era altamente específica na identificação de tais amostras (LEVINE, 1987).

O'BRIEN e colaboradores (1983) mostraram inicialmente que a atividade citotóxica poderia ser neutralizada por soro contendo anticorpos anti-toxina produzida por *Shigella dysenteriae* I. Esses mesmos autores propuzeram a designação "Shiga-like Toxin" para tal toxina, embora muitos autores prefiram chamá-la verotoxina. "Shiga-toxin" e "Shiga-like-Toxin" agem igualmente inativando a subunidade ribossomal 60S (O'BRIEN & HOLMES, 1987). A toxina é composta por duas subunidades, A e B, na proporção 5B ligadas a uma A (O'BRIEN & HOLMES, 1987).

Os genes codificadores da toxina estão localizados em bacteriófagos em *E. coli* (SCOTLAND et al., 1983; SMITH et al., 1983; O'BRIEN et al., 1984) mas no cromossomo em *Shigella dysenteriae*. Os genes para as subunidades A e B estão dispostos em uma simples unidade transcricional (O'BRIEN & HOLMES, 1987). Os genes codificadores de "Shiga-Toxin" e "Shiga-like-Toxin" foram sequenciados e comparados (JACKSON et al., 1987). Estes genes diferem em poucos nucleotídeos. As subunidades B maduras não diferem em sequência de aminoácidos, enquanto as subunidades A diferem em apenas 1 dos 293 resíduos.

A "Shiga-like-toxin" (SLT) foi reconhecida como heterogênea. Algumas linhagens de EHEC produzem uma toxina que não é neutralizada por soro anti-"Shiga-Toxin", mas é tóxica para células Vero e Hela, designada SLT-II (STROCKBINE et al., 1986) ou verotoxina II (SCOTLAND et al., 1985) embora as subunidades dessas toxinas sejam

idênticas em tamanho e apresentem estruturas secundárias similares. Outra variante desta toxina foi observada em linhagens de *E. coli* isoladas de porcos com doença do edema (MARQUES et al., 1987; GANNON & GYLES, 1987). Antissoro contra SLT-II neutraliza tal citotoxina, mas esta é tóxica contra células Vero e não contra células Hela (O'BRIEN & HOLMES, 1987).

TZIPORI e colaboradores (1986) demonstraram que EHEC liga-se a enterócitos e destroem as microvilosidades em porcos gnotobióticos, uma lesão semelhante à causada por EPEC, mas se diferenciam destas por proliferarem na lâmina própria e nas crípitas glandulares.

### 2.3.3. *Escherichia coli* ENTEROADERENTES (EAEC).

LEVINE (1987) propôs que as amostras de bactérias designadas como EAEC (MATHEWSON et al., 1985; MATHEWSON et al., 1986) sejam classificadas como um quinto grupo de *E. coli* causadoras de diarreia pelo menos a princípio, até que novos dados sejam gerados para a total inclusão deste grupo, tais como se os fatores determinantes da patogenicidade são codificados em plasmídios ou se as amostras pertencem a um conjunto restrito de sorogrupos.

Estas bactérias apresentam um padrão de aderência a células "Hep 2" claramente distinguível da aderência localizada e difusa apresentada por amostras de EPEC (LEVINE, 1987). Um terceiro tipo de aderência a células "Hep 2", chamado agregativo foi descrito (NATARO et al., 1987) e ligado a presença de plasmídios (VIAL et al., 1987). NATARO e colaboradores (1987), analisando o padrão de aderência a células "Hep 2" de amostras de EAEC, concluíram que tais amostras exibiam o padrão agregativo de adesão e estes mesmos autores propuzeram



a designação *E. coli* enteroaderente-agregativa, já que tal padrão de agregação parece ser característico dessas amostras.

Amostras de EAEC não produzem LT, ST ou elevados níveis de "Shiga-like-toxins", não invadem células epiteliais ou possuem plasmídio EAF, mas foram incriminadas em estudos epidemiológicos (MATHEWSON et al., 1985) e no mínimo uma amostra causou diarreia não sanguinolenta e sem leucócitos (MATHEWSON et al., 1986)

#### 2.3.4. *Escherichia coli* ENTEROINVASIVAS (EIEC)

Este grupo de *E. coli* tem a capacidade, como *Shigella*, de invadir e proliferar em células epiteliais, causando eventual morte celular (DUPONT et al., 1971).

A capacidade de invasão é dependente da presença de proteínas da membrana externa, relacionadas antigenicamente a proteínas da membrana externa de *Shigella* (HALE et al., 1983) sendo, como em *Shigella*, codificadas por plasmídios de alto peso molecular (HARRIS et al., 1982), embora outros fatores de virulência sejam codificados no DNA cromossômico (MAURELLI & SANSONETTI, 1988).

O diagnóstico de EIEC é baseado na identificação do sorotipo ao qual pertence a bactéria suspeita (TOLEDO & TRABULSI, 1983), pela detecção de proteínas de membrana externa associadas com invasão por ELISA (PAL et al., 1985) e com sondas (probes) de DNA dirigidos contra os genes responsáveis pelo fenótipo invasivo (WOOD et al., 1986).

### 2.3.5. *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÊNICAS (ETEC).

Geralmente considerado como o segundo maior grupo de *E. coli* associado com diarreia, depois de EPEC, as amostras de ETEC representam a maior causa de diarreia infantil em países subdesenvolvidos, sendo que alguns estudos sugerem que, nestas áreas, ocorrem por ano, de duas a três infecções de ETEC por criança, durante os primeiros dois ou três anos de vida (BLACK et al., 1982), tendo como conseqüências, em muitos casos, a desidratação, deficiência nutricional e morte (BLACK et al., 1984; ROBBINS & FREEMAN, 1988).

ETEC é também o agente causador mais comum da diarreia do turista (MERSON et al., 1976; SACK et al., 1978; DUPONT et al., 1976).

Amostras de ETEC isoladas de diferentes áreas geográficas, pertencem a um número limitado de sorotipos O:H (ESCHEVERRIA et al., 1982; MERSON et al., 1979; ORSKOV et al., 1976; REIS et al., 1980; LEVINE et al., 1983).

A infecção por ETEC é adquirida pela ingestão de comida ou água contaminadas. Uma vez ingeridas, estas bactérias são capazes de colonizar a porção proximal do intestino delgado, devido à produção de adesinas ou fatores de colonização (HINSON & WILLIAMS, 1989) e, a produção de enterotoxinas termoestável (ST) e/ou termolábil (LT) é responsável pelo quadro diarreico (BETLEY et al., 1986).

### 2.3.5.1. ENTEROTOXINAS PRODUZIDAS POR ETEC

São dois os tipos de enterotoxinas produzidos por ETEC. A enterotoxina termolábil (LT), inativada por aquecimento a 100°C, e a enterotoxina termoestável (ST) que não é inativada por aquecimento a 100°C (SMITH & GYLES, 1970).

A enterotoxina LT é uma proteína imunogênica de alto peso molecular (75.000 a 90.000 daltons) composta por dois tipos de subunidades. Uma subunidade A (LTA) está ligada a 5 subunidades B (LTB) (LEVINE, 1984).

À subunidade A é conferida a capacidade de estimular a adenil ciclase através de sua atividade enzimática ADP-ribosilante (GILL & RICHARDSON, 1980). À subunidade B é conferida a capacidade de ligar a holoenzima à membrana dos enterócitos intestinais, através da interação com gangliosídeo GM1 de superfície e glicoproteínas (HOLMGREN, 1973; HOLMGREN et al., 1982). Uma vez a holotoxina estando ligada, a subunidade A é interiorizada, sofre quebra enzimática em 2 peptídeos, A1 e A2, sendo que a atividade enzimática é conferida pelo peptídeo A1 (SPICER & NOBLE, 1982).

Uma vez ativada a adenil ciclase, ocorre um acúmulo de AMP cíclico, o que irá causar a secreção de fluídos ricos em eletrólitos por parte das células da crípita e decréscimo da absorção por parte das células da base das microvilosidades. O resultado dessa secreção é a origem de um quadro clínico diarreico (LEVINE, 1984).

A enterotoxina LT é muito similar à toxina colérica (CT) em estrutura, atividade e determinantes antigênicos e os genes codificadores das duas toxinas mostram grande homologia (DALLAS & FALKOW, 1980; CLEMENTS et al., 1980; SMITH & SACH, 1973; BETLEY et al.;

1986; YAMAMOTO et al., 1987). Comparando-se as sequências dos genes codificadores da toxina colérica (ctxAB) e da toxina LT (eltAB) observa-se que os cistrons A e B são 75% e 77% homólogos, respectivamente (BETLEY et al., 1986). Em contraste com estes resultados as sequências promotoras entre os dois genes não apresentam homologia significativa (YAMAMOTO et al., 1987). Este fato é devido principalmente à presença de repetições em tandem da sequência "TTTTGAT" que aparece "upstream" do início do gene CTA e não aparece no promotor de LT (YAMAMOTO et al., 1987; TAYLOR, R.K., 1989). Tal sequência apresenta função regulatória, já que, em certas condições, a proteína regulatória toxR reconhece e liga-se a estas sequências. Esta interação aumenta a taxa de transcrição dos genes estruturais da toxina colérica (TAYLOR, R.K., 1989). A proteína reguladora toxR, além de não ser produzida por *E. coli*, não tem nenhum efeito sobre a produção de LT.

Evolutivamente, as toxinas LT e CT parecem ter divergido de uma proteína ancestral comum a aproximadamente 130 milhões de anos atrás, na era mesozóica, sendo que possivelmente, LT tenha se originado de um gene CT ancestral, adquirido por *E. coli*. Tais conclusões são baseadas em comparações entre as sequências de nucleotídeos dos genes das duas toxinas, com relação aos códons mais utilizados pelas duas espécies de bactérias (YAMAMOTO et al., 1987).

Os genes *elta* (LTA) e *eltb* (LTB) formam uma unidade transcricional, estando o promotor próximo ("upstream") ao gene *elta*. Os códons finais do gene *elta* estão sobrepostos aos iniciais do gene *eltb* em 4 pares de base (YAMAMOTO et al., 1987).

A subunidade B é produzida a uma taxa molar cinco vezes maior do que a subunidade A (DALLAS et al., 1976). Como tais genes

estão sobre o controle de um único promotor, a diferença observada na expressão dessas duas proteínas parece estar ligada a uma regulação traducional. De fato, o produto da transcrição desses genes é um mRNA policistrônico, codificando os polipeptídeos A e B, sendo que a cada um destes, está associada uma região de ligação do ribossomo (RBS). Possivelmente o RBS associado ao gene *eltB* é mais eficiente ou a estrutura secundária adquirida por este mRNA favorece a tradução do gene *eltB* (SPICER & NOBLE, 1982; DALLAS et al., 1979).

Os primeiros 21 resíduos de aminoácidos da porção aminoterminal da proteína correspondente à subunidade A e os primeiros 18 da proteína correspondente à subunidade B são peptídeos sinais, importantes para a localização desses polipeptídeos no espaço periplasmático (DALLAS & FALKOW, 1979; DALLAS & FALKOW, 1980; SPICER & NOBLE, 1982; YAMAMOTO et al., 1987). Após seu transporte até o espaço periplasmático, as subunidades A e B são processadas e se ligam para formar a holotoxina (HIRST et al., 1984).

Os genes para LT podem também estar flanqueados por repetições invertidas ou não (YAMAMOTO & YOKOTA, 1981), mas atividade transposicional ainda não foi detectada (BETLEY et al., 1986).

A toxina LT representa um grupo heterogêneo. Duas diferentes formas de LT, designadas LTh (LT humana) e LTp (LT suína) são antigenicamente diferentes (HONDA et al., 1981) e foram encontradas em bactérias isoladas de humanos e suínos respectivamente. Embora imunologicamente distintas, as subunidades B destas duas toxinas diferem em apenas 4 dos 103 resíduos de aminoácidos enquanto que as subunidades A1 diferem em apenas 1 dos 194 resíduos (DYKES et al., 1985; YAMAMOTO et al., 1987). Estas observações explicam as reações cruzadas de anticorpos entre as toxinas LT e entre estas e CT, sendo

que anticorpos contra qualquer uma das três proteínas têm a capacidade de reconhecer e se ligar as outras duas.

Evolutivamente, LTh e LTp parecem ter divergido a menos de 1 milhão de anos atrás, no período quaternário (YAMAMOTO et al., 1987)

Um variante maior de LT foi descrito. Esta toxina, designada LT-II foi isolada de búfalos com diarreia na Tailândia (GREEN et al., 1983). LT-II apresenta atividade biológica semelhante à LT-I (LTh e LTp), mas não é neutralizada por anticorpos anti-LT-I ou anti-CT. LT-II é composto por dois tipos de polipeptídeos, A e B, com pesos moleculares próximos às subunidades de LT-I (HOLMES et al., 1986). A subunidade A desta toxina tem a propriedade de ativar a adenil ciclase, aumentando o nível de AMP cíclico (CHANG et al., 1987) mas a subunidade B não tem a capacidade de ligar-se a gangliosídeo GM1 (HOLMES et al., 1986).

GUTH e colaboradores descreveram dois tipos de LT-II que foram descritos como LT-IIa e LT-IIb.

A nível molecular, LT-I e LT-II apresentam estruturas gênicas semelhantes, onde o promotor está próximo ao gene A e este sobrepõe o gene B, embora a extensão destas sobreposições sejam diferentes entre estas duas toxinas. Ao contrário de LT-I, onde essa sobreposição envolve 4 pares de bases, os genes A e B de LT-II estão sobrepostos em 11 pares de bases. Análises de sequência de nucleotídeos revelou homologia entre as subunidades A de LT-II, LT-I e CT (PICKET et al., 1986, 1987) enquanto nenhuma ou pouca homologia foi encontrada com relação às subunidades B. Diferente dos genes codificadores para LT-I, que estão localizados em plasmídeos, os genes para LT-II estão localizados no cromossomo de *E. coli* (GREENE et al., 1983).

A enterotoxina ST também forma um grupo heterogêneo. Duas

classes maiores, designadas ST-I ou STa e ST-II ou STb foram descritas (WHIPP et al., 1981).

A ST-I é um pequeno polipeptídeo, não imunogênico a não ser que esteja acoplado a uma proteína carreadora, como foi demonstrado por KLEPSTEIN e colaboradores (1982). Esta toxina é solúvel em metanol, ativa no modelo do camundongo recém-nascido e tem a capacidade de ativar a guanil ciclase, levando ao acúmulo intracelular de GMP cíclico (HUGHES et al., 1978). Não está inteiramente claro, ainda, como ST liga-se e entra nos enterócitos e ativa a guanil ciclase (ROBINS & BROWNE, 1980). O GMP cíclico gerado desta maneira, altera a função da membrana dos enterócitos, resultando em secreção de fluídos e consequente diarreia.

A enterotoxina ST-II é metanol insolúvel, ativa em alça ligada de porco mas não no modelo do camundongo recém-nascido e estimula a secreção intestinal por mecanismos ainda desconhecidos, que não envolvem nucleotídeos cíclicos (KENNEDY et al., 1984; WEIKEL et al., 1986). Com relação à sequência de nucleotídeos e aminoácidos, ST-I e ST-II não exibem homologia (LEE et al., 1983).

A enterotoxina ST-I por sua vez, também é dividida em subclasses. Inicialmente dois tipos foram identificados. A STp também chamada ST suína ou ST-Ia, e STh também chamada ST humana ou ST-Ib, produzidas por amostras de *E. coli* isoladas de suínos e humanos, respectivamente (TAKAO et al., 1983). Uma terceira classe foi descrita e designada ST-Ic (MAAS et al., 1985).

Os genes codificadores das toxinas STh (esth) e STp (estp) foram sequenciados e da comparação das sequências obtidas detectou-se divergência em 67 nucleotídeos que, a nível de aminoácidos, representa uma divergência de 31% (MOSELEY et al., 1983; SO & McCARTHY, 1980).

Ambos genes codificam polipeptídeos constituídos por 72 resíduos de aminoácidos apresentando sequências sinais hidrofóbicas. Uma vez no espaço periplasmático esses polipeptídeos sofrem processamento e originam a forma ativa da toxina. ST-I é uma proteína extracelular, mas o mecanismo pelo qual esta proteína é secretada através da membrana externa é desconhecido (BETLEY et al., 1986).

As porções ativas das toxinas STh e STp são constituídas por 19 e 18 resíduos de aminoácidos, respectivamente (FIELD et al., 1978; FRANTZ et al., 1984; GARIEPY & SCHOOLNIK, 1986). Esses polipeptídeos exibem grande homologia entre si, podendo as sequências de aminoácidos serem sobrepostas a partir da região carboxi-terminal, o que revela, além da presença de um resíduo de aminoácido a mais em STh, diferença em quatro outros resíduos. Essas diferenças concentram-se na região aminoterminal ( três resíduos) contra apenas uma na região carboxi-terminal.

A porção carboxi-terminal além de ser mais conservada está também implicada com a atividade biológica dessas toxinas. A enterotoxigenicidade e a capacidade de ligação a receptores foi mapeada nos últimos 13 aminoácidos dessa região (GARIEPY et al., 1986; SHIMONISHI et al., 1987; THOMPSON & GIANELLA, 1985).

Sequências homólogas a região carboxi-terminal de ST-I também foram descritas em enterotoxinas similares produzidas por *Yersinia enterocolitica* e *Vibrio cholerae* não O1 (TAKAO et al., 1985a; TAKAO et al., 1985b). Interessante homologia também foi descrita entre estas toxinas e conotoxina GI e GII, neurotoxinas produzidas por *Conus geographus*, uma espécie de caramujo marinho (GRAY et al., 1981; NISHIUCHI & SAKAKIBARA, 1982).

Baseado em análises dos códons mais usados em *E. coli*



comparados com os códons presentes nos genes codificadores das toxinas ST-I de ETEC, tais genes parecem ter sido adquiridos por *E. coli* em um passado remoto, de genes ancestrais presentes em *V. enterocolitica* e *V. cholerae* não O1 (YAMAMOTO et al., 1987).

Característica marcante da toxina ST-I é a presença de seis resíduos de cisteína que formam três pontes dissulfeto intracadeia, importantes na formação da estrutura secundária da toxina ativa. O padrão de ligações entre os resíduos e a importância de cada uma destas ligações foram elucidadas por GARIÉPY e colaboradores (1987). Segundo esses autores, as três pontes dissulfeto são importantes para a total atividade da toxina.

Como LT, ST é codificada geralmente por genes localizados em plasmídios conjugativos. Plasmídios que codificam ambas as toxinas são relacionados entre si e com os plasmídios F, enquanto plasmídios que codificam apenas ST são heterogêneos (BETLEY et al., 1986).

#### 2.3.5.2. ADESINAS OU FATORES DE COLONIZAÇÃO EM ETEC.

Em conjunto com a produção de enterotoxinas, amostras de ETEC são capazes de produzir adesinas ou fatores de colonização, que capacitam as bactérias que os possuem, a aderir e se multiplicar na mucosa intestinal do hospedeiro, resistindo aos poderosos movimentos peristálticos de limpeza do mesmo (LEVINE, 1984).

Uma classe especial de adesinas composta por filamentos proteicos localizados na superfície da bactéria são chamadas fímbrias (DUGUID et al., 1955; MODI & DEGRAAF, 1985). Essas fímbrias são hospedeiro-específicas e incluem K88 (ORSKOV et al., 1964), 987P (NAGY

et al., 1976), F42 (YANO et al., 1986) e F165 (FAIRBROTHER et al., 1986) presentes em *E. coli* isoladas de suínos; K99 (DRSKOV et al., 1975) e F41 (DEGRAAF & ROORDA, 1982) presentes em amostras de suínos, ovinos e bovinos; CFA/I, CFA/II (EVANS et al., 1975; EVANS & EVANS, 1978), CFA/III (HONDA et al., 1984), CFA/IV (THOMAS et al., 1982) e o fator de colonização proposto PCF0159 (TACKET et al., 1987) associadas com amostras de origem humana.

Em adição à capacidade de ligação com receptores específicos nas células da mucosa intestinal, as fímbrias também conferem às bactérias a capacidade de hemaglutinar eritrócitos de diferentes espécies animais por também reconhecerem receptores presentes nestas células. Esta característica é utilizada para identificar e classificar as diferentes fímbrias.

A expressão da maioria das fímbrias é regulada pela temperatura de crescimento da cultura de bactérias (MOOI & DEGRAAF, 1985). A temperaturas entre 16 e 25°C poucas fímbrias são produzidas enquanto crescimento a 37°C promove a expressão dessas estruturas. Esse efeito tem provavelmente significado evolutivo, uma vez que as fímbrias só se expressam eficientemente se a bactéria estiver no interior do organismo hospedeiro em temperaturas próximas a 37°C, a qual dificilmente é observada no ambiente externo.

Com relação às *E. coli* contendo genes codificadores das fímbrias tipoi e 987P, foi verificado que estas apresentavam alternância na capacidade de expressar as referidas fímbrias e que dentro de uma mesma população bacteriana, apenas algumas bactérias apresentavam-se fimbriadas. Esse efeito está ligado à capacidade de inversão da região promotora, fato que ficou conhecido como variação de fase (HINSON & WILLIAMS, 1989). Esse efeito parece estar ligado a uma

tentativa de escape do sistema imunológico do hospedeiro.

As fímbrias são compostas por várias subunidades proteicas que, uma vez sintetizadas, são transportadas através da membrana interna e da membrana externa de bactérias gram negativas e são montadas em estruturas filamentosas na superfície celular. Geralmente cinco a oito polipeptídeos estão envolvidos na expressão fenotípica das fímbrias de *E. coli* (MOOI et al., 1982; NORGREN et al., 1984; VAN DIË et al., 1984; DEGRAAF et al., 1984; MOOI & DEGRAAF, 1985). Além das subunidades polipeptídicas estruturais das fímbrias, esses operons codificam polipeptídeos localizados no espaço periplasmático que se associam às subunidades estruturais, participando do processamento e transporte dessas subunidades a sítios da membrana externa, onde são exportadas. Outros genes codificam proteínas ligadas à ancoragem da estrutura da fímbria na superfície bacteriana.

Algumas evidências sugerem que as subunidades estruturais das fímbrias, uma vez associadas a proteínas específicas presentes no espaço periplasmático, adquirem uma conformação estrutural apropriada para o transporte através da membrana externa. Essas alterações também parecem associadas com a resistência à digestão proteolítica apresentada por estas subunidades (MOOI & DEGRAAF, 1985). A maioria destes estudos foram realizados com fímbrias K88 e tipo 1.

Até o momento, dois tipos morfológicos distintos de fímbrias são conhecidos (LEVINE, 1984; LEVINE, 1987; MOOI & DEGRAAF, 1985). Um tipo morfológico são representados pelas fímbrias tipo 1, CFAI, CS1, CS2, CS4, CS5, CFAIII, F42, F165 e PCF0159. São filamentos proteicos rígidos com diâmetro de aproximadamente 7 nanômetros (nm) apresentando cavidade axial. O segundo tipo morfológico é representado pelas fímbrias K88, K99, F41, CS3 e CS6 e consistem em apêndices finos

e flexíveis com diâmetro entre 2 e 5nm, chamadas fibrilas ou fímbrias fibrilares.

Fímbrias e fibrilas podem ocorrer dentro de uma mesma linhagem bacteriana e estarem presentes simultaneamente em uma mesma célula bacteriana (LEVINE, 1984).

As fímbrias de ETEC formam um grupo funcionalmente e estruturalmente relacionado que podem ter evoluído a partir de genes ancestrais comuns (MOOI & DEGRAAF, 1985). A estrutura primária das subunidades estruturais de algumas fímbrias foram parcialmente ou totalmente resolvidas. Muitas delas apresentam grande conservação na sequência de aminoácidos da região carboxiterminal e, em menor extensão, na região aminoterminal. Estas regiões estão provavelmente envolvidas com funções comuns a este grupo de proteínas tais como, transporte através da membrana externa, ancoragem, ligação entre as subunidades e manutenção da estrutura. As porções centrais são mais variáveis e provavelmente estão associadas ao reconhecimento de diferentes receptores ou podem ter, simplesmente, divergido em resposta a pressões imunológicas, por causa da menor importância funcional e estrutural atribuída a estas regiões. A presença de porções hidrofóbicas nas regiões C-terminal é um forte indício da participação destas regiões nas ligações entre as subunidades estruturais.

Existem evidências de que algumas fímbrias de *E. coli* uropatogênicas ligam-se aos receptores P através de adesinas distintas das subunidades estruturais da fímbria (NORGREN et al., 1984). É possível que em alguns casos as subunidades da fímbria tenham apenas papel estrutural, expondo moléculas de adesinas a alguma distância da superfície celular, facilitando a interação destas com receptores celulares (MOOI & DEGRAAF, 1985).

Os genes envolvidos na produção de fímbrias em ETEC residem geralmente em plasmídios, o que tem facilitado seus estudos.

Os genes codificadores da fímbria K99 estão localizados em plasmídios conjugativos de aproximadamente 75 kilobases (kb) (ORSKOV et al., 1975). Esses genes foram clonados verificando-se que o operon continha 8 genes estruturais, 7 dos quais pareciam envolvidos na biossíntese da fímbria (VAN EMBDEN et al., 1980). Todos esses genes apresentam peptídeo sinal na extremidade N-terminal.

O operon K99 contém uma pequena região intracistrônica, apresentando díade de simetria, entre o gene estrutural da subunidade da fímbria e o gene codificador da proteína de 76 kilodaltons (p76), provavelmente ligada ao transporte da subunidade para o meio externo (ROOSENDAAL et al., 1984). Uma estrutura em "hairpin" pode ser formada nesta região do mRNA, o que poderia desempenhar função de terminador rho dependente, introduzindo polaridade no operon K99. Esta região também parece estar envolvida na regulação dependente da temperatura de crescimento, já que o códon de iniciação do gene para p76 está localizado dentro do "hairpin". A explicação para o efeito é que a baixas temperaturas o "hairpin" estaria estabilizado e desta forma inibiria o início da tradução do mRNA para p76. O contrário é verificado em temperaturas próximas a 37°C.

Os genes codificadores da fímbria K88 residem em plasmídios que frequentemente também codificam para a capacidade de utilização da rafinose (MOOI et al., 1979).

Três variantes de K88 (K88ab, K88ac e K88ad) que podem ser sorologicamente distinguidos foram descritos (ORSKOV et AL., 1964; GUINEE & JANSEN, 1979). Os determinantes genéticos de K88ab e K88ac foram clonados (MOOI et al., 1979; SHIPLEY et al., 1981). A diferença

mais significativa entre esses dois determinantes está no gene codificador da subunidade polipeptídica estrutural da fímbria.

Seis genes estruturais foram localizados na sequência de DNA K88ab clonada no plasmídeo recombinante pFM205, cinco dos quais estão localizados dentro de uma simples unidade transcricional (MOOI et al., 1981). Dois diferentes genes estruturais para subunidades da fímbria foram encontrados no operon de K88ab (MOOI et al., 1982; MOOI et al., 1984). A subunidade maior com 26kD constitui o componente principal, enquanto que a subunidade da fímbria com peso molecular de 17.6kD representa o componente menor da subunidade, sendo produzido em pequena quantidade.

Como no operon K99, o operon K88ab apresenta na mesma posição relativa, uma região com díade de simetria que também pode estar envolvida com a regulação devido à temperatura. A regulação por temperatura também parece não atuar a nível transcricional, isso porque o promotor natural do operon K88ab não está presente no plasmídeo pFM205 e, mesmo assim, este operon é temperatura regulado (MOOI, 1982).

Como já foi mencionado, tanto a produção de enterotoxinas como a produção de fímbrias são necessárias como fatores de virulência e, a produção desses dois fatores por amostras de ETEC estão associados (GAASTRA & DE GRAAF, 1982). A fímbria K88 pode estar associada à capacidade de produção de LT, ST ou ambas as toxinas. As fímbrias K99, F41, f42 e 987P estão geralmente associadas com a produção de ST. Os genes codificadores dos operons K88, K99 e de enterotoxinas estão localizados geralmente em plasmídios diferentes (BETLEY ET AL., 1986).

Os genes codificadores de fímbrias em amostras humanas de ETEC estão geralmente localizados em plasmídios de 27 a 88 megadaltons (MD). Geralmente estes plasmídios também contém os genes codificadores

de ST e LT.

A primeira fimbria de amostras humanas de ETEC a ser clonada foi CFAI. Genes codificadores de CFA/I estão localizados em dois segmentos de DNA de 8Kb e 2Kb separados por uma sequência de 40Kb (WILLSHAW et al., 1983). Os genes estruturais estão localizados na sequência de 8Kb que codifica cinco outros polipeptídeos (WILLSHAW et al., 1985a). A região de 2Kb codifica três outros polipeptídeos essenciais para a maturação da fimbria. Nenhuma função específica foi, entretanto, atribuída a esses polipeptídeos.

Logo após a sua descoberta, as investigações com relação às características do fator de colonização CFA/II foram muito mais complicadas que as que se procederam com o fator CFA/I. Essas investigações, no entanto, demonstraram que o fator CFA/II é constituído de três tipos de antígenos diferentes, designados CS1, CS2 e CS3 (SMITH et al., 1982; CRAVIOTO et al., 1982). O antígeno CS3 está presente em virtualmente todas as linhagens. Os antígenos CS2 e CS3 entretanto, nunca foram vistos simultaneamente em uma mesma linhagem. SMITH e colaboradores (1983) mais tarde determinaram que um único plasmídeo contém os genes responsáveis pela codificação destes antígenos e que, a determinação de qual ou quais antígenos são expressos está relacionado ao sorotipo e biotipo da *E. coli* hospedeira. Dessa forma, foram encontradas linhagens expressando CS1 e CS3, CS2 e CS3 ou CS3 somente.

Os genes codificadores de CS3 foram clonados e estão ligados a uma região de 4Kb (MANING et al., 1985; BOYLAN et al., 1987; WILLSHAW et al., 1987). A esse pequeno fragmento de DNA foi atribuída a síntese de quatro polipeptídeos de 94, 26, 24 e 15kb (BOYLAN et al., 1987). O peptídeo de 15kb parece ser a subunidade estrutural de CS3

enquanto o de 94kb parece ter função de plataforma de montagem e transporte, semelhante em função aos polipeptídeos de 76kb e 81kb, presentes no operon K99 e K88, respectivamente.

Os genes codificadores de CS1 e de CS2 também foram clonados a partir de sequências adjacentes aos genes para CS3, compreendendo um fragmento de 10kb (WILLSHAW et al., 1987). Como em bactérias selvagens, a expressão desses genes nos diferentes clones obtidos mostrou-se dependente do biotipo e sorotipo da bactéria hospedeira.

Um novo fator de colonização, não reconhecido por anticorpos anti-CFA/I ou CFA/II foi descrito em amostras pertencentes ao sorogrupo O25 e designado CFA/III (HONDA et al., 1984).

O fator de colonização CFA/IV, anteriormente conhecido como PCF8775, como o fator CFA/II, é antigenicamente distinto e constituído de três diferentes antígenos chamados CS4, CS5 e CS6 (THOMAS et al., 1985). Linhagens de *E. coli* expressam CS4 e CS6, CS5 e CS6 ou somente CS6 (MCCONNELL et al., 1985; MCCONNELL et al., 1986; THOMAS et al., 1987).

O fator de colonização PCF0159 foi mais difícil de ser identificado por não apresentar hemaglutinação manose resistente de hemácias. Em 1987, TACKET e colaboradores identificaram em amostras sorotipo O159:H4 de *E. coli* a presença de uma subunidade proteica de 19kd expressa em amostras crescidas a 37°C mas não em amostras crescidas a 18°C. Esta subunidade foi correlacionada à fímbria e os genes codificadores foram localizados em um plasmídeo de 27 megadaltons que também codifica LT e ST, designado pUR5 por Silveira, W.D. (comunicação pessoal).

Parte do operon da fímbria PCF0159 foi recentemente clonado



a partir do plasmídeo pUR5 (SILVEIRA & BROCHI, dados não publicados). Os genes codificadores dessa fímbria estão compreendidos em um fragmento de aproximadamente 4kb, obtido por digestão do plasmídeo pUR5 com a enzima de restrição HindIII.

#### 2.4. DOENÇAS CAUSADAS POR *E. coli* EM SUÍNOS.

Tem sido verificado que amostras de *Escherichia coli* podem causar em suínos, três tipos principais de infecções, a dizer: colibacilose entérica, doença do edema e mastite (WILSON, 1984; NIELSEN, 1984; BERTSCHINGER & POHLENS, 1984).

A doença do edema é causada pela infecção do trato intestinal por certas amostras patogênicas de *E. coli* e caracterizada por progressivo quadro de comprometimento neurológico, envolvendo paralisia das patas, convulsões e coma. A doença do edema afeta suínos recém-nascidos com altas taxas de mortalidade.

Amostras de *E. coli* dos sorogrupos O138, O139 e O141 estão comumente implicados como agentes causadores dessa enfermidade. A produção de uma toxina chamada anteriormente de princípio da doença do edema foi mais tarde identificada como uma variante da "Shiga like toxin II" (MARQUES et al., 1987; O'BRIEN et al., 1987). Os genes responsáveis por esta toxina foram recentemente clonados e sequenciados (WEINSTEIN, 1988).

A mastite é caracterizada pela infecção do tecido mamário de fêmeas de suínos por amostras de *E. coli* e de outros gêneros de bactérias. A taxa de mortalidade de fêmeas infectadas é baixa, mas suínos recém-nascidos sofrem mais com a doença e casos de mortalidade

já foram assinalados.

A colibacilose entérica suína é a causa mais comum de mortalidade de animais recém-nascidos. O agente etiológico mais comum causador dessa enfermidade são amostras de *E. coli* do grupo ETEC. A patogenicidade dessas amostras está ligada à produção de diferentes fatores de virulência, tais como as enterotoxinas ST-I, ST-II e LT e os fatores de colonização K88, K99, 987P, F41, F42 e F165, já descritos anteriormente. A presença desses fatores de virulência confere a essas bactérias a capacidade de colonização do intestino delgado do hospedeiro causando diarreia.

A infecção de suínos por ETEC ocorre geralmente em animais recém-nascidos em pelo menos três períodos diferentes: primeira semana após o nascimento (neonatal imediata), ao redor de três semanas após o nascimento (fase de amamentação) e durante as duas primeiras semanas após o desmame (STEVENS, 1963). As infecções mais severas são aquelas que ocorrem antes e durante o período da amamentação, onde o sistema imunológico ainda não está totalmente desenvolvido estando, o animal, dependente de anticorpos obtidos do colostro e do leite materno. O animal infectado sofre desidratação e perda de peso o que pode, em muitos casos, levar ao óbito.

WILSON (1984) reportou que amostras de *E. coli* eram consideradas como agente etiológico em 48% dos casos de diarreia neonatal em suínos nos Estados Unidos. No Brasil ainda não existem muitos dados disponíveis a esse respeito, mas a incidência parece ser próxima ou mesmo maior que as taxas descritas nos Estados Unidos (PESTANA DE CASTRO, comunicação pessoal). A taxa de mortalidade dos animais infectados, principalmente neonatal, parece ser igualmente alta, estando ao redor de 50%.

A mortalidade aliada à perda de peso dos animais sobreviventes respondem por altos prejuízos econômicos no Brasil (PESTANA DE CASTRO, comunicação pessoal).

As amostras de ETEC patogênicas a suínos pertencem a sorotipos restritos (SOJKA, 1965). GATTI e colaboradores (1985) fizeram o levantamento dos sorotipos e fatores de virulência presentes em amostras extraídas de porcos com diarreia no Brasil e encontraram correlação, em quase todos os casos, com os dados presentes na literatura.

Em virtude da grande incidência da colibacilose entérica suína em nosso meio e dos grandes prejuízos decorrentes dessa enfermidade no Brasil, aliado ao fato que os mecanismos de prevenção e tratamento dessa doença não serem totalmente eficazes, pelo contrário, levam à necessidade de medidas extras de controle, tal como o desenvolvimento de vacinas, que visem além do controle dessa patogenia a minimização dos prejuízos causados por ela. Varias tentativas nesse sentido, em diferentes países, já foram realizadas mas, via de regra, ainda não existem disponíveis no mercado, vacinas eficazes contra ETEC de origem suína, existindo ainda muito a se fazer e pesquisar para definitivamente controlar a incidência desse patógeno nos criadouros de todo o mundo.

## 2.5. VACINAS CONTRA ETEC

A pesquisa e o desenvolvimento de potenciais vacinas bacterianas é dependente, e está intimamente ligada, ao estudo dos mecanismos básicos de patogenicidade e ao estudo dos epítomos

antigênicos importantes e capazes de ativar a resposta imunológica.

No geral, vacinas bacterianas são divididas em dois grupos: bacterinas e toxóides (ISAACSON, 1985). Bacterinas são preparadas da célula toda da bactéria. As células podem permanecer vivas (linhagens atenuadas) ou mortas por tratamentos físicos ou químicos. Toxóides são baseados em componentes celulares derivados de toxinas relevantes. Atualmente, toxóides caem dentro de uma classe emergente de vacinas, chamadas vacinas de subunidades. Este último tipo de vacina é preparado a partir de componentes da bactéria e desta forma, não contém a célula bacteriana em sua integridade.

A grande vantagem do uso de vacinas de subunidades com relação às bacterinas é a eliminação de componentes celulares que não contribuem para a ativação de resposta imunológica e, por vezes, podem ser até tóxicos ao organismo imunizado. Por outro lado, vacinas vivas atenuadas, em alguns casos, parecem ativar mais eficientemente a resposta imunológica.

O advento da tecnologia do DNA recombinante (DNAr) veio revolucionar o campo do desenvolvimento de vacinas. Foi possível o desenvolvimento de linhagens bacterianas atenuadas mais estáveis e seguras. Foi possível, também, o desenvolvimento de vacinas de subunidades carreando diferentes epítopos antigênicos. A partir da tecnologia do DNAr, grande parte dos problemas de expressão e instabilidade gênica de proteínas relevantes na produção de vacinas foram ou estão sendo resolvidos. Dessa maneira, linhagens podem ser desenvolvidas para a produção de vários antígenos simultaneamente, permitindo a simplificação da produção de vacinas ou bacterinas, que podem ser usadas para a imunização contra dois ou mais microrganismos.

No desenvolvimento de vacinas contra infecções causadas por

*Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), o uso de soros de pacientes convalescentes de diarreia causada por esses microrganismos foi importante na determinação dos antígenos relevantes, capazes de ativar resposta imunológica.

De uma maneira geral, proteínas presentes na superfície bacteriana ou toxinas exportadas para o meio externo são antígenos em potenciais, com capacidade de ativar a resposta imunológica. Dentro dessa categoria, podemos então citar as toxinas LT e ST, as diferentes fímbrias e os antígenos O, K e H. Os antígenos somáticos O e os antígenos K são importantes fatores de virulência conferindo resistência sérica a muitas *E. coli* septicêmicas (CROSS et al., 1986). No caso das ETEC entretanto, estas exibem diferentes sorogrupos e sorotipos, o que limita o uso desses antígenos na elaboração de vacinas.

A grande maioria das vacinas contra amostras de ETEC utilizam-se portanto dos fatores de virulência já discutidos ou seja, as enterotoxinas e as fímbrias, comuns entre todas as linhagens de ETEC (LEVINE et al., 1983).

A enterotoxina LT é imunogênica e, quando inoculada em voluntários em experimentos de imunização, tem a capacidade de ativar a resposta imunológica e consequente produção de anticorpos anti-LT, mas a enterotoxina ST, em virtude de seu pequeno tamanho é pobremente imunogênica (FRANTZ & ROBERTSON, 1981). Esta toxina pode, no entanto adquirir capacidade imunogênica quando acoplada a proteínas carreadoras (GIANNELA et al., 1981; KAUFFMAN, 1981). Ambas as toxinas podem e são utilizadas no desenvolvimento de vacinas.

As fímbrias de ETEC são poderosos imunogênicos e estão sendo usadas há tempos no desenvolvimento de vacinas (LEVINE et al.,

1983). Anticorpos anti-fímbrias podem influenciar ou mesmo impedir a colonização do intestino delgado por estas bactérias, protegendo organismos imunizados das infecções por ETEC.

#### 2.5.1. VACINAS BASEADAS EM ANTÍGENOS FIMBRIANOS

Os suínos recém-nascidos, por não apresentarem o sistema imunológico totalmente formado, são dependentes de anticorpos adquiridos do colostro e leite materno. A administração parenteral de fímbrias purificadas ou bacterinas, preparadas a partir de linhagens de ETEC, a fêmeas de suínos grávidas, induzem a produção de anticorpos encontrados tanto a nível de soro como no colostro e leite materno. Suínos recém-nascidos que por sua vez se alimentam do colostro e leite dessas fêmeas, ingerem esses anticorpos e exibem moderada proteção contra infecções causadas por ETEC (ISAACSON, 1985; MORGAN et al., 1978; NAGY et al., 1978; ACRES et al., 1979)). Essa imunidade no entanto não é capaz de proteger o animal de forma eficaz (PORTER et al., 1974).

A imunização via oral na grande maioria dos casos têm demonstrado maior eficácia que a imunização parenteral na proteção contra enterobactérias, provavelmente por que imunização via oral ativa o sistema imunológico intestinal e conseqüentemente a produção de imunoglobulina IgA. PORTER e colaboradores (1974) reportaram proteção moderada em suínos imunizados via oral com bactérias mortas porém, os resultados mais promissores vieram da utilização de bactérias vivas atenuadas (MOON, 1981; MOON et al., 1988; FRANCIS & WILLGOHS, 1991). Nesses experimentos a imunidade não só foi mais ativa e eficaz como

também, mais prolongada.

Essas linhagens atenuadas consistem em células de *E. coli* expressando fímbrias tais como K88, K99 e 987P, capazes de colonizar a mucosa intestinal do hospedeiro, ativando mais eficientemente uma resposta imunológica, sem contudo causar doenças. Fêmeas de suínos imunizadas com linhagens atenuadas exibem imunoglobulinas IgA e IgM no colostro e leite materno e imunoglobulinas IgG no soro sanguíneo, todas dirigidas contra os antígenos fimbriários expressos pelas linhagens atenuadas (MOON et al., 1988; MOON, 1981).

Em humanos, EVANS e colaboradores utilizaram as fímbrias CFA/I e CFA/II purificadas como antígenos orais. Estes foram, no entanto, pobremente imunogênicos, aparentemente devido ao efeito deletério dos ácidos gástricos.

E1392-75-2A é uma linhagem de *E. coli* que espontaneamente perdeu a capacidade de produção de LT e ST mas reteve a capacidade de expressar os antígenos fimbriários CS1 e CS3. Quando inoculada via oral a um grupo de voluntários, essa linhagem não só colonizou o intestino delgado como também induziu a produção de anticorpos compostos principalmente por imunoglobulina secretória IgA (SIgA) anti CS1 e CS3 (LEVINE et al., 1986). Um grupo de voluntários imunizados foi desafiado por linhagem de ETEC virulenta, de sorotipo distinto, expressando CS1, CS3, LT e ST. Em contraste com o grupo controle, onde todas as seis pessoas inoculadas mas não vacinadas exibiram diarreia, somente três de doze indivíduos vacinados exibiram diarreia. A proteção exibida pelo grupo vacinado foi ligada a SIgA anti CS1 e CS3 e vieram reforçar a importância de anticorpos anti-fímbrias na imunização contra ETEC tanto em humanos como em animais.

A imunização passiva também vem sendo utilizada. Em um

desses experimentos bovinos foram vacinados com diferentes linhagens, expressando as principais fimbrias e toxinas de ETEC e, imunoglobulinas concentradas do leite de animais imunizados foi capaz de proteger indivíduos quando desafiados com linhagens virulentas de ETEC (TACKET et al., 1988).

As subunidades constituintes da estrutura fimbriana vem sendo explorada em sua capacidade de expressar e carrear epítomos antigênicos de diferentes fontes sem contudo, impedir sua montagem. Em um desses experimentos, em regiões variáveis dentro do gene estrutural da fimbria tipo I, foram clonadas sequências gênicas conduzindo epítomos antigênicos do vírus da hepatite B, do antígeno C3 do vírus da pólio tipo 1 e do núcleo capsídeo do vírus da "foot and mouth disease" (FMDV) (KLEMM & HEDEGAARD, 1990). Em muitos dos experimentos a fimbria foi expressa na superfície bacteriana, reconhecida por anticorpos anti-fimbria tipo I e por anticorpos dirigidos contra os antígenos carregados por ela. Esses experimentos sem sombra de dúvidas abrem um novo campo de atuação e pesquisa no desenvolvimento de vacinas bacterianas.

#### 2.5.2. VACINAS ANTI-TOXINAS DE ETEC

O papel da imunidade gerada por anticorpos anti-LT na proteção contra infecções por ETEC é, ainda, controverso. É fato inegável que a enterotoxina LT é imunogênica e após infecções por ETEC, altos níveis de anticorpos anti-LT são gerados (LEVINE et al., 1983).

LEVINE e colaboradores (1979) e LEVINE (1988) obtiveram, em humanos, indicação que anticorpos anti-LT e anti-CT respectivamente,



não eram capazes por si só, de proteger indivíduos, previamente vacinados e exibindo altos níveis de anticorpos anti-LT e CT, contra diarreia causada por linhagens de ETEC expressando LT somente ou LT e ST, em experimentos desafio.

FRANCIS & WILLGODS (1991) também obtiveram resultados similares, utilizando imunização via oral de suínos. Neste experimento, linhagens de *E. coli* expressando LT<sub>B</sub> e K88 ou K88 somente, conferiram proteção a suínos recém-nascidos enquanto que imunização com mesma linhagem, expressando somente LT<sub>B</sub>, não ofereceu proteção. No entanto, suínos imunizados com as linhagens expressando LT<sub>B</sub> e K88 exibiram proteção mais eficaz que aqueles imunizados com a linhagem expressando K88 somente, sugerindo importante papel da antitoxidade nessa proteção.

CLEMENTS e colaboradores (1988) também reportaram que indivíduos vacinados e produzindo anticorpos anti-CT<sub>B</sub>, demonstraram moderada proteção contra diarreia devido a linhagens de ETEC capazes de produzir LT e ST ou somente LT.

Como já discutido anteriormente, as enterotoxinas CT, LT<sub>H</sub> e LT<sub>P</sub> são similares em estrutura e antigenicidade. Entre estas, existem epítomos comuns, capazes de promover reação imunológica cruzada contra diferentes organismos infectantes. As enterotoxinas LT<sub>H</sub> e LT<sub>P</sub> parecem ser antigenicamente estáveis (KLIPSTEIN et al., 1983), o que reforça seu uso como antígenos imunizadores. JACOB e colaboradores (1986) por exemplo, demonstraram que peptídeo sintético da subunidade B da toxina colérica apresenta reação cruzada com LT<sub>BH</sub> e LT<sub>BP</sub>. De todas estas observações, fica claro que imunidade anti-LT é importante no "design" de potenciais vacinas contra ETEC.

Fímbrias de ETEC, em contra partida, não exibem estabilidade, elas são antigenicamente diversas entre linhagens humanas

e animais, não estão presentes em todas as linhagens de ETEC. Este fato pode ser decorrente da presença de novos e desconhecidos fatores de colonização e, em alguns casos, mudanças na prevalência desses antígenos tem sido verificada em experimentos de vacinação. Desta forma, imunização com estes antígenos somente, não conferem proteção contra linhagens exibindo fímbrias e fatores de colonização heterólogos.

Para facilitar os estudos moleculares da enterotoxina LT e suas variantes, o operon de LTh foi clonado e caracterizado molecularmente (YAMAMOTO & YOKOTA, 1981; YAMAMOTO et al., 1981) como também o operon de LTp (SQ et al., 1978; DALLAS et al., 1979). Estes experimentos também abriram a possibilidade da construção de linhagens de *E. coli* produzindo somente LT<sub>B</sub> ou apresentando mutações do gene *eltA*. Tais linhagens seriam não tóxicas, mas capazes de induzir anticorpos anti-LT, à semelhança do que foi feito com linhagens atenuadas de *Vibrio cholerae* (KAPER et al., 1984).

CLEMENTS et al. (1983) e SANCHES et al. (1982) clonaram os genes correspondentes às subunidades B de LTh e LTp, respectivamente, e sugeriram o uso destas linhagens como vacinas. A construção de plasmídios conjugativos com potencial uso como vacina contra ETEC, contendo mutações no gene *eltA*, mas expressando eficientemente o gene *eltB*, foram construídos (CHEN et al., 1985). Em outro experimento, ficou determinado que linhagens vivas de *E. coli* expressando somente LT<sub>B</sub> conferem moderada proteção contra diferentes linhagens heterólogas de ETEC expressando LT (SACK et al., 1988).

A enterotoxina termo-estável (ST), como já discutido anteriormente, é não imunogênica, a não ser que esteja acoplada a uma proteína carreadora. KLEPSTEIN e col. (1981) reportaram que camundongos

imunizados com preparações semi-purificadas de ST acoplada à imunoglobulina G (IgG) de suíno, produziam anticorpos anti-ST e exibiam proteção contra linhagens de ETEC expressando ST. Estes mesmos autores em 1982 reportaram resultados similares utilizando peptídeo sintético oriundo do acoplamento, por reação de carbodiimida, das toxinas LT e ST. Neste último caso, camundongos imunizados tornavam-se resistentes a linhagens heterólogas de ETEC produzindo LT e ST ou, LT ou ST somente.

Após estes promissores resultados com relação à utilização de proteínas híbridas como agentes imunizadores, uma série de experimentos foram conduzidos, tendo como objetivo a construção, por manipulações genéticas, de genes híbridos expressando as toxinas LT e ST ou entre ST e a subunidade B da toxina colérica. Desta forma, uma sequência de nucleotídeos relacionada a um decapeptídeo da toxina STh foi ligado à extremidade aminoterminal de CT<sub>B</sub> (SANCHES et al., 1988). Este peptídeo não exibiu toxicidade, retinha a capacidade de ligação com gangliosídeo GM1 e foi reconhecido por anticorpos anti-CT<sub>B</sub> e ST. Esses investigadores não demonstraram entretanto se esses anticorpos anti-ST eram capazes de neutralizar a atividade biológica de ST.

A ligação do gene STI à extremidade carboxiterminal do gene elta (LTA) foi reportada (SANCHES et al., 1986). Esse gene codificava um polipeptídeo que formava oligômero com LT<sub>B</sub> e este, por sua vez, teve a capacidade de se ligar a gangliosídeo GM1. Esse polipeptídeo híbrido reagiu com anticorpos anti-LTA, LT<sub>B</sub> e ST, mas nenhuma indicação de imunogenicidade ou toxicidade foi demonstrada.

GUZMAN-VERDUZCO & KUPERSZTOCH (1987) construíram gene híbrido onde a extremidade 3' de ST foi acoplada a extremidade 5' de

LT<sub>B</sub>. O peptídeo híbrido resultante reagiu com anticorpos anti-LT<sub>B</sub>, como demonstrado em "western blots", mas nenhuma reação com anticorpos contra ST foi mencionada e, além disso, o peptídeo exibiu toxicidade residual, devido ao componente ST, o que reduziu seu potencial uso no "design" de vacinas.

O trabalho mais completo descrevendo a construção de um gene híbrido com potencial uso no "design" de vacinas foi reportado. Neste trabalho, o terminal 5' do gene ST<sub>h</sub> foi ligado ao terminal 3' do gene LT<sub>Bh</sub> (CLEMENTS, 1990). O gene ST foi construído sinteticamente com os sítios de restrição apropriados para permitir inserção em "frame". O peptídeo LT<sub>B</sub>-ST após purificado demonstrou ser não tóxico mas imunogênico. Animais imunizados produziram anticorpos contra ambos os componentes do polipeptídeo e tais anticorpos foram capazes de neutralizar a atividade biológica de ST.

A subunidade B da toxina LT, além de servir como proteína carreadora para ST e ter importante função na imunização de homens e animais contra infecções por ETEC, tem em suas características um interessante uso como adjuvante na imunização de diferentes animais contra diferentes antígenos. Epítopos antigênicos das mais variadas origens, uma vez acoplados à extremidade carboxiterminal do gene LT<sub>B</sub>, podem ser administrados por via oral e anticorpos anti-LT<sub>B</sub> e anti-epítopos acoplados podem ser produzidos eficientemente (HOLMGREN, 1991). Essa característica de LT<sub>B</sub> reside no fato desta subunidade reconhecer e se ligar a receptores presentes nas células da mucosa intestinal e, assim atuando, poderem ativar resposta imunológica mais efetiva contra LT-B e epítopos carreados por ela incluindo a ativação da produção de imunoglobulina secretória IgA (SIgA).

À extremidade carboxiterminal do gene LT<sub>B</sub> já foram

acoplados além de ST genes correspondentes a proteínas do nucleocapsídeo do vírus da hepatite tipo B e do hepadna vírus (SCHÖDEL & WILL, 1989; SCHÖDEL & WILL, 1990). Linhagens atenuadas de *Salmonella* carregando esses polipeptídeos híbridos, quando administradas por via oral a camundongos, foram capazes de ativar produção de IgG sérica anti-nucleocapsídeo do vírus da hepatite tipo B após simples ou múltiplas doses dependendo da linhagem carreadora utilizada.

Por sua similaridade com LT, a subunidade B de CT foi ligada a antígeno de estreptococos (CZERKINSKY et al., 1989). A administração via oral desse polipeptídeo induziu a produção de IgG e IgA mucosas e extra-mucosas em simples doses. Este trabalho consistiu na primeira vacina de uso potencial contra cárie.

A lógica e a importância da imunização via oral e da ativação do sistema imunológico associado às mucosas é que esse sistema parece, como argumenta JAN HOLMGREN (1991), ser único, e respostas a nível de mucosa intestinal parecem ativar respostas similares, contra os mesmos antígenos, nas mais remotas regiões das mucosas respiratórias e urogenitais, além de ativarem produção sérica de IgG. Assim, vacinas orais contra infecções urogenitais e respiratórias parecem plausíveis e LT<sub>B</sub> como CT<sub>B</sub> possivelmente desempenharam e desempenharão importante papel nessa linha de pesquisa.

### 2.5.3. ASSOCIAÇÃO ENTRE ANTÍGENOS TOXÓIDES E FIMBRIANOS

Vacinas efetivas contra ETEC devem conter antígenos apropriados com a capacidade de estimular simultaneamente anticorpos anti-bactérias e anti-toxinas, evocando um efeito protetivo sinérgico. Desta maneira, o desenvolvimento de linhagens atenuadas

carregando tanto antígenos de toxinas como antígenos fimbrianos são de extrema importância.

Em um desses trabalhos, FRANCIS & WILLGOHS (1991) como já discutido, desenvolveram linhagem de *E. coli* expressando K88 e LT<sub>B</sub> e imunizaram suínos com tal linhagem.

A construção de genes híbridos LT-ST não tóxicos abre a possibilidade desses serem transferidos para linhagens atenuadas que expressem diferentes fatores de colonização ou epítomos destes e o conseqüente desenvolvimento de vacinas vivas capazes de induzirem a produção de anticorpos contra os principais fatores de virulência de ETEC. Outra possibilidade ainda é a introdução de genes codificando tais fatores em linhagens atenuadas de *Salmonella* e o conseqüente desenvolvimento de vacinas multifuncionais contra ETEC e salmonelose.

#### 2.5.4. USO DE LINHAGENS ATENUADAS DE *Salmonella* COMO CARREADORAS DE ANTÍGENOS PARA IMUNIZAÇÃO

*Salmonella* é uma enterobactéria que tem a propriedade de ligar-se a células intestinais, invadir e persistir no tecido linfóide associado ao intestino (GALT) como porta de entrada a tecidos mais internos (CARTER & COLLINS, 1974). Uma série de linhagens atenuadas de *Salmonella* vem sendo descritas. Essas linhagens são não virulentas mas retem a capacidade de invadir e persistir no GALT. A importância dessas linhagens é que além de representarem bons agentes imunizadores contra salmoneloses podem carrear diferentes antígenos, entre eles fímbrias e toxinas de ETEC, que ao alcançarem o GALT, ativam uma generalizada resposta secretória imunológica, o que leva a produção de

imunoglobulina secretória A (SIgA) contra o antígeno particular a todas as glândulas secretórias e secreções de todas as superfícies mucosas do organismo (HOLMGREN, 1991). Em adição, antígenos apresentados ao GALT ativam resposta imunológica celular e humoral (CURTISS et al., 1989).

A primeira linhagem atenuada de *Salmonella* foi reportada por GERMANIER & FURER (1975). Esses autores mutagenizaram linhagem de *S. typhi* Ty2 com nitroso guanidina e isolaram um mutante que não apresentava atividade do produto do gene *galE*, ou seja, a enzima UDP-glucose-4-epimerase que está envolvida na isomerização da UDP-galactose a UDP-glicose. Essa linhagem chamada Ty21a, por captação de galactose produz lipopolissacarides (LPS) e é imunogênica mas o acúmulo decorrente de galactose-1-fosfato e UDP-galactose no meio intracelular culmina em bacteriolise e a conseqüente perda de virulência. Esses mesmos autores propuzeram, de forma correta, o uso desta linhagem como vacina viva atenuada contra febre tifóide.

LEVINE e col. (1987) demonstraram que a linhagem Ty21a é segura e eficaz na imunização. Neste trabalho, crianças vacinadas não adquiriram febre tifóide e apresentaram índice de proteção contra a doença de 63% após 72 semanas da vacinação.

Mutantes *galE* de *S. typhi* Ty21a foram e vem sendo utilizados como carreadores de antígenos por uma série de autores. CLEMENTS & EL-MORSHIDY (1984) transformaram *S. typhi* Ty21a com plasmídio recombinante expressando a não tóxica subunidade B da toxina LT de *E. coli* e determinaram que a linhagem obtida produzia LT<sub>B</sub> eficientemente, imunologicamente e estruturalmente indistingüível de LT<sub>B</sub> produzida por ETEC. Através de testes em camundongos e suínos, esses autores demonstraram que tal linhagem, SE12, é avirulenta, segura e capaz de ativar significativa produção de anticorpos anti-toxina.

Esses autores ainda propõem a utilização dessa linhagem como vacina contra febre tifóide, cólera e infecções por ETEC. YAMAMOTO e col. (1985) demonstraram que a linhagem Ty21a também pode eficientemente expressar CFA/I e que tais linhas de pesquisas podem ser exploradas de "design" de vacinas multi-funcionais.

A linhagem Ty21a embora segura e conferidora de proteção apresenta algumas características desfavoráveis. As bases da atenuação desta linhagem não são totalmente determinadas, múltiplas doses são requeridas para se alcançar um nível satisfatório de proteção e o rendimento, em termos de organismos viáveis após manipulações, tais como liofilização e fermentação é baixo. Com relação ao seu uso como carreador de antígenos, esta linhagem é de difícil manipulação genética. Desta forma, a pesquisa e o desenvolvimento de novas linhagens atenuadas foi necessária.

Neste contexto, a limitada faixa de hospedeiros de *S. typhi* tem impedido investigações mais precisas de novas vacinas potenciais. Vacinas baseadas em *S. typhi* podem ser testadas somente em hospedeiros humanos. Muitos dos trabalhos subsequentes envolveram a utilização de outras espécies, como *S. enteritidis* ou *S. typhimurium* que são hábeis em causar infecção sistêmica em camundongos, semelhantes às causadas por *S. typhi* no homem. Os resultados obtidos desta maneira podem, então, ser aplicados à *S. typhi* e resultados semelhantes podem ser esperados.

STEVENSON & MANNING (1984) transformaram linhagem de *S. typhimurium* G30, outra linhagem com mutação no gene *galE*; com o plasmídio pFM205 codificador da fímbria K88. Bacterias transformantes expressaram a fímbria e, quando utilizadas para imunização de camundongos, ativaram eficiente resposta imunológica anti-K88.



HOISETH & STOCKER (1981) demonstraram que mutações nos genes *aro*, que controlam a síntese de aminoácidos aromáticos, formam linhagens de *S. typhimurium* auxotróficas para 2,3-dihidroxibenzoato e ácido para-aminobenzoico e conseqüentemente são avirulentas. Mutantes no gene A desta via (*aroA*) foram utilizados como carreadores de LT-B (CLEMENTS et al., 1986; MASELL et al., 1986) e da fímbria K88 (DOUGAN et al., 1986). Em praticamente todos os casos, os resultados foram semelhantes aos obtidos com a linhagem de *S. typhi* Ty21a.

Uma série de outras mutações também vêm sendo produzidas e estudadas em *S. typhimurium*. As táticas de mutação incluem geralmente deleções que, de uma maneira geral, representam formas mais seguras e difíceis de serem revertidas, o que de nenhuma forma pode ocorrer em linhagens utilizadas como vacinas. Desta forma, mutantes nos genes *cya* e *crp* que codificam AMP cíclico (AMPC) e proteína receptora de AMPC foram produzidos em *S. typhi* e *S. typhimurium* (CURTISS et al., 1987; CURTISS et al., 1988) e tais linhagens aparentemente são seguras e imunogênicas. Duplos mutantes na via dos aminoácidos aromáticos (DOUGAN et al., 1988; MILLER et al., 1989) e mutantes nos genes *phoP* (FIELDS et al., 1989), um gene ligado a sobrevivência da bactéria intracelularmente, e no gene *ompR* (DORMAN et al., 1989), um gene regulatório ligado à regulação osmótica da célula bacteriana, vêm sendo testados e linhagens com mutações em tais genes parecem avirulentas, seguras e imunogênicas.

Um último fator a ser discutido com relação a este tópico está relacionado à estabilidade na manutenção de genes, expressando diferentes antígenos em linhagens atenuadas de *Salmonella*. Plasmídios portando genes heterólogos são fáceis de serem mantidos estáveis nestas linhagens em laboratório mas não em organismos vivos. A utilização de

marcas de resistência a antibióticos é desaconselhada e não resolveria o problema. Atentos para o fato, CURTISS et al. (1990) e HONE et al. (1988) desenvolveram independentemente um sistema de manutenção de plasmídios no primeiro caso, e um sistema de integração cromossômica no segundo caso. Utilizando o sistema de integração cromossômica, HONE et al. (1988) e CLEMENTS & CÁRDENAS (1990) conseguiram estabilizar eficientemente a produção da fímbria K88 e de LT<sub>B</sub> respectivamente.

#### 2.5.5. A SITUAÇÃO ATUAL

Apesar de todos os esforços de diferentes laboratórios e das promissoras linhas de pesquisas na busca de eficientes vacinas contra ETEC, ainda não existem disponíveis no mercado, vacinas eficientes, principalmente contra colibacilose suína. Há, portanto, uma necessidade inegável de se desenvolver tecnologia apropriada para o desenvolvimento de vacinas contra esta enfermidade, principalmente no Brasil, dados os prejuízos causados por ela. Há, no entanto, um caminho longo a ser percorrido.

### 3. MATERIAL

#### 3.1. PLASMÍDIOS E LINHAGENS BACTERIANAS.

Os plasmídios e linhagens bacterianas utilizados neste trabalho estão citados nas tabelas 1 e 2 respectivamente.

TABELA 1-Plasmídios utilizados neste trabalho

PLASMÍDIOS	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	ORIGEM
pEWD2999	LT <sup>+</sup> (Ap <sup>+</sup> )	DALLAS et al., 1979
pUC18	vetor para clonagem (Ap <sup>+</sup> )	VIEIRA & MESSING, 1985
pKK2233	vetor de expressão (Ap <sup>+</sup> )	AMMAN et al., 1983
pSB1	pUC18/LT <sub>B</sub> <sup>+</sup> (Ap <sup>+</sup> )	este trabalho
pSB2	pUC18/LT <sub>B</sub> <sup>+</sup> deletado (Ap <sup>+</sup> )	este trabalho
pSB3	pKK2233/LT <sub>B</sub> <sup>+</sup> (Ap <sup>+</sup> )	este trabalho
pSB4	pKK2233/LT <sub>B</sub> <sup>+</sup> deletado (Ap <sup>+</sup> )	este trabalho

LEGENDA:

Ap<sup>+</sup>: ampicilina resistente

LT: toxina termo-lábil

LT<sub>B</sub>: subunidade B da toxina LT

TABELA 2- Linhagens de *Escherichia coli* utilizadas neste trabalho.

LINHAGENS	GENÓTIPO	ORIGEM
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , endA1, hsdR17 (rk <sup>-</sup> , mk <sup>+</sup> ), supE44, thi1, recA1, gyrA96, relA1	HANAHAN et al., 1983
JM109	recA1, $\Delta$ lacpro, endA1, gyrA96, thi1, hsdR17, supE44, relA1, F' traD36, proAB <sup>+</sup> , lacI <sup>q</sup> , ZAM13	YANISH-PERRON et al., 1985
H10407	linhagem selvagem CFA/I <sup>+</sup> -LT <sup>+</sup> de origem humana	EVANS et al., 1975

LEGENDA:

Ap: ampicilina

CFA/I: fímbria de amostras *E. coli* humanas.

### 3.2. MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES DE USO GERAL

#### 3.2.1. Meio LB (" L-Broth ")

Triptona.....10g  
Extrato de levedura.....5g  
NaCl.....10g

O soluto foi dissolvido em 800ml de água destilada, o pH acertado para 7.2 com solução 10N de NaOH e o volume completado para 1000ml.

#### 3.2.2. Meio LA (sólido)

Ao meio LB acrescentou-se ágar na concentração de 15g por litro.

#### 3.2.3. Meio SOC (SAMBROOK et al., 1989)

Bacto triptona.....20,0g  
Extrato de levedura.....5,0g  
NaCl.....0.5g

Os solutos foram dissolvidos em 800ml de água destilada e 10ml de uma solução de KCl 250mM foram adicionados. O pH foi acertado para 7.0 com solução 10N de NaOH, o volume acertado para 975ml e o meio foi esterilizado por autoclavagem. Antes do uso, adicionaram-se ao meio 5ml de uma solução 2M de MgCl<sub>2</sub> e 20ml de solução de glicose 1M

esterilizadas.

### 3.2.4. Meio CAYE (" Casaminoacids-Yeast Extract ")

Este meio foi preparado segundo Evans et al. (1973).

#### a) Solução de sais de CAYE

MgSO <sub>4</sub> .....	5,0g
FeCl <sub>3</sub> .....	0,5g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1mM.....	100,0ml

A solução foi preparada dissolvendo-se os sais em 80ml de solução 1mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. O volume foi completado para 100ml e a solução esterilizada por filtração em membrana milipore 0.45µm ( Swinek 47nm ) e armazenada em frasco esterilizado a 4°C.

#### b) Meio CAYE base:

Extrato de levedura.....	8,0g
Casaminoacidos.....	20,0g
NaCl.....	2,5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	8,75g
água destilada q.s.p.....	1000,0ml

O pH do meio base foi acertado para 8.2, esterilizado por autoclavagem e resfriado a temperatura próxima a 50°C, quando foi adicionado 1ml de solução de sais de CAYE para cada 1000ml de meio.

### 3.2.5. Solução de NaOH 10N

NaOH.....40g  
água miliQ q.s.p.....100ml

Preparada dissolvendo-se 40 gramas de NaOH em pastilhas em 80ml de água miliQ e o volume acertado para 100ml. A solução foi acondicionada em tubos de plástico à temperatura ambiente e utilizada para acertar pH de meios de cultura e soluções diversas, assim como no preparo de diversas outras.

### 3.2.6. Solução SDS ( dodecil sulfato de sódio ) 10%

SDS.....50g  
água miliQ q.s.p.....500ml

O soluto foi dissolvido em 400ml de água miliQ por aquecimento a 68°C sob constante agitação, o volume completado para 500ml e a solução foi filtrada em Whatmann n°3 e armazenada à temperatura ambiente em frascos hermeticamente fechados.

### 3.2.7. Solução SDS 20%

SDS.....100g  
Água miliQ q.s.p.....500ml

Preparada exatamente como a anterior.

### 3.2.8. Solução tampão Tris.HCl 1M

121.1g de trizma base foram dissolvidos em 800ml de água mili-Q, o pH acertado para 8.0 com HCl fumegante e o volume completado para 1 litro.

### 3.2.9. Solução EDTA 0.5M

186.1g de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) foram dissolvido em 800ml de água mili-Q, o pH acertado para 8.0 com solução 10N de NaOH e o volume completado para 1000ml.

### 3.2.10. Solução de Ribonuclease A

Ribonuclease A.....50mg  
Tampão para RNase.....5ml

A RNase foi dissolvida em tampão apropriado, a solução foi aquecida por 15 minutos a 100°C, deixada esfriar à temperatura ambiente e estocada a -20°C.

### 3.2.11. Tampão de diluição de Ribonuclease A

Tris.HCl pH 7.5.....10mM  
NaCl.....15mM

O Tris e o NaCl foram diluídos de soluções mais concentradas (Tris.Cl 1M e NaCl 5M) para a molaridade desejada, o pH acertado para 7.5 e a solução esterilizada por autoclavagem.



### 3.3. SOLUÇÕES PARA EXTRAÇÃO PLASMIDIAL E ELETROFORESE DE DNA

#### 3.3.1. Solução I (para extrações em pequena escala)

Tris.HCl pH 8.0.....25mM

EDTA pH 8.0.....10mM

Foi preparada diluindo-se 2.5ml e 1ml das soluções de Tris.HCl 1M e EDTA 0.5M respectivamente em 80ml de água, o pH verificado e acertado para 8.0 se necessário com HCl diluído 1:10 e o volume acertado para 100ml.

#### 3.3.2. Solução I (para extrações em grande escala)

Preparada da mesma forma que a anterior a não ser pelo acréscimo de 4.5ml de solução de glicose 20% para cada 100ml resultando em uma concentração final de glicose de 50mM e 2mg de lisozima/ml de solução.

#### 3.3.3. Solução II

NaOH.....0,2N

SDS.....1%

Preparada diluindo-se 2ml e 5ml de soluções de NaOH (10N) e SDS (20%) respectivamente para um volume final de 100ml de água.

### 3.3.4. Solução III

Acetato de sódio pH 4.8.....3M

Preparada dissolvendo-se 24.6 g de acetato de sódio em 60ml de água mili-Q, acertando o pH para 4.8 com ácido acético glacial e completando-de o volume para 100ml.

Para alguns casos onde o DNA seria purificado com fenol, foi utilizada a solução III descrita a seguir:

Acetato de potássio 5M.....60,0ml  
Ácido acético glacial.....11,5ml.  
Água mili-Q.....28,5ml

### 3.3.5. Solução IV

Acetato de sódio 3M.....3,3ml  
Tris.HCl 1M pH 8.0.....5,0ml  
Água miliQ.....100,0ml

A solução foi preparada diluindo-se o acetato de sódio e o tampão Tris.HCl em 80ml de água e o volume completado para 100ml.

### 3.3.6. Solução de ressuspensão 6X

Ficoll 400.....7,5g  
Azul de Bromofenol.....0,125g  
Xileno Cianol FF.....0,125g  
Solução estoque de RNase.....0,5ml  
água miliQ esterilizada.....50,0ml

Os solutos foram dissolvidos por agitação em 40ml de água miliQ esterilizada. Após estes estarem totalmente dissolvidos, 0,5ml de solução estoque de RNase foi adicionada e o volume completado para 50ml com água miliQ esterilizada.

### 3.3.7. Tampão corrida eletroforética Tris-EDTA-Borato 5x concentrado.

Trisma base.....	54,0g
Ácido bórico.....	27,5g
0.5M de EDTA pH 8.0.....	20,0ml
Água miliQ q.s.p.....	1000,0ml.

A quantidade de 54g de trisma base e 27,5g de ácido bórico foram dissolvidos em 800ml de água miliQ, e a quantidade de 20ml de uma solução de EDTA 0,5M foi adicionada. A solução foi agitada por mais um período de 5 minutos, e o volume completado para 1000ml com água miliQ. O pH desta solução não precisa ser acertado.

## 3.4. TAMPÕES E SOLUÇÕES PARA BIOLOGIA MOLECULAR.

### 3.4.1. Tampão para digestão enzimática EB

Tris.HCl.....	100mM
NaCl.....	600mM
Beta mercapto etanol.....	70mM
MgCl2.....	70mM

O pH foi ajustado para 7.5 com HCl diluído 1:10.

3.4.2. Tampão para reações enzimáticas "One Phor All Buffer Plus" de procedência da "Pharmacia LKB Reagentes e Diagnósticos".

#### 3.4.3. Enzimas

Todas as enzimas utilizadas foram de procedência da "Pharmacia LKB Reagentes e Diagnósticos"

#### 3.4.4. Anticorpos

O anticorpo primário anti-CT<sub>8</sub> foi gentilmente cedido pela Dra. Lucila Ricci do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP e o anticorpo anti-LT<sub>8</sub> foi cedido pela Dra. Beatris Gutti do Departamento de Microbiologia da Escola Paulista de Medicina. Ambos foram produzidos por inoculação da toxina purificada em coelho.

O anticorpo secundário utilizado foi o anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase procedente da "Sigma Immuno chemicals".

3.4.5. " Double-Stranded Nested Deletion Kit " de procedência da " Pharmacia LKB Biotechnology " contendo:

- Exonuclease III em solução de glicerol.
- Tampão ExoIII: Solução aquosa contendo Tris.HCl (pH 8.0) e MgCl.
- Nuclease S1 em solução de glicerol.
- Tampão S1: Solução aquosa contendo acetato de potássio (pH 4.6), NaCl, ZnSO<sub>4</sub> e glicerol.
- Solução " stop S1 " : Solução aquosa contendo Tris base e EDTA

- 5X mistura de ligação: T4 DNA a 0.13 unidades/ $\mu$ l em solução de glicerol 50% contendo Tris.HCl (pH 7.6), MgCl<sub>2</sub>, ATP, espermidina e DTT.
- dNTP $\alpha$ S: Solução aquosa contendo dATP $\alpha$ S, dCTP $\alpha$ S, dGTP $\alpha$ S e dTTP $\alpha$ S.
- Fragmento Klenow FPLC purificado em solução de glicerol
- Tampão Klenow 10X: Solução aquosa contendo Tris.HCl (pH 7.5 ), MgCl<sub>2</sub> e DTT.
- NaCl 0.3M em solução aquosa.
- PEG (polietileno glicol) 25% em solução aquosa.
- NaCl/glicogênio: Solução aquosa contendo 0.25M de NaCl e 0.25 $\mu$ g/ $\mu$ l de glicogênio.
- Marcadores DNA: 5 $\mu$ g de DNA  $\lambda$  digerido com HindIII em 13% de glicerol contendo 0.05% de azul de bromofenol e 0.025% de xileno cianol FF.
- DNA controle: 6 $\mu$ g de pBR322 digerido com Sal I e Sph I em Tris.HCl.

3.4.6. " T7 DNA Sequencing Kit " de procedência da " Pharmacia LKB Biotechnology " contendo:

- " A mix-Short & -Long " : ddATP em solução com dATP, dCTP, dGTP e dTTP.
- " C mix-Short & -Long " : ddCTP em solução com dATP, dCTP, dGTP e dTTP.
- " G mix-Short & -Long " : ddGTP em solução com dATP, dCTP, dGTP e dTTP.
- " T mix-Short & -Long " : ddTTP em solução com dATP,

dCTP, dGTP e dTTP.

- T7 DNA Polimerase tamponada em solução de glicerol.
- Tampão de diluição da enzima: solução contendo glicerol, BSA e DTT
- " Universal primer ": 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' em solução aquosa, 0.80  $\mu$ m (4.44  $\mu$ g/ml)
- Tampão de anelamento: solução tamponada contendo MgCl<sub>2</sub> e DTT.
- Mistura de marcação: dCTP, dGTP e dTTP em solução.
- Solução " stop ": solução de formamida deionizada contendo EDTA, xileno cyanol e azul de bromofenol.
- " Control template ": 10  $\mu$ g de M13mp18 simples fita em 50  $\mu$ l de tampão Tris-EDTA.

#### 3.4.7. Revelador e Fixador para Filmes Radiográficos

O Revelador e Fixador utilizados na revelação de filmes de radiografia após exposição de geis de sequenciamento marcados com S<sup>35</sup> foram obtidos da KODAK Materiais fotográficos.

#### 3.4.8. Solução estoque de X-gal (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil- $\beta$ -D galactosídeo).

O X-gal foi dissolvido por agitação em dimetilformamida para uma concentração final de 20mg/ml e estocado em frascos plásticos protegidos da luz a -20°C.

### 3.5. SOLUÇÕES PARA SEQUENCIAMENTO DE DNA

#### 3.5.1. Tampão de Denaturação

NaOH 2M.....1ml

EDTA 0.5M.....4ml

Água miliQ esterilizada q.s.p.....10ml

A 5ml de água miliQ foram adicionados 1ml de solução de NaOH 2M e 4ml de solução de EDTA 0.5M e os componentes misturados por agitação.

#### 3.5.2. Solução para Lavagem do Gel de Sequenciamento (Metanol 10% e Ácido Acético 10%).

Metanol.....100ml

Ácido Acético.....100ml

Água miliQ q.s.p.....1000ml

A 800ml de água miliQ foram adicionados 100ml de metanol e 100ml de ácido acético que foram misturados por agitação.

### 3.6. TAMPÕES E SOLUÇÕES PARA EXTRAÇÃO E ELETROFORESE DE PROTEÍNAS.

#### 3.6.1. Solução de TCA 40% (Ácido Tricloroacético).

Ácido Tricloroacético.....40g

Água miliQ esterilizada q.s.p.....100ml

O TCA foi dissolvido em volume mínimo de água e o volume completado para 100ml. A solução foi armazenada em frasco plástico a 4°C.

### 3.6.2. Tampão Tris.Cl 50mM pH 7.4

Trizma base.....0,6g  
água miliQ.....100,0ml

O trizma foi dissolvido em 80ml de água miliQ o pH acertado para 7.4 com HCl 1N, o volume completado para 100ml e a solução foi esterilizada por autoclavagem.

### 3.6.3. Solução Etanol:Éter etílico (1V/1V).

Etanol P.A.....50ml  
Éter etílico.....50ml

A solução foi homogenizada por agitação e armazenada a -20°C.

### 3.6.4. Solução de Monômero (30% T e 2.7% Cbis)

Acrilamida.....58,4g  
Bis-acrilamida.....1,6g  
Água miliQ esterilizada q.s.p.....200,0ml

A acrilamida e a bis acrilamida foram dissolvidas em 150ml de água e o volume completado para 200ml. A solução foi então



filtrada em papel Whatmann nº3 e armazenada em frasco escuro a 4°C.

3.6.5. Tampão gel de corrida 4X (Tris.HCl 1.5M pH 8.8)

Tris.....36,33g  
Água miliQ esterilizada q.s.p.....200,0ml

O Tris foi dissolvido em 150ml de Água miliQ, o pH acertado para 8.8 com HCl fumegante, filtrada em papel Whatmann nº3 e armazenada a 4°C.

3.6.6. Tampão gel de empacotamento 4X (Tris.HCl 0.5M pH 6.8)

Tris.....3,03g  
Água miliQ q.s.p.....50,0ml.

O Tris foi dissolvido em 45ml de água miliQ, o pH acertado para 6.8 com ácido clorídrico concentrado e o volume completado para 50ml.

3.6.7. Solução catalizadora (Persulfato de amônio 10%)

Persulfato de amônio.....5g  
Água miliQ.....50ml

O persulfato de amônio foi dissolvido em água com agitação. A solução foi filtrada em filtro Whatmann nº3, dividida em alíquotas e armazenada a -20°C.

3.6.8. Tampão de corrida (Tris 0.025M pH8.3, Glicina 0.192M, SDS 0.1%)

Tris.....	12,11g
Glicina.....	57,60g
Sol. SDS 10%.....	40,0ml
Água destilada.....	4000,0ml

Os solutos foram dissolvidos em 3500ml de água destilada e o volume acertado para 4000ml. Não é preciso acertar o pH deste tampão.

### 3.7. SOLUÇÕES DE COLORAÇÃO DE PRATA.

A coloração dos geis de poliacrilamida com prata seguiu metodologia descrita por BLUN et al. ( 1987 ) com modificações.

3.7.1. Fixador (Etanol 50%, Ácido acético 12%, 0.5ml/l de formaldeído a 37%).

Etanol.....	500,0ml
Ácido acético glacial.....	120,0ml
Formaldeído a 37%.....	0,5ml
Água miliQ.....	380,0ml

Os componentes da solução foram misturados com agitação e a solução armazenada em frascos hermeticamente fechados à temperatura ambiente.

### 3.7.2. Solução de Etanol 50%

Etanol.....500ml  
Água miliQ.....500ml

Etanol e água foram misturados com agitação e a solução armazenada em frasco hermeticamente fechado à temperatura ambiente.

### 3.7.3. Solução de Pré-tratamento (Tiosulfato de Sódio 0.02%)

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....0,02g  
Água miliQ.....300,0ml

O soluto foi dissolvido em água miliQ por agitação. Esta solução foi preparada imediatamente antes do uso.

### 3.7.4. Solução de Impregnação (Nitrato de Prata 0.2%, 0.75ml formaldeído a 37%).

$\text{AgNO}_3$ .....0,6g  
Formaldeído a 37%.....0,225ml  
Água miliQ.....300,0ml

Após a prata estar dissolvida em 300ml de água foi adicionado formaldeído. Esta solução foi preparada imediatamente antes do uso.

3.7.5. Solução Reveladora (Carbonato de Sódio 6%, Tiossulfato de Sódio 0.4mg/l, 0.5ml/l de formaldeído a 37%).

Na2CO3.....18g  
Sol. Pré-Tratamento.....6,0ml  
Formaldeído a 37%.....0,15ml  
Água miliQ.....300,0ml

A quantidade de Na2CO3 foi dissolvida em 250ml, a solução de Pré-Tratamento e formaldeído adicionadas e o volume completado para 300ml. Esta solução foi preparada imediatamente antes do uso.

3.7.6. Solução Bloqueio de Revelação ( Metanol 50%, Ácido Acético 12% )

Metanol.....300ml  
Ácido acético.....120ml  
Água miliQ.....380ml

Os componentes foram misturados por agitação e a solução armazenada à temperatura ambiente em frascos hermeticamente fechados.

3.7.7. Solução de Metanol 50%

Metanol.....500ml  
Água miliQ.....500ml

O metanol e a água foram misturados com agitação e a

solução armazenada em frascos hermeticamente fechados à temperatura ambiente.

3.7.8. Solução de preservação I (Metanol 30%).

Metanol.....300ml  
Água miliQ.....700ml

Preparada da mesma maneira que a solução do item anterior.

3.7.9. Solução de Preservação II (Glicerol 3%)

Glicerol.....30ml  
Água destilada.....1000ml

Os componentes foram misturados por agitação e a solução armazenada à temperatura ambiente em frascos hermeticamente fechados.

3.7.10. Marcadores de Pesos Molecularas para SDS-PAGE Foi Utilizado o Kit da Sigma (MW-SDS-70).

3.7.11. Tampão de ressuspensão 2X (Tris.Cl 100mM pH 6.8, Glicerol 20%, SDS 4%, Azul de Bromofenol 0.2%, 2-mercaptoetanol 10%).

Tris.....0,12g  
SDS.....0,40g  
Azul de Bromofenol.....0,02g

Glicerol.....	0,20ml
2-Mercaptoetanol.....	0,10ml
Água destilada.....	10,00ml

Os componentes foram misturados e dissolvidos e o pH acertado para 6.8 com HCl 1M. A solução foi então distribuída em alíquotas e estocada a -20°C.

### 3.8. SOLUÇÕES PARA IMUNO-HEMÓLISE PASSIVA (SERAFIM et al., 1979).

#### 3.8.1. Solução Estoque de Tampão Trieta pH7.4

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	1,2g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0,2g
NaCl.....	75,0g
Solução de Trietanolamina.....	28,0ml
Água destilada q.s.p.....	1000,0ml

Após todos os solutos serem dissolvidos por agitação e as soluções adicionadas em 800ml de água destilada, o pH foi acertado para 7.4 com NaOH 10N e o volume completado para 1000ml. A solução foi estocada a 4°C.

#### 3.8.2. Solução Tampão Trieta pH 7.4

Solução estoque.....	100,0ml
Gelatina.....	0,5g

Água destilada q.s.p .....1000,0ml

A gelatina foi dissolvida em 10ml de água destilada por aquecimento e a essa solução foram adicionados 100ml de solução estoque de tampão Trieta e o volume completado para 1000ml com água destilada.

### 3.9. SOLUÇÕES PARA "WESTERN BLOT" (SAMBROOK et al., 1989).

#### 3.9.1. Tampão de Transferência pH 8,3..

Glicina.....2,90g  
Tris.base.....5,80g  
SDS.....0,37g  
Metanol.....200,0ml  
Água miliQ q.s.p.....1000,0ml

O tampão foi preparado dissolvendo-se os conteúdos em 800ml de água mili-Q. O pH foi acertado para 8,3 com HCl fumegante e o volume completado para 1000ml com água mili-Q.

#### 3.9.2. Solução Estoque de Coloração "Ponceau S".

Ponceau S.....2,0g  
Ácido tricloroacético.....30,0g  
Ácido sulfossalicílico.....30,0g  
Água miliQ q.s.p.....100,0ml

A solução foi preparada dissolvendo-se os solutos em

80ml de água mili-Q por agitação. Quanto todo o soluto estava dissolvido, o volume da solução foi completado para 100ml com água miliQ.

### 3.9.3. Solução "Ponceau S" de Uso para Coloração de Proteínas Imobilizadas em Filtro de Nitrocelulose.

Esta solução foi preparada dissolvendo-se uma parte da solução estoque de "Ponceau S" em nove partes de água miliQ.

### 3.9.4. Tampão Fosfato Salina (PBS)

NaCl.....	8,00g
KCl.....	0,20g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1,44g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,24g
Água destilada q.s.p.....	1000,00ml

Os solutos foram dissolvidos em 800ml de água destilada por agitação, o pH foi acertado para 7,4 com solução 1M de HCl e o volume completado para 1000ml com água destilada. A solução foi então autoclavada e armazenada em frascos fechados a 4°C.

### 3.9.5. Solução Bloqueadora.

Leite em pó desnatado.....	5,0g
Tween 20.....	0,005ml
Tampão PBS q.s.p.....	100,0ml



O leite em pó foi dissolvido em 80ml de tampão PBS, o equivalente a 50µl de tween 20 foi adicionado e o volume foi completado para 100ml com tampão PBS.

### 3.9.6. Solução Bloqueadora Livre de Fosfato.

Leite em pó desnatado.....	5,00g
NaCl.....	0,88g
Tris base (solução 1M).....	5,00ml
Água miliQ q.s.p.....	100,00ml

O NaCl foi dissolvido em 80ml de água miliQ por agitação. Após este procedimento foi adicionado 5ml de solução estoque de tampão Tris.Cl e o pH acertado para 7,5 com solução 1M de HCl, sendo o volume completado para 100ml com água miliQ. A quantidade de 5g de leite em pó desnatado foi então dissolvida por agitação em 80ml desta solução de Tris-NaCl. O volume final foi então acertado para 100ml com esta mesma solução.

### 3.9.7. Solução de Lavagem do Filtro de Nitrocelulose.

NaCl.....	0,88g
Tris base 1M.....	5,00ml
Água miliQ q.s.p.....	100,00ml

Esta solução foi preparada exatamente como a anterior (item 3.9.6), a não ser pela ausência de leite em pó desnatado em sua formulação.

### 3.9.8. Solução Substrato para Peroxidase pH 7,6.

Tris.Cl 1M.....	0,1ml
Diaminobenzidina.....	0,006g
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 Volumes.....	0,010ml
Água miliQ q.s.p.....	10,0ml

A solução de Tris.Cl 0,01M foi preparada previamente por diluição de 100 $\mu$ l de tampão Tris.Cl 1M em 8ml de água miliQ, o pH acertado para 7,6 com HCl 100mM e o volume completado para 10ml com água miliQ. Somente momentos antes do uso foram adicionados as quantidades requeridas de diaminobenzidina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 4. MÉTODOS

### 4.1. EXTRAÇÃO PLASMIDIAL EM PEQUENA ESCALA

As amostras bacterianas foram crescidas por 18 horas a 37°C em 3ml de meio LB sendo 1.4ml dessa cultura transferidos para tubo "eppendorf". Uma vez nesses tubos, a cultura foi centrifugada por 2 minutos a 12000g em microcentrífuga. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 100µl de solução I e mantido por 5 minutos no gelo. Adicionaram-se então 200µl de solução II, misturada por inversão do tubo e mantida por 3 minutos no gelo. Após esse período de tempo adicionaram-se 150µl de solução III, também misturada por inversão. Depois da preparação ser mantida em gelo por 15 minutos, a mesma foi centrifugada por 5 minutos a 12000g e 400µl do sobrenadante transferidos para outro tubo "eppendorf" onde foi adicionado 1 ml de etanol 100% gelado (2.5V). Este foi misturado por inversão e a preparação, após ser mantida por 1 hora a -20°C, foi centrifugada a 12000g por 5 minutos à temperatura ambiente para precipitar o DNA plasmidiano. O sedimento foi ressuspense em 40µl de tampão TE e analisado quanto ao perfil plasmidial por eletroforese em gel de agarose. Para preparações de DNA a serem digeridas com enzimas de restrição, o sedimento foi ressuspense em 100µl de solução IV e 200µl de etanol 100% gelado foi adicionado. A preparação foi invertida para misturar os conteúdos e mantida por 1 hora a -20°C, sendo o DNA precipitado novamente por centrifugação a 12000g por 5 minutos. O sedimento após seco, foi ressuspense em 40µl de tampão T.E.

#### 4.2. VISUALIZAÇÃO PLASMIDIAL EM GEL DE AGAROSE.

Preparações de DNA foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose. Para preparar o gel, os lados de uma placa de vidro cujas medidas eram 16cm de comprimento, por 12cm de largura, foram celados com fita crepe, o pente contendo 12 dentes foi ajustado na posição e altura adequadas, e 60ml solução de agarose em tampão TEB na concentração adequada foram adicionados. O gel foi gelificado à temperatura ambiente e a eletroforese conduzida em cuba horizontal, onde quantidade suficiente de tampão TEB foi adicionada para cobrir o gel totalmente. Procedeu-se pré-corrída a 100 volts para limpeza do gel antes da aplicação das amostras, uma pré-corrída a 15 miliamperes para a entrada das amostras no gel e, a corrida propriamente dita foi conduzida a 100 volts. Para serem aplicadas as amostras foram ressuspensas em tampão contendo solução de ressuspensão (solução de azul de bromofenol). A corrida foi interrompida quando o corante marcador estava localizado a 0.5cm do fim do gel. O gel foi então transferido para uma solução aquosa de brometo de etídio (5µg/ml) e após 30 minutos as bandas de DNA foram visualizadas em luz ultra violeta.

#### 4.3. AMPLIFICAÇÃO PLASMIDIAL

Amostras bacterianas foram crescidas por 18 horas a 37°C em 3ml de meio LB contendo o antibiótico para o qual o plasmidio tinha resistência e 0.5ml dessa cultura foram transferidos para "erlemmayer" contendo 50ml de meio LB (diluição 1:100) com antibiótico. Essa nova cultura foi cultivada sob agitação (100rpm) a 37°C até atingir

absorbância de 0.5. Alcançado esse valor, 20ml dessa cultura foram transferidos para 200ml de meio LB em "erlemmayer" que foram cultivadas sob agitação a 37°C até absorbância 0.6. A essa cultura foi então adicionado o antibiótico cloranfenicol para uma concentração final de 170µg/ml e cultivadas a 37°C sob agitação por 18 horas e submetidas à extração plasmidial.

#### 4.4. EXTRAÇÃO PLASMIDIAL EM LARGA ESCALA

Cada 200ml de cultura plasmidial cujo plasmídio tenha sido amplificado foram centrifugados a 5000rpm por 15 minutos em tubos de centrífuga com capacidade para 250ml em volume. O sedimento ressuspenso em 5ml de solução I e, a seguir, transferido para tubos menores ( capacidade 40ml ) e mantidos no gelo por 30 minutos. A seguir adicionaram-se 10ml de solução II, misturada por inversão e mantida no gelo por 5 minutos. A lise alcalina foi interrompida pela adição de 7.5ml de solução III e após 30 minutos no gelo, a preparação foi centrifugada 20 minutos a 10000rpm, o sobrenadante filtrado e transferido para outro tubo onde adicionaram-se 0.6 volumes de álcool isopropílico gelado. A preparação foi mantida 1 hora a -20°C e o DNA plasmidiano precipitado por centrifugação a 10000rpm por 15 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado com o mesmo volume de álcool 70% e seco à temperatura ambiente até que nenhum traço de líquido fosse visível. O sedimento foi ressuspenso em 4ml de tampão T.E e mais uma vez centrifugado, agora a 7000rpm por 15 minutos para precipitar o excesso de proteínas. O sobrenadante recuperado e o DNA plasmidiano purificado por extração com fenol:clorofórmio ou centrifugação em gradiente de cloreto de césio.

#### 4.5. PRECIPITAÇÃO DE DNA.

A menos que especificado de outra forma, soluções aquosas de DNA foram precipitadas em etanol. A concentração de sal da solução foi acertada a partir de uma solução estoque de NaCl 5M para uma concentração final de 200mM. A essa solução foram adicionados 2.5 volumes de etanol 100% gelado, os conteúdos misturados por inversão do tubo várias vezes e em seguida mantido à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  por no mínimo 1 hora. O DNA foi então precipitado por centrifugação a 12000g por 5 minutos, o sobrenadante descartado e ao sedimento foi adicionado volume equivalente de etanol 70% gelado cuidadosamente pela parede inversa do tubo com relação à localização do sedimento. A solução foi novamente centrifugada a 12000g por 2 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento seco à temperatura ambiente e ressuspensão no tampão adequado.

#### 4.6. EQUILÍBRIO DO FENOL PARA PURIFICAÇÃO PLASMIDIAL (SAMBROOK et al, 1989).

O fenol bidestilado foi liquefeito por aquecimento a  $68^{\circ}\text{C}$ . Adicionou-se hidroxiquinolina para uma concentração final de 0.1% e volume equivalente de tampão Tris.HCl pH 8.0 1M. A mistura foi agitada e mantida à temperatura ambiente até a formação de duas fases, a aquosa e a fenólica. A fase aquosa foi então coletada e igual volume de tampão Tris.HCl 0.1m pH 8.0 foi adicionado à fase fenólica, misturada e deixada a mistura imóvel até a separação das fases. Este procedimento foi repetido até que o pH da fase fenólica fosse igual ou maior a 7.8. Após o fenol estar equilibrado e a fase aquosa removida,

adicionaram-se 0.1 volumes de tampão Tris.CL 0.1M pH 8.0 contendo 0.2% de  $\beta$  mercaptoetanol. Assim preparado, o fenol foi estocado a 4°C em frasco protegido da luz.

Quando conveniente, utilizou-se para purificação de DNA plasmidial a mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 25:24:01 respectivamente. Tanto clorofórmio como álcool isoamílico não necessitam de preparo antes do uso.

#### 4.7. PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL ATRAVÉS DE EXTRAÇÃO COM FENOL:CLOROFÓRMIO:ÁLCOOL ISOAMÍLICO (SAMBROOK et al., 1989)

Um volume de 400 a 500 $\mu$ l de DNA plasmidial a serem purificados foram transferidos para tubos "eppendorf" e mesmo volume da mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico foi adicionado e agitado até a formação de uma emulsão. A mistura foi centrifugada a 12000g por 30 segundos à temperatura ambiente. A fase superior, que geralmente é a fase aquosa, onde está o DNA, foi transferida para novo tubo, descartando-se a fase fenólica e a interface. A extração foi repetida até que nenhuma proteína fosse visível na interface. Adicionou-se então igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e após agitação . centrifugação e recuperação da fase superior, o DNA foi precipitado com 2.5V de etanol após a correção da concentração de NaCl.

#### 4.8. PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL ATRAVÉS DE CENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE CLORETO DE CÉSIO.

O volume da preparação de DNA plasmidial foi acertado para 4.2ml onde adicionaram-se 4.2g de cloreto de césio e brometo de etídio na concentração final de 80µg/ml. O índice de refração foi medido em refratômetro e acertado para 1.368 pela adição de cloreto de césio ou tampão T.E. A preparação foi centrifugada a 60000rpm por 20 horas a 20°C. Após a corrida, a banda correspondente ao DNA plasmidiano foi visualizada em UV longo e coletado com seringa. O brometo de etídio foi extraído com solução de butanol saturada com água ( ítem 3.8 ) e a preparação foi dializada contra água mili-Q por 36 horas.

#### 4.9. EXTRAÇÃO DE BROMETO DE ETÍDIO DE PREPARAÇÕES DE DNA.

Às preparações de DNA contaminadas com brometo de etídio adicionou-se igual volume de solução de butanol saturado em água, misturado por inversão várias vezes e centrifugada por 2 minutos a 12000g. A fase superior contendo o butanol e brometo de etídio diluído foi retirada com micropipeta. Repetiu-se tal procedimento até que a solução de DNA estivesse límpida.

#### 4.10. DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO DE DNA EM AMOSTRAS PURIFICADAS.

Diluições de 50, 100 e 500 vezes foram preparadas e analisadas quanto à absorbância em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 260 e 280 nanômetros (nm). Cada 1 unidade de absorbância a



260nm é equivalente a 50µg/ml de DNA dupla fita. A relação 260/280nm, em amostras puras deverá apresentar valores entre 1.8-2.0.

#### 4.11. DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.

A 18µl de solução de DNA plasmidial foram adicionados 2µl de tampão apropriado para a atividade enzimática 10 vezes concentrado e quantidade suficiente da enzima (volume final próximo de 20µl). Após misturado, o conteúdo do tubo foi centrifugado momentaneamente e incubado a 37°C (temperatura ideal para todas as enzimas utilizadas neste trabalho) por 2.5-3.0 horas. Após esse período de tempo, a preparação foi novamente centrifugada momentaneamente a 12000g e analisada quanto à eficiência da reação para análise de clones ou para futura purificação de fragmentos em agarose tipo VII (" Low melting point agarose ", Sigma), como descrito no item 4.12.

#### 4.12. PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA EM AGAROSE TIPO VII ("LOW MELTING POINT", Sigma).

Agarose "Low Melting Point" na concentração apropriada, que depende do tamanho do fragmento de DNA a ser purificado, foi dissolvida em tampão TEB e uma vez preparado, o gel foi gelificado em refrigerador (4°C).

A eletroforese foi conduzida em refrigerador a 50 volts, sendo feita pré-corrida a 15mA para entrada da amostra no gel. Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0.5µg/ml) e visualizado em luz ultra violeta de comprimento de onda longo. A banda

correspondendo ao fragmento foi cortada e transferida para tubo "eppendorf" onde adicionaram-se cinco volumes de tampão TE ao pedaço de agarose. A mistura foi incubada a 65°C por 5 minutos para derreter a agarose e submetida à extração uma vez com fenol, uma vez com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e uma vez com clorofórmio:álcool isoamílico conforme item 4.7.

A fase aquosa foi então submetida à precipitação de DNA com etanol na presença de 0.25 volumes de 10M de acetato de amônio.

#### 4.13. DEFOSFORILAÇÃO DE DNA DO VETOR PLASMIDIAL.

O DNA plasmidial foi digerido com as enzimas de restrição apropriadas, precipitado com etanol e ressuspenso em 90µl de tampão Tris.Cl 0.1M pH 8.0. A essa solução foram adicionado 7.5µl de tampão Tris.Cl 0.1M e MgCl<sub>2</sub> 5mM pH 8.0 e 2.5µl de uma solução de CIAP ("Calf Intestinal Alkaline Phosphatase") diluída 1:100 em tampão Tris.Cl 0.1M e MgCl<sub>2</sub> 5mM pH 8.0. A Mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C e a reação foi parada com a adição de EDTA para concentração final de 5mM e aquecimento a 65°C por 1 hora. Após esse período de tempo a preparação foi extraída uma vez com fenol, uma vez com fenol:clorofórmio e uma vez com clorofórmio. A fase aquosa foi transferida para tubo novo, a concentração de sal ajustada adicionando-se 0.1V de acetato de sódio 3M pH 7.0 e precipitada com 2.5V de etanol. O sedimento foi então lavado com etanol 70% e seco à temperatura ambiente.

#### 4.14. CLONAGEM MOLECULAR DO GENE ELT<sub>B</sub>.

Em um tubo "eppendorf" foram adicionado o equivalente a 0.1µg de DNA plasmidial vetor digerido, defosforilado e purificado por eletroforese em agarose tipo VII e quantidade equimolar do fragmento a ser clonado, com extremidades coesivas complementares às do vetor. Água mili-Q foi adicionada completando-se o volume para 7.5µl. A mistura foi aquecida a 45°C por 5 minutos para desfazer quaisquer ligações entre terminações coesivas que tenham se formado. Após esfriamento a 0°C à preparação adicionou-se 1µl de tampão "One Phor All Buffer", 1µl de solução de ATP 5mM e quantidade suficiente de T4 DNA Ligase. Após ser misturada a reação foi centrifugada momentaneamente e a reação conduzida à temperatura ambiente durante período aproximado de 18 horas.

A eficiência da reação foi analisada em gel de agarose e células competentes de *E.coli* DH5α foram transformadas. Os transformantes assim obtidos foram analisados quanto à presença do fragmento clonado.

#### 4.15. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA.

Um volume de 2.5ml de pré-inóculo da linhagem de *E.coli* DH5α crescido a 37°C em 5ml de meio LB foi transferido para "erlenmayer" com 50ml de meio LB (diluição 1:20) e as células crescidas sob agitação (100rpm) a 37°C até absorvência 0.5. A seguir a cultura foi transferida para 2 tubos de centrífuga (25ml/tubo) e submetida à centrifugação a 5000rpm por 10 minutos (4°C). O sobrenadante foi descartado e o sedimento de cada tubo ressuspensado em 20ml de solução de

CaCl<sub>2</sub> 0.1M. A preparação foi mantida 10 minutos em gelo e então centrifugada nas mesmas condições anteriormente descritas. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de ambos os tubos foi ressuspensão em 2ml da solução de CaCl<sub>2</sub> e transferida para tubos de ensaio em alíquotas de 200µl. Após 4-20 horas no gelo adicionou-se DNA plasmidial na concentração aproximada de 60 nanogramas às alíquotas que foram mantidas por mais 45 minutos no gelo e então submetidas a choque térmico de 5 minutos a 37°C e resfriadas a 0°C por 2 minutos. Meio SOC (800µl) foi adicionado a cada preparação e incubadas a 37°C por 45 minutos. Após a preparação ser transferida para tubos "eppendorf", foi centrifugada a 12000g por 2 minutos e o sedimento ressuspensão em 100µl de meio LB e plaqueado em meios seletivos apropriados.

#### 4.16. ANÁLISE DOS CLONES OBTIDOS

A análise dos clones obtidos a partir da clonagem foi realizada a partir de extração plasmidial em pequena escala até solução IV ou purificação através de extração com fenol:clorofórmio (SAMBROOK et al, 1989) e visualização do fragmento clonado através de eletroforese em gel de agarose após digestão com as enzimas de restrição apropriadas.

#### 4.17. DELEÇÃO DA PORÇÃO CARBOXI-TERMINAL DO GENE *ELT<sub>B</sub>*, CORRESPONDENTE À SUBUNIDADE B DA TOXINA LT

Para deleção da porção carboxi-terminal do gene correspondente à subunidade B da toxina LT, extração em larga escala do plasmídeo pSB1 foi preparada (conforme item 4.4), purificado por centrifugação em gradiente de cloreto de cézio (item 4.8) e dosado por leitura de absorvância em espectrofotômetro (item 4.10). O equivalente a 8µg do plasmídeo pSB1 foi digerido com a enzima de restrição HindIII, digestão esta monitorada através de eletroforese em gel de agarose. Após a digestão enzimática, a preparação de DNA foi aquecida por 10 minutos a 70°C para inativar a enzima e precipitada com etanol para retirar o excesso de sal. O equivalente a 4µg de DNA plasmidial foi então ressuspensão em 20µl de água miliQ. A seguir, a preparação plasmidial foi submetida à digestão com exonuclease III, utilizando-se para isso, todo o material e metodologia descrita no "double-stranded Nested Deletion Kit" da "Pharmacia LKB Biotechnology".

Seguindo o protocolo, em tubo " eppendorf " foram adicionados 33µl de tampão S1, 66µl de água miliQ e 1µl de nuclease S1, e 5µl dessa mistura foi então pipetado em outros 12 tubos mantidos no gelo. Em outro tubo " eppendorf " foram adicionados 8µl de tampão para Exonuclease III, 8µl de solução NaCl 0.3M e 8µl de água miliQ. A 20µl dessa solução foram adicionados 20µl de solução de DNA e a mistura foi incubada a 37°C em banho maria para equilibrar a temperatura. A essa mistura foi então adicionado 1µl de exonuclease III, misturada gentilmente e incubada a 37°C. A cada intervalo de 30 segundos, 3.3µl dessa mistura foi transferido para tubos com nuclease S1, misturados delicadamente e mantidos no gelo. Antes porém de acrescentar exonuclease III, 3.3µl da mistura foi transferido para um tubo com

nuclease S1 para servir como tempo de digestão 0 segundos. Ao todo foram conduzidos 11 tempos de digestão, com intervalos de 30 segundos entre eles, perfazendo um total de 330 segundos. Os tubos contendo a mistura de reação foram retirados do gelo e incubados à temperatura ambiente por 1 hora, para ação da nuclease S1. Após esse período de tempo adicionaram-se 1.7µl de solução " stop " da nuclease S1 e a mistura foi incubada a 65°C por 10 minutos para inativar a enzima. Para análise da digestão, 2µl de cada reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0.7% e a mobilidade de cada tempo de reação foi comparada com a migração de DNA de bacteriófago λ digerido com HindIII, que apresenta fragmentos lineares de DNA de tamanho conhecido. Como resultado dessas análises, os tempos de reação entre 60 e 270 segundos eram os que apresentavam a maior probabilidade de possuírem o fragmento cujo tamanho era o procurado. A esses tempos de reação foram então adicionados " linkers " de HindIII para restabelecer o sítio de restrição (conforme item 4.18).

#### 4.18. LIGAÇÃO DE " LINKER " PARA RESTABELECIMENTO DO SÍTIO DE RESTRIÇÃO.

Aos tempos de digestão entre 60 e 270 segundos foram adicionados " linkers " na extremidade digerida para restabelecer o sítio de restrição. A cada tubo, correspondente a cada tempo, contendo 8µl da mistura de reação, foi adicionado 1µl de solução de " linker " HindIII na concentração de 1µg/µl e 51µl da mistura de ligação do " double-stranded Deletion Kit " e a mistura foi incubada à temperatura ambiente por 18 horas e aquecida a 65°C por 15 minutos para inativar a ligase. A concentração de sal foi acertada para 0.2M com solução de

NaCl 0.5M e 2.5 volumes de etanol foram adicionados e misturados por inversão do tubo. Após a preparação ser mantida 18 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , o DNA foi precipitado por centrifugação a 12000g em microcentrífuga por 7 minutos. O sedimento foi lavado com álcool 70% e após centrifugação a 12000g por 2 minutos foi seco à temperatura ambiente. O DNA foi então ressuspenso em 9 $\mu\text{l}$  de água miliQ, acrescido de 1 $\mu\text{l}$  de tampão de digestão EB e digerido com a enzima de restrição HindIII. Esta digestão foi purificada com "gene clean (Bio 101 Inc.)" para retirada de fragmentos do "linker" em excesso, liberados após digestão. O DNA assim obtido foi religado e utilizado para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Células de cada tempo, obtidas após a transformação, foram submetidas à extração em pequena escala, digeridas com enzima de restrição Hind III e analisadas por eletroforese em gel de agarose quanto ao restabelecimento do sítio de restrição Hind III e quanto à presença e tamanho do fragmento. Dessas análises, clones que apresentavam fragmentos, cujo tamanho estava próximo ao procurado, foram analisados quanto à sequência nucleotídica para se determinar a extensão da digestão com exonuclease III.

#### 4.19. SEQUENCIAMENTO DE DNA.

Os fragmentos de DNA a serem sequenciados foram subclonados em pUC 18, analisados quanto à presença do fragmento correspondente ao gene Lfb digerido com exonuclease III e quanto ao número de fragmentos ligados. Clones que continham um único fragmento inserido nos sítios EcoRI e HindIII do plasmídeo pUC18 foram então submetidos à extração plasmidial em larga escala e purificados por centrifugação em gradiente de cloreto de céσιο. O DNA plasmidial foi

dosado em espectrofotômetro e o equivalente a 8µg de DNA plasmidial foi precipitado e ressuspensão em 40µl de água miliQ. À preparação de DNA adicionaram-se 40µl de tampão de denaturação e a mistura de reação incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse período de tempo, adicionaram-se simultaneamente 8µl de acetato de amônio e 176µl de etanol 100% gelado. A preparação foi mantida 1h a -20°C e o DNA precipitado por centrifugação a 12000g e a 4°C por 30 minutos. Ao sedimento foi acrescido 1 ml de etanol 70% e a preparação novamente centrifugada por 15 minutos a 12000g a 4°C. Após o sedimento estar seco, foi ressuspensão em 20µl de água miliQ e dividido em 2 tubos " eppendorf ". Para um dos tubos foram transferidos 10µl da preparação, 2µl de " universal primer " e 2µl de " annealing buffer ". Para o outro tubo foram transferidos 8.8µl da preparação de DNA, 3.2µl de " reversal primer " e 2µl de " annealing buffer ". O conteúdo dos tubos foram misturados por " tapping ", centrifugados momentaneamente e incubados a 37°C por 20 minutos. Após a incubação, os tubos foram mantidos por 10 minutos à temperatura ambiente. Nos intervalos das reações já descritas, para cada reação de sequenciamento foram marcados tubos com A (adenina), C (citosina), G (guanina) e T (timina), um de cada, e a cada um deles foi transferido 2.5µl dos dideoxinucleotídios equivalentes, sendo mantidos em gelo até sua utilização. Em outro tubo " eppendorf " a enzima T7 DNA polimerase foi diluída em tampão de diluição para 1.5 unidades/µl e mantida no gelo até sua utilização. A mistura de reação foi preparada adicionando-se as seguintes substâncias em tubo " eppendorf " :

- .....nµl água miliQ
- .....3nµl da mistura de marcação
- .....2nµl de enzima T7 DNA polimerase diluída
- .....nµl de dNTP marcado com S<sup>35</sup>, onde n é o número



de reações de sequenciamento. Os conteúdos foram misturados por "tapping", centrifugados momentaneamente e mantido no gelo. Dessa mistura de reação, 6 $\mu$ l foram pipetados em cada tubo contendo a amostra de DNA anelada ao " primer " e a reação foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Enquanto esta reação se processava, os tubos contendo os dideoxínucleotídios foram transferidos do gelo para banho maria a 37°C e mantidos por no mínimo 1 minuto nesta temperatura, antes do próximo passo da reação.

Concluído o tempo de reação e estando os tubos com dideoxínucleotídios devidamente equilibrados à temperatura de 37°C, para cada um destes foram transferidos 4.5 $\mu$ l da reação de sequenciamento, misturados por pipetagem e incubados por 5 minutos a 37°C em banho maria. Decorrido o tempo de incubação, a cada tubo foi adicionado 5 $\mu$ l de " stop solution " e transferidos para gelo. Quando todas as reações foram concluídas os tubos foram centrifugados momentaneamente e armazenados a -20°C.

Imediatamente antes de carregar o gel, as reações foram descongeladas e aquecidas a 80°C por 3 minutos e 2 $\mu$ l de cada reação foi aplicado no gel de sequenciamento.

#### 4.20. MONTAGEM, CONDIÇÕES DE CORRIDA ELETROFORÉTICA PARA GEIS DE SEQUENCIAMENTO E SENSIBILIZAÇÃO DE FILMES RADIOGRÁFICOS

Para os experimentos de sequenciamento de DNA foi utilizado equipamento da Pharmacia (descrito no ítem métodos). Foram feitos dois geis de concentração diferente de poliacrilamida, um 5% e outro 6% para melhor resolução de sequências longas e curtas,

respectivamente. No preparo do gel foram adicionados 25.2g de uréia, 6ml de TBE 10X , 7.5ml de solução de acrilamida 40% para gel 5% e 9.0ml para gel 6% e o volume final de ambas as preparações foi completado para 60ml com água miliQ. . A corrida foi conduzida a uma voltagem de 2000 volts, sendo que o gel de curtas foi retirado quando o primeiro corante marcador de corrida chegou no fim do gel. O gel de longas só foi retirado 2 horas após o segundo marcador ter saído do gel. Após a interrupção da corrida, uma das placas de vidro foi retirada cuidadosamente ficando o gel preso na outra placa. Isso foi facilitado devido ao fato de no preparo das placas para montagem do gel, na superfície dessas foi passado " rippell " (produto da " Pharmacia LKB "), para evitar a aderência do gel, enquanto que na outra foi passado " biding cilane " (" Pharmacia LKB ") para a aderência do gel. Estando o gel preso na placa com " biding cilane " , este foi mantido em uma solução de Metanol 10% e Ácido Acético 10% com agitação por 30 minutos, lavado exaustivamente sob água corrente e seco em estufa a 45°C por aproximadamente 18 horas. Após secagem, os geis foram expostos a filmes radiográficos (Hyperfilm-MP, Amersham) em câmara escura geralmente por três dias, o que dependia da idade do material radioativo.

#### 4.21. REVELAÇÃO DE FILMES RADIOGRÁFICOS.

Em 3 cubas de plástico com tamanho suficiente para acomodar os filmes radiográficos foram colocados Revelador (KODAK), água e Fixador (KODAK) próprios para revelação de filmes de raio X, em quantidade suficiente para cobrir os filmes. Em câmara escura, os filmes foram mantidos 3 minutos imersos no revelador, passados em água rapidamente e mantidos no mínimo 3 minutos no fixador. Após esse

período de tempo o filme foi lavado exaustivamente em água corrente e os resultados analisados.

#### 4.22. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DE *E. coli*

Amostras bacterianas a serem submetidas à extração de proteínas totais foram pré-inoculadas em 3ml de meio LB e cultivadas a 37°C por 18 horas e então 200µl dessa cultura foi inoculada em 20ml de meio CAYE. Esta cultura foi incubada a 37°C sob agitação (150rpm) por 18 horas e o sedimento bacteriano de 5ml dessa cultura foi coletado por centrifugação a 12000g por 5 minutos. Os 15ml restantes foram centrifugados a 5000rpm por 15 minutos e o sobrenadante recuperado e submetido à precipitação de proteínas (item 3.22). O sedimento foi ressuspensão em 3.5ml de tampão Tris.HCl 50mM pH 7.4 e novamente coletado por centrifugação a 12000g por 5 minutos. O sedimento foi então ressuspensão em 125µl de água miliQ e a preparação foi adicionado 125µl de solução de ressuspensão. A preparação foi fervida por 5 minutos, passada repetidas vezes por seringa de agulha 23 gauge, centrifugada por 10 minutos a 12000g e o sobrenadante transferido para novo tubo, onde foi congelado a -20°C até seu uso.

#### 4.23. PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SOBRENADANTE DE CULTURAS.

Como comentado no item 3.22, 15ml de culturas cultivada em meio CAYE, foram centrifugadas a 5000rpm por 15 minutos, o sedimento descartado e o sobrenadante submetido à precipitação de proteínas. A esse sobrenadante foram adicionados 2.5ml de uma solução de ácido

Tricloroacético (TCA) 40%, obtendo-se uma solução final de aproximadamente 5%. Essa preparação foi mantida em gelo por 30 minutos e centrifugada a 10000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 1ml de solução de etanol:éter (1:1) gelada, mantida no gelo por 30 minutos e novamente centrifugada para coletar o sobrenadante. Esse passo foi repetido por mais duas vezes, o sedimento seco à temperatura ambiente e ressuspense em 200µl de tampão de ressuspensão. A preparação foi então fervida por 5 minutos, centrifugada a 12000g também por 5 minutos, o sedimento descartado e o sobrenadante transferido para novo tubo e congelado a -20°C.

#### 4.24. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA.

Para geis de SDS-PAGE foi utilizado equipamento eletroforético de procedência da " Pharmacia LKB Biotechnology " modelo 2001. No preparo do gel foram adicionados as soluções nas concentrações citadas na tabela 2.

TABELA 3: CONCENTRAÇÕES DE SOLUÇÕES PARA SDS-PAGE

SOLUÇÕES	Gel Corrida(ml)		Gel Empacotamento(ml)
	12.5% A 2.7% BisA	13% A 2.7% BisA	4% A 2.7% BisA
30% A e 2.7% BisA	25	26	2.66
Tris.HCl 1.5M pH 8.8	15	15	--
Tris.HCl 0.5M pH 6.8	--	--	5.0
10% SDS	0.6	0.6	0.2
Água destilada	19.1	18.1	12.2
Persulfato Amônio	0.3	0.3	0.1
TEMED ( $\mu$ l )	20	20	10

## LEGENDA:

A- Acrilamida

BisA- Bis acrilamida

As soluções foram misturadas por agitação branda e uma vez polimerizado os géis, as amostras foram aplicadas e a eletroforese conduzida em tampão de corrida Tris-Glicina a 120V por aproximadamente 6 horas ou a 10mA quando a corrida era realizada durante a noite. Em seguida os géis foram submetidos à coloração por prata conforme item 3.25.

#### 4.25. COLORAÇÃO DE PRATA DE SDS-PAGE.

Ao serem retirados da cuba de eletroforese, os géis a serem corados com prata foram mantidos em solução fixadora por período de tempo maior ou igual a 1 hora. Os géis, após esse período foram transferidos para solução de etanol 50% e mantidos em agitação por 20 minutos. Essa última operação foi repetida mais duas vezes e então o gel foi transferido para solução de pré-tratamento por 1 minuto em constante agitação. A solução de pré-tratamento foi então dispensada e os géis lavados 3 vezes em água, por um período de 20 segundos de cada vez. Os géis foram então imersos em solução de impregnação e mantidos em agitação por mais 20 minutos. Seguiu-se 2 novas lavagens de 20 segundos cada uma, em água e a visualização das bandas proteicas por imersão dos géis, ainda com agitação em solução reveladora. A revelação foi parada por 2 lavagens seguidas de 2 minutos cada uma em água e com a imersão dos géis em solução " stop " por 10 minutos com agitação. Os géis foram mantidos em solução de metanol 50% até serem fotografados e a seguir foram plastificados em papel celofane. Géis que seriam plastificados foram primeiramente transferidos para solução 30% de metanol por 30 minutos, a seguir em solução de glicerol 3% por mais 30 minutos e em seguida plastificados.

#### 4.26. IMUNO-HEMÓLISE PASSIVA

Este teste foi utilizado para verificar a produção e a secreção da enterotoxina LT ou da subunidade B desta, presente no sobrenadante de culturas de diferentes amostras de *E. coli*, e foi realizado conforme descrito anteriormente (SERAFIM et al., 1979)

As amostras de *E. coli* a serem testadas foram incubadas sob agitação a 37°C por 18 horas. Após este período de tempo, as culturas foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi recuperado e mantido a -20°C até o seu uso, sendo o sedimento descartado. No caso de culturas da linhagem de *E. coli* JM109 contendo o plasmídeo pKK2233, estas foram incubadas sob agitação a 37°C até a densidade óptica de 0,6. Neste instante foi adicionado solução de IPTG na concentração final de 1mM e a cultura incubada por mais duas horas nas mesmas condições descritas anteriormente, só então o sobrenadante destas culturas foram submetidos a centrifugação.

Para a realização do teste PIH, a um tubo de ensaio foram adicionados 50µl de tampão trieta, 50µl de ressuspensão de hemácias de carneiro padronizadas em tampão trieta e 50µl de sobrenadantes de culturas. Para cada um dos sobrenadantes testados, foram realizadas três misturas de reação. Estas misturas foram incubadas por 30 minutos a 37°C em banho maria. Em seguida foram adicionados 100µl de antissoro anti-toxina colérica (diluído 1/100 em tampão trieta) em dois tubos de cada reação, permanecendo o terceiro como controle negativo de reação. Estas misturas foram novamente incubadas por 30 minutos a 37°C e a seguir acrescidas de complemento (diluído 1/10 em tampão trieta). Após incubação a 37°C por 45 minutos, as preparações foram submetidas a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 420 nanômetros para verificar atividade de LT e consequente lise de hemácias.

Foram considerados resultados positivos aqueles que, quando submetidos à fórmula abaixo, resultaram em valores maiores ou iguais a 30µg/ml.

$$Y = \frac{DO \text{ media}}{5,5} \times 1000 \quad \text{onde } y \text{ é o valor da produção de LT}$$

5,5

4.27. "WESTERN BLOT" PARA DETERMINAR A CAPACIDADE DAS PROTEÍNAS LT<sub>B</sub> INTACTA E DIGERIDA DE SEREM RECONHECIDAS POR ANTICORPOS ANTI-LT.

Para a transferência de proteínas de geis de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a filtros de nitrocelulose, os geis foram montados e a corrida eletroforética foi conduzida como descrita anteriormente (item 3.24). Para cada experimento de transferência foram feitos dois geis onde foram aplicados as mesmas amostras, na mesma sequência, sendo que, um dos geis foi utilizado para a transferência e o outro foi corado com prata (item 3.25). Este procedimento permitiu a comparação entre os padrões de migração das amostras proteicas e o observado no filtro após transferência.

O filtro de nitrocelulose foi cortado num tamanho idêntico ao do gel e mergulhado em uma cuba com água miliQ no mínimo 5 minutos antes da transferência. Duas peças de papel "Whatman 3MM" também foram cortadas e mergulhadas em tampão de transferência. O aparato de transferência foi então montado de tal forma que o gel estivesse em contato direto com o filtro de nitrocelulose e estes, envoltos pelas duas peças de papel "Whatman 3MM". Assim montado, o aparato foi transferido para cuba de transferência onde previamente já havia sido colocado tampão de transferência. Este aparato foi montado de tal forma que o filtro de nitrocelulose estivesse voltado para o ânodo e o gel para o cátodo da cuba. A transferência foi então realizada a 400mA por aproximadamente 60 minutos e o aparato desmontado. O gel foi então submetido a coloração de proteínas por prata para verificar a eficiência da transferência.

O filtro de nitrocelulose foi, após transferência, incubado à temperatura ambiente, em solução de "Ponceau S" até que as



bandas proteicas estivessem nítidas, comprovando a eficiência da transferência. O filtro foi então lavado várias vezes com água miliQ até que todo o corante fosse retirado e incubado por aproximadamente 1 a 2 horas com agitação branda em solução bloqueadora à temperatura ambiente. Após este período de tempo a solução bloqueadora foi trocada e antissoro anti-LT ou anti-CT foi adicionado na concentração apropriada (diluição 1/100). O filtro foi incubado nesta solução por 2 horas com agitação branda e, a seguir, lavado com tampão fosfato três vezes (10 minutos cada) em agitação constante. Após a última lavada em PBS o filtro foi lavado mais uma vez em solução de lavagem livre de fosfato (150mM de NaCl e 50mM de Tris.Cl pH 7,5) e, a seguir, submetido a reação com anticorpo secundário.

Para a reação entre os anticorpos primário e secundário, o filtro foi transferido para cuba com solução bloqueadora livre de fosfato e anticorpo anti-IgG de coelho foi adicionado na concentração apropriada (diluição 1/2000). Esta preparação foi incubada à temperatura ambiente, com agitação branda por 1 hora e meia. Após este período de tempo, o filtro foi lavado quatro vezes (10 minutos cada) em solução de lavagem livre de fosfato, com agitação branda, e submetido a revelação com o substrato diaminobenzidina (DAB).

A solução correspondente a última lavada foi descartada e o filtro foi imerso em solução substrato para peroxidase (6mg de DAB em 10ml de Tris.Cl 0,01M pH 7,6) e 10µl de água oxigenada foi adicionada. O progresso da reação foi monitorado cuidadosamente. Quando as bandas estavam com a intensidade desejada, o filtro foi lavado abundantemente em água corrente para parar a reação e, quando necessário foi fotografado.

## 5. RESULTADOS.

### 5.1. CLONAGEM DO GENE *eltB* NO PLASMÍDIO pUC18.

A digestão do plasmídeo pEWD299 com as enzimas de restrição EcoRI e HindIII gera dois fragmentos de DNA com 7560 e 600 pares de base aproximadamente, sendo que, este último, contém o gene *eltB*, codificador da subunidade B da toxina LT (Figura 1). Para a purificação deste fragmento de DNA, o equivalente a 4µg do plasmídeo pEWD299, purificado por extração com fenol/clofórmio (item 4.7 de métodos), foi digerido com as enzimas já referidas e, a mistura de reação submetida à eletroforese em gel de agarose tipo VII (agarose "low melting point") seguido de extração com fenol/clorofórmio (item 4.12 de métodos).

O vetor plasmidial pUC18 foi purificado por extração em gradiente de cloreto de céσιο e o equivalente a 4µg deste DNA, foi também digerido com as enzimas EcoRI e HindIII, visando posterior clonagem do gene *eltB*. Após a digestão, o plasmídeo foi submetido à reação de defosforilação (conforme item 4.13 de métodos) e, a seguir, purificado utilizando-se eletroforese em gel de agarose tipo VII.

Para a reação de ligação, foram utilizadas quantidades equimolares dos fragmentos de DNA contendo o gene *eltB* e do vetor pUC18 digerido e defosforilado. A reação foi analisada por eletroforese em gel de agarose (Figura 2). Como pode ser observado nesta figura, vários fragmentos de DNA, oriundos da ligação, aparecem na canaleta correspondente, com pesos moleculares intermediários ou mesmo mais pesados que o DNA do vetor e do fragmento *eltB*. Foram aplicadas no gel, quantidades equimolares destes DNAs com relação às quantidades

presentes na alíquota, separada da reação de ligação, e analisada no gel eletroforético. Desta forma, pode-se concluir que a reação de ligação foi efetiva por dois motivos. Primeiro, pela presença de fragmentos com tamanhos diferentes dos fragmentos correspondentes aos DNA vetor e do gene *eltA* e, segundo, pelo fato das bandas correspondentes a estes DNAs, na reação de ligação, terem praticamente desaparecido, o que prova que estes DNAs ligaram-se entre si.

A mistura da reação de ligação foi então utilizada para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  (preparadas conforme item 4.15 de métodos) e, a seguir, selecionadas em meio de cultura com ampicilina e Xgal. Após incubação a 37°C por 20 horas aproximadamente, centenas de colônias brancas foram selecionadas, transferidas para novas placas com ampicilina e submetidas à extração plasmidial em pequena escala (item 4.1 de métodos). Tais extrações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose e comparadas, quanto ao perfil de migração do plasmídio pUC18 (dados não mostrados). Amostras que apresentavam plasmídio com padrão de migração diferentes do apresentado por pUC18, foram purificadas por extração com fenol/cloroformio e digeridas com as enzimas EcoRI e HindIII e, novamente analisadas por eletroforese em gel de agarose (1,4%) para detectar a presença do fragmento em questão. Algumas amostras positivas para a presença deste fragmento foram então submetidas a análises para a determinação do número de fragmentos presentes em tais plasmídios quiméricos.

A clonagem, em função das técnicas utilizadas, poderia resultar na presença de um único fragmento, ou números ímpares deste, já que tais moléculas de DNA não foram defosforiladas. A digestão de preparações purificadas, desses plasmídios quiméricos, com a enzima EcoRI ou com a enzima HindIII somente, geraria um fragmento de DNA, de

aproximadamente 1200 pares de bases, composto por dois fragmentos *eltB* ligados, se três ou mais destes estivessem presentes. A Figura 3 demonstra o perfil migratório, resultante da digestão de um plasmídeo quimérico com as enzimas EcoRI e/ou HindIII. Como pode ser notado, a presença do fragmento de 1200kb não foi detectada, e esta amostra foi caracterizada como contendo plasmídeo onde, um único fragmento *eltB* estava presente. Este plasmídeo foi denominado pSB1 e, se referia portanto, ao vetor pUC18, contendo fragmento codificador do gene *eltB*, inserido na região "polilinker", entre os sítios EcoRI e HindIII.

## 5.2. DELEÇÃO DA PORÇÃO CARBOXY-TERMINAL DO GENE *ELTB*

Após purificação através de gradiente de cloreto de céσιο, o plasmídeo pSB1 foi linearizado com HindIII e submetido à digestão progressiva com a enzima Exonuclease III (item 4.17 de métodos) para a retirada do "stop codon" do gene *eltB*. A efetividade da reação foi analisada por eletroforese em gel de agarose (dados não mostrados). Como esperado, a diminuição no tamanho do fragmento, correspondente ao plasmídeo linearizado foi diretamente proporcional ao tempo de tratamento. Às moléculas obtidas desta maneira, foram adicionados "linkers" HindIII e religadas. Os diferentes tempos de reação foram então utilizadas para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , como descrito em métodos.

Amostras de bactérias correspondentes aos diferentes tempos de reação foram isoladas, estocadas, submetidas à extração e purificação plasmidial e, digeridas com HindIII, para detectar aquelas que continham plasmídios, onde o "linker" HindIII estava presente. A

não digestão de algumas amostras era indicação da ausência de "linker" e tais amostras foram descartadas.

O padrão de migração dos plasmídios linearizados, também foi analisado e comparado com marcador de pesos moleculares conhecidos, sendo selecionadas amostras bacterianas contendo plasmídios com tamanho, em pares de bases, próximo ao esperado. A Figura 4 mostra o padrão de migração plasmidial de diferentes clones, obtidos após tratamento com ExoIII e linearizados por digestão com HindIII. A distância de migração das bandas plasmidiais nesta figura foram medidas e analisadas em um gráfico, em papel monolog, para a determinação aproximada do tamanho dos plasmídios obtidos, em pares de bases. Neste experimento, o DNA de bacteriófago  $\lambda$  digerido com HindIII foi utilizado como marcador. A partir dos resultados obtidos dessa forma, dois clones (90 e 210) foram submetidos a sequenciamento de nucleotídeos, para a determinação da extensão da região deletada pelo tratamento com EXOIII (estes clones estão apontados na Figura 4).

### 5.3. SUBCLONAGEM DO GENE ELT<sub>a</sub> DELETADO EM pUC18

O vetor plasmidial pUC18 é caracterizado pela presença de sequências nucleotídicas adjacentes à região "polilinker", homólogas aos "primers", utilizados frequentemente para o sequenciamento de fragmentos de DNA inseridos nesta região. A reação de anelamento entre o "primer" e tais sequências é imprescindível para a reação de sequenciamento. Como o plasmídio pSB1, embora tendo como base em sua construção, o plasmídio pUC18, foi submetido à reação de digestão, com uma exonuclease, de tal maneira que a sequência próxima ao sítio

HindIII foi totalmente deletada, para a realização da reação de sequenciamento, foi necessária uma subclonagem dos fragmentos em pUC18. A Figura 5 reepresenta um esquema demonstrando a atividade da ExoIII sobre o plasmídeo pSB1 e, a deleção da sequência próxima ao sítio HindIII e responsável pelo anelamento com "primer" na reação de sequenciamento.

A Figura 6 demonstra as análises de restrição de plasmídios oriundos de reação de ligação do fragmento correspondente ao clone 210 em pUC18. Como pode ser observado, duas amostras foram caracterizadas como positivas para a presença deste fragmento. Uma destas foi estocada e o plasmídeo denominado pSB2.

O fragmento presente no clone 90 também foi subclonado em pUC18, nos sítios EcoRI e HindIII, originando o plasmídeo pSB5.

#### 5.4. SEQUENCIAMENTO DO GENE *eltB* DIGERIDO COM EXOIII, EM DIFERENTES TEMPOS DE REAÇÃO.

As sequências nucleotídicas obtidas após reação de sequenciamento, dos fragmentos presentes nos vetores plasmidiais pSB2 e pSB5, foram comparadas com sequências descritas na literatura, correspondentes ao gene *eltB*, para a detecção de mutações, decorrentes de exposição à agentes mutagênicos, durante as manipulações experimentais. Nenhuma alteração foi detectada na sequência nucleotídica, quando comparada com sequências já descritas na literatura.

O códon de terminação de tradução "TAG" foi encontrado no fragmento presente no plasmídeo pSB5, o que inutiliza a utilização deste, como gene codificador de possível proteína carreadora de

epítomos antigênicos, inseridos na porção amino-terminal. O vetor pSB2, pelo contrário, ficou caracterizado por apresentar deleção que envolvia esta região e, a ausência desta, abria a possibilidade da utilização deste no desenvolvimento de vacinas. Dos 375 pb codificadores da subunidade B da toxina LT, 93 foram retirados pelo tratamento com a exonuclease (Figura 7).

A partir destes resultados, o fragmento extraído deste plasmídio foi clonado no vetor de expressão pKK2233. A proteína expressa a partir deste gene, neste vetor, foi então analisada quanto à sua capacidade de ser reconhecida por anticorpos anti-toxina colérica, e pela capacidade de ligação à gangliosídeo GM1 de superfície.

#### 5.5. CLONAGEM DOS GENES *elt<sub>B</sub>* DELETADO E INTACTO NO VETOR DE EXPRESSÃO pKK2233.

Os genes *elt<sub>B</sub>* intacto e deletado foram extraídos dos plasmídios pSB1 e pSB2 respectivamente, por digestão com EcoRI e HindIII, purificados por eletroforese em agarose tipo VII e clonados no vetor de expressão pKK2233, digerido com as mesmas enzimas e defosforilado. Colônias bacterianas de *E. coli* JM109, isoladas em meio com ampicilina, após transformação utilizando as misturas de ligação, foram estocadas e analisadas quanto à presença dos fragmentos correspondentes. Duas dessas amostras foram caracterizadas como contendo os fragmentos e as análises do perfil plasmidial por eletroforese em gel de agarose (1,4%), após digestão com EcoRI e/ou HindIII estão demonstradas na Figura 8. Estes plasmídios foram denominados pSB3 e pSB4, correspondendo ao plasmídio pKK2233 contendo o gene *elt<sub>B</sub>* intacto e

digerido, respectivamente.

#### 5.6. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DAS CÉLULAS E DO SOBRENADANTE DAS CULTURAS CONTENDO PLASMÍDIOS pSB1 E pSB2.

Proteínas totais das células e do sobrenadante das culturas foram extraídas de amostras de *E. coli* JM109 portando os plasmídios pSB3, pSB4 e pKK2233. Extrações de proteínas da amostra JM109, não portando plasmídio, como também da linhagem de *E. coli* H10407, produtora padrão da toxina LT<sub>h</sub>, também foram efetuadas. Tais preparações foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e os padrões de bandas resultantes foram comparados. Como marcadores de pesos moleculares foi utilizada preparação purificada de toxina colérica e pesos moleculares do "kit" da "Sigma". A Figura 9 exibe gel de poliacrilamida (13%), referente às proteínas do sobrenadante produzidas por tais linhagens. Os padrões de bandas proteicas exibido pelas preparações de proteínas totais da célula não puderam ser analisados devido à incapacidade de diferenciação do grande número de bandas presentes (dados não mostrados).

Na Figura 9, pode-se observar a superprodução de polipeptídeo presente na amostra JM109 (pSB3) (canaleta 6) . O peso molecular deste polipeptídeo é próximo ao de CT<sub>B</sub> (aproximadamente 11.5kD). Um polipeptídeo com o mesmo padrão de migração também foi detectado na canaleta correspondente a linhagem H10407, produtora de LT. A ausência deste polipeptídeo no sobrenadante de amostras não portadoras de plasmídios ou, portadoras do plasmídio pKK2233, aliado a



proximidade, com relação ao peso molecular, esperado para a proteína LT<sub>B</sub>, exibido por este, são fortes evidências da correlação deste polipeptídeo à proteína LT<sub>B</sub>. Este fato também é forte evidência da capacidade de expressão do gene *elt<sub>B</sub>*, sobre o comando do promotor híbrido *tac* do vetor pKK2233.

A linhagem JM109 (pSB4) exibiu superprodução de polipeptídeo com peso molecular menor que CT<sub>B</sub> e do polipeptídeo expresso pela linhagem JM109 (pSB3). Este polipeptídeo também não é produzido pelas linhagens JM109 e JM109 (pKK2233). Estes resultados não só vieram corroborar com os resultados obtidos anteriormente, como também eram esperados. Teoricamente, o plasmídeo pSB4 é responsável pela expressão de polipeptídeo correspondente à subunidade B de LT, com a extremidade carboxi-terminal deletada e, portando, um polipeptídeo menor que LT<sub>B</sub> e CT<sub>B</sub>. O peso molecular deste foi calculado e esta próximo de 10.7kD

Uma última conclusão tirada desses experimentos está relacionado à atuação do ativador de transcrição IPTG sobre à expressão do gene *elt<sub>B</sub>*, sob o comando do promotor *tac* do plasmídeo pKK2233. O acréscimo de IPTG ao meio de cultura, por ocasião do preparo dos sobrenadantes das culturas bacterianas, não influenciou de maneira efetiva, na expressão do gene *elt<sub>B</sub>* nestas linhagens, sendo que, altos níveis de produção também foram verificados em preparações crescidas na ausência deste composto ativador.

### 5.7. DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE LT<sub>B</sub> ATRAVÉS DE TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS.

O teste de imuno-hemólise passiva (PIH) foi utilizada nas análises da produção e atividade de LT<sub>B</sub>, nos diferentes clones obtidos. Como controles, foram utilizadas linhagens de *E. coli* produtoras e não produtoras desta toxina. Os resultados obtidos com este teste estão expostos na Tabela 3.

### 5.8. ANÁLISE DA CAPACIDADE DAS PROTEÍNAS LT<sub>B</sub> INTACTA E DELETADA DE SEREM RECONHECIDAS E REAGIREM COM ANTICORPOS ANTI-LT<sub>B</sub>, DETECTADA ATRAVÉS DE "WESTERN BLOT".

Para as reações do "Western Blot" foram montados dois geis idênticos de SDS-PAGE (gel 13%) com a sequência de aplicação das amostras nas canaletas semelhante a apresentada na Figura 9. Todos os procedimentos seguiram metodologia descrita por SAMBROOK et al. (1989) e no item 4.27 de métodos.

Quando, para a realização das reações do "Western Blot" foi utilizado anticorpo anti-CT como anticorpo primário, não foi observada a precipitação de DAB em nenhuma região do filtro de nitrocelulose. Quanto anti-LT foi utilizado como anticorpo primário, foram observadas precipitações de DAB em diferentes regiões, mas que, no entanto, não correspondiam às bandas proteicas da proteína LT (tanto LT<sub>A</sub> como LT<sub>B</sub>). Se a reação se procedesse normalmente, seria esperada a precipitação de DAB nas regiões onde estivessem presentes a proteína LT<sub>B</sub>, produzida pelas amostras JM109 (pSB3) e H10407, e a proteína LT<sub>A</sub>, produzida por

esta última amostra. Eram esperadas também, reações de precipitação na canaleta 7, onde amostra de toxina colérica purificada foi aplicada. Nenhuma reação de precipitação foi verificada nestas regiões, no entanto.

A transferência das proteínas do gel SDS-PAGE para o filtro de nitrocelulose foi efetiva. A grande maioria das proteínas, incluindo as subunidades A e B da toxina LT e CT foram visualizadas no filtro de nitrocelulose após transferência e coloração com "Ponceau S". O gel de poliacrilamida utilizado para a transferência, após corado com prata e comparado com o gel controle, não apresentou estas proteínas que, desta forma, haviam sido transferidas para o filtro de nitrocelulose.

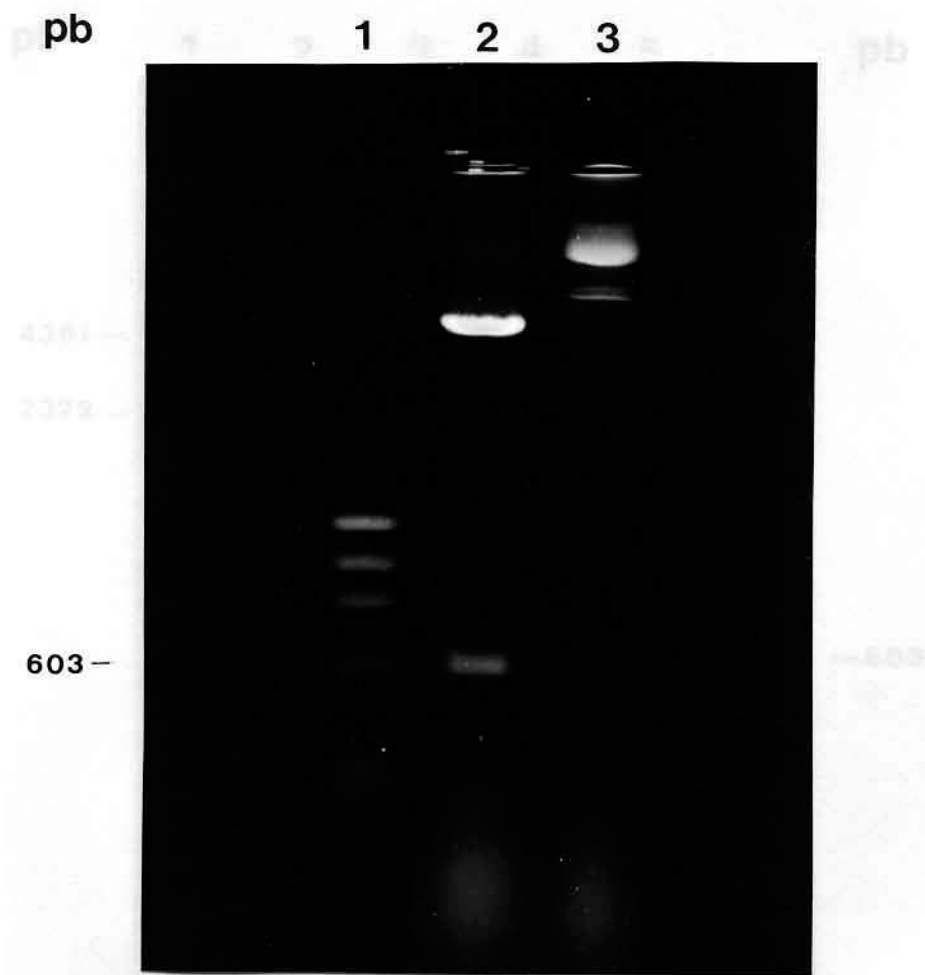


FIGURA 1- Eletroforese em gel de agarose (1,2%) demonstrando a digestão do plasmídeo pEWD2999 com as enzimas de restrição EcoRI e HindIII.

- 1- DNA fago  $\Phi$ X174 digerido com a enzima HaeIII.
- 2- Plasmídeo pEWD2999 digerido com EcoRI e HindIII.
- 3- Plasmídeo pEWD2999.

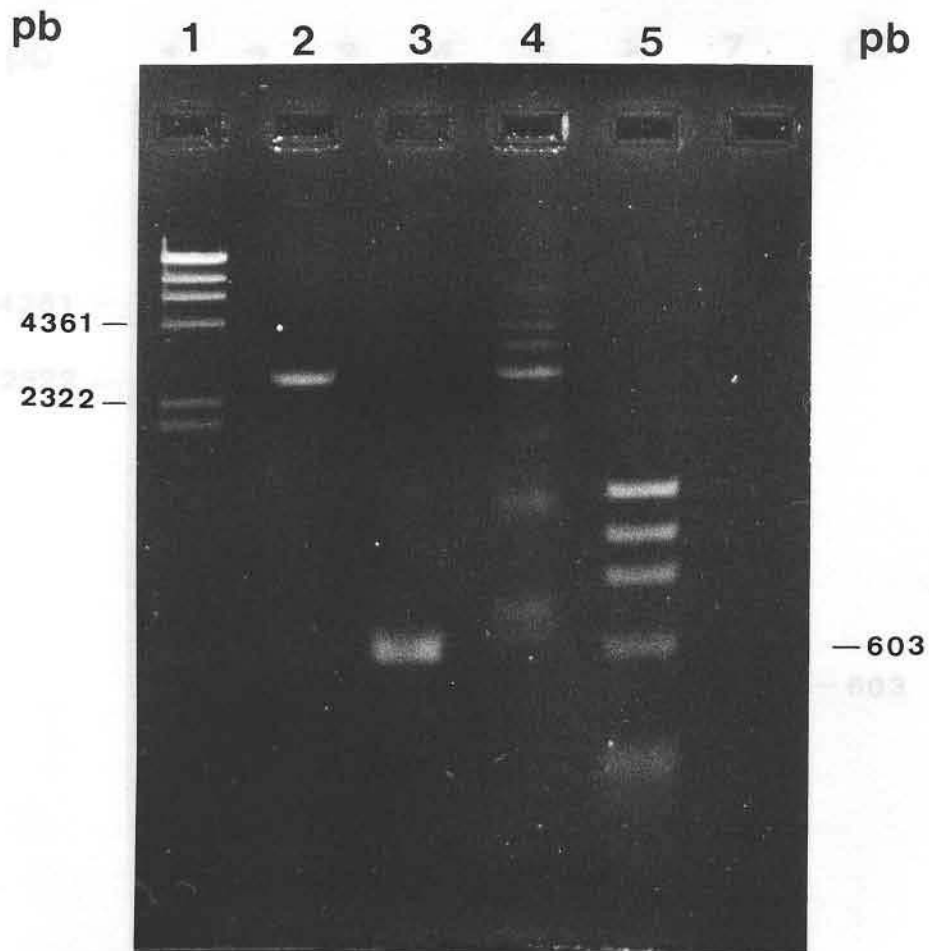


FIGURA 2- Eletroforese em gel de agarose (1,4%) demonstrando a ligação do fragmento de DNA contendo codificador do gene *LT<sub>B</sub>* (*elt<sub>B</sub>*) entre os sítios *EcoRI* e *HindIII* do vetor plasmidial pUC18.

- 1- DNA de fago  $\lambda$  digerido com *HindIII*.
- 2- Plasmídeo pUC18 digerido com *EcoRI* e *HindIII*.
- 3- Fragmento de DNA de 600 pb codificador de *LT<sub>B</sub>*.
- 4- Ligação entre o fragmento *LT<sub>B</sub>* e o vetor pUC18, ambos digeridos com *EcoRI* e *HindIII*.
- 5- DNA do fago  $\Phi$ x174 digerido com a enzima *HaeIII*.

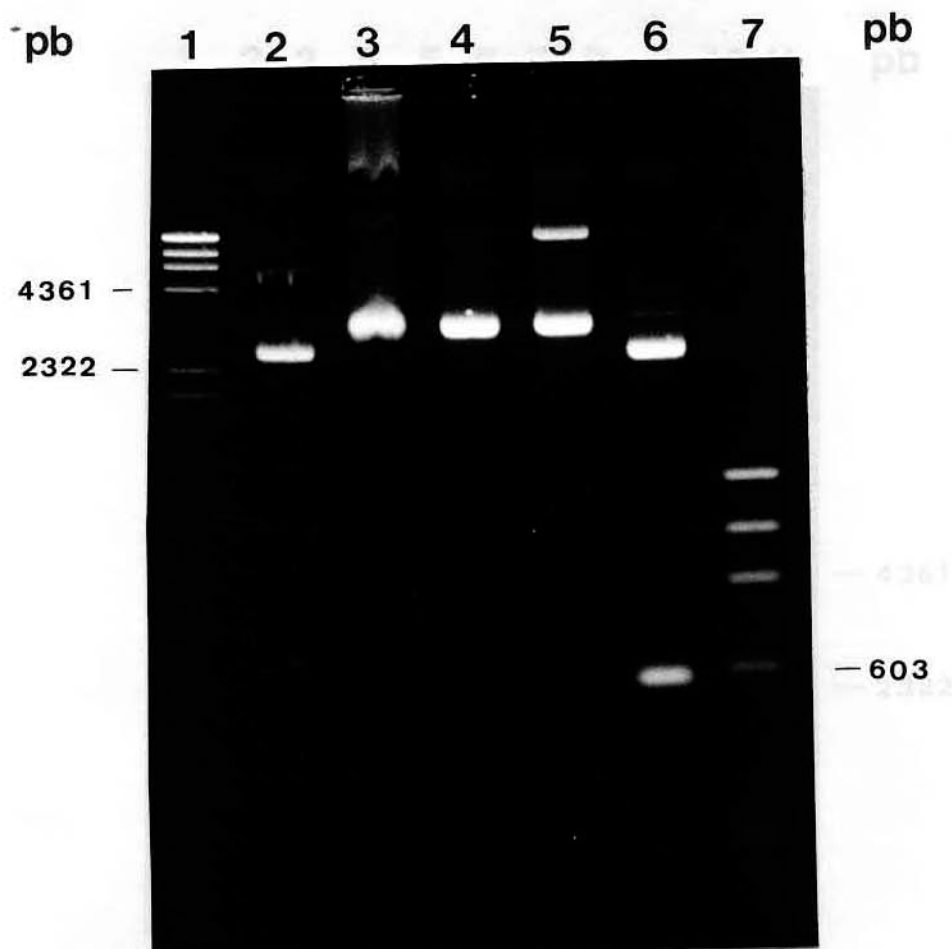


FIGURA 3- Eletroforese em gel de agarose (1,2%), demonstrando a clonagem do gene LT<sub>B</sub> no vetor plasmidial pUC18, construindo-se o plasmídeo pSB1

- 1- DNA do fago  $\lambda$  digerido com HindIII.
- 2- Plasmídeo pUC18 digerido com EcoRI e HindIII.
- 3- Plasmídeo pSB1.
- 4- Plasmídeo pSB1 digerido com EcoRI.
- 5- Plasmídeo pSB1 digerido com HindIII.
- 6- Plasmídeo pSB1 digerido com EcoRI e HindIII.
- 7- DNA de fago  $\Phi$ x174 digerido com HaeIII.

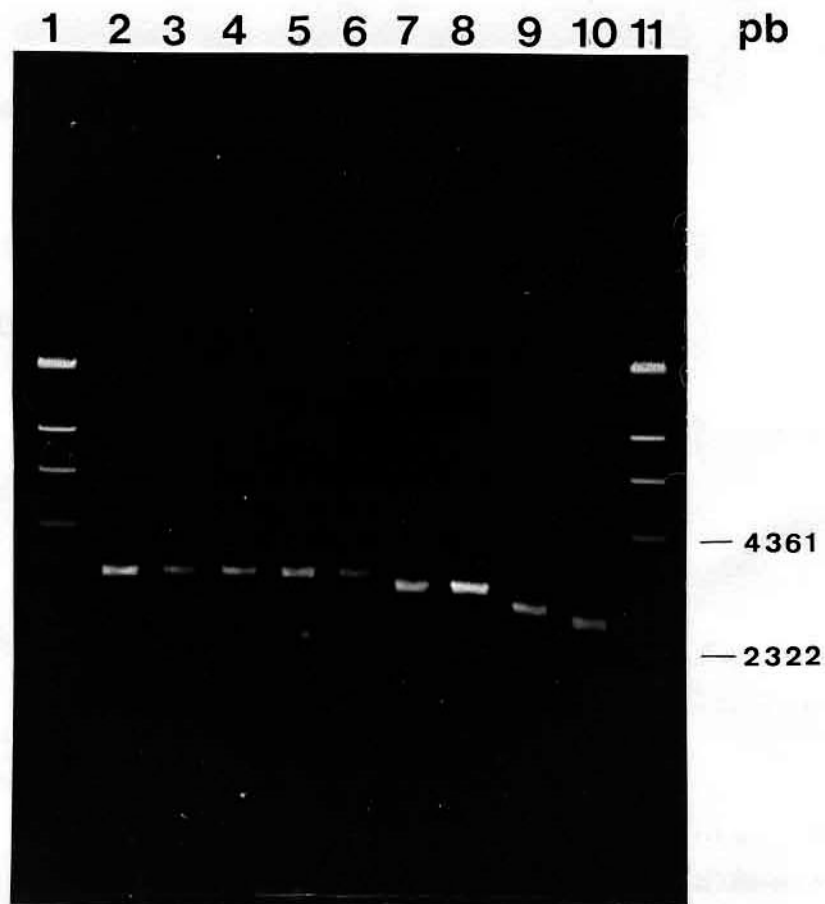


FIGURA 4- Eletroforese em gel de agarose (0,7%) demonstrando a digestão do plasmídeo pSBI a partir do sítio de restrição HindIII, com a enzima ExonucleaseIII (ExoIII), em diferentes tempos de reação.

- 1 e 11- DNA de fago  $\lambda$  digerido com HindIII.
- 2- Plasmídeo pSBI digerido com HindIII.
- 3 a 10- Plasmídeo pSBI digerido com HindIII obtidos após tratamento com EXOIII em diferentes tempos de reação.

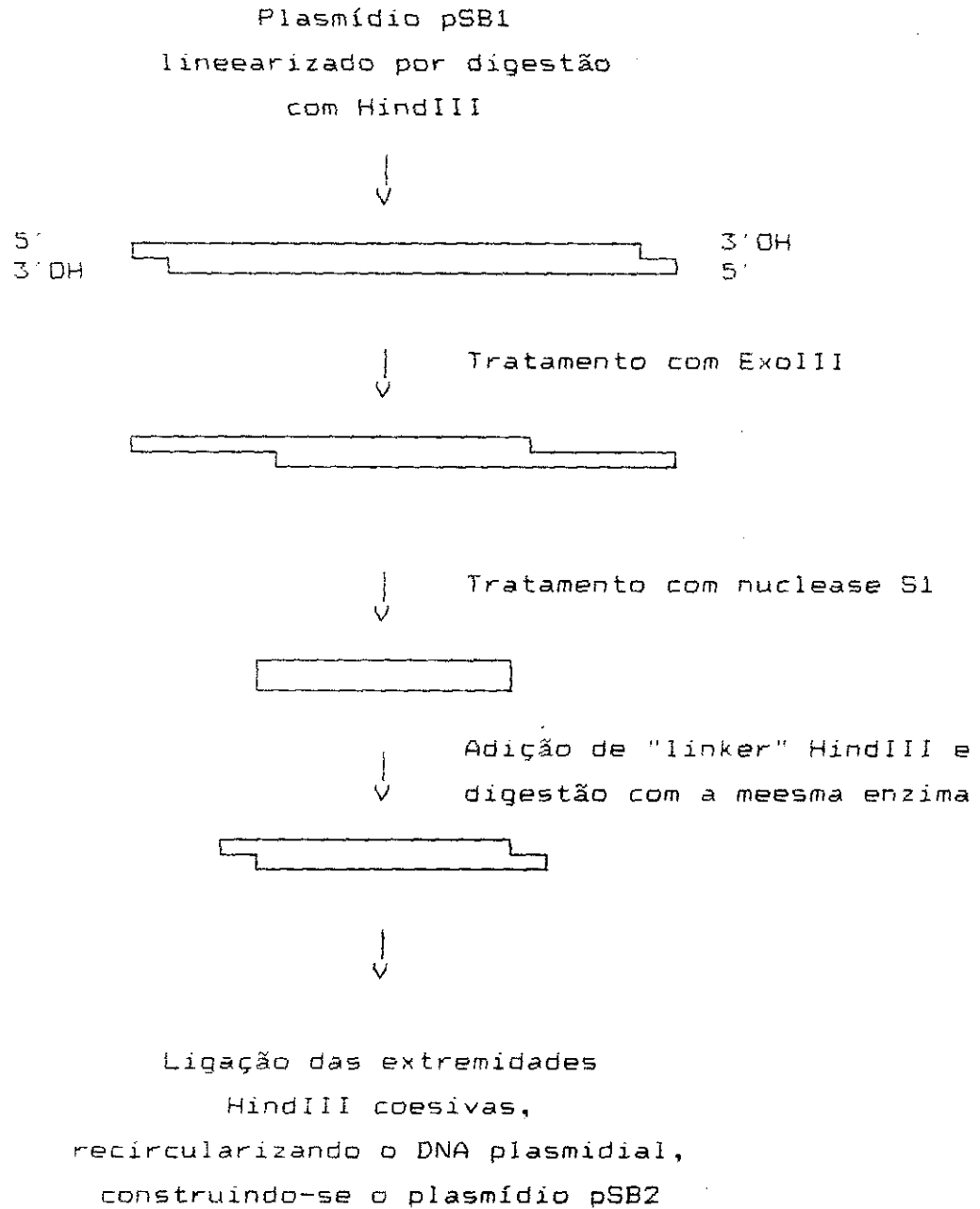


FIGURA 5- Esquema demonstrando a atividade da enzima Exonuclease III (ExoIII), associada ao tratamento com nuclease S1, utilizada para a deleção do gene *LT<sub>a</sub>*, presente no plasmídio pSB1



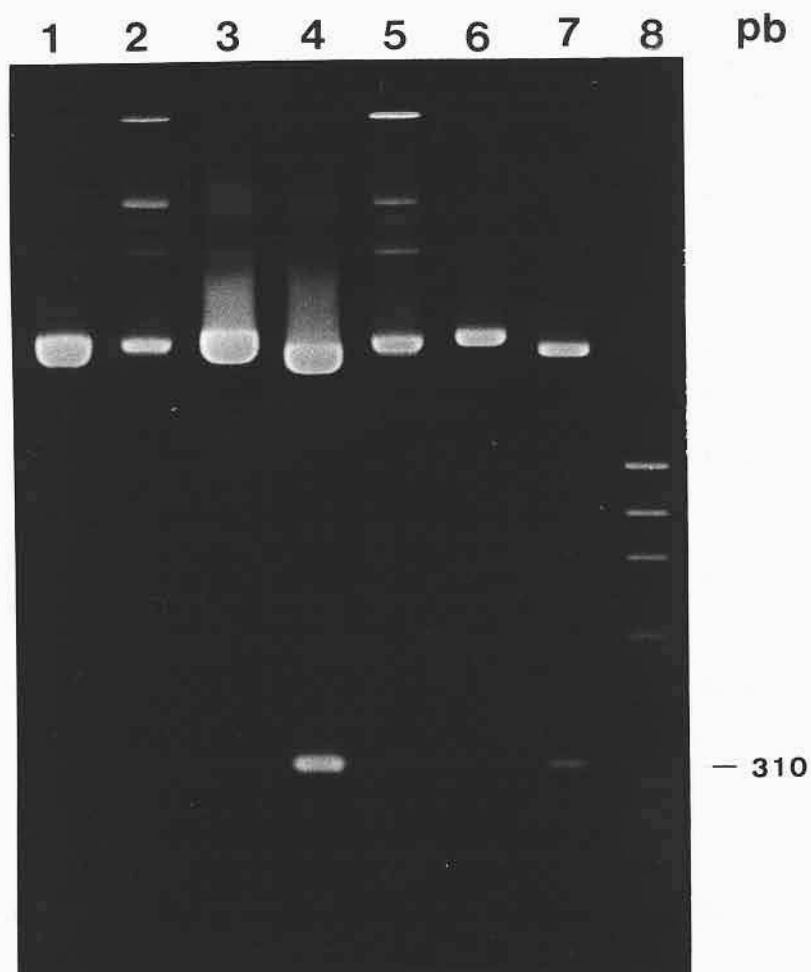


FIGURA 6- Eletroforese em gel de agarose (1,4%) demonstrando a clonagem do gene LT<sub>B</sub> deletado, após tratamento com a enzima ExoIII, no vetor plasmidial pUC18, construindo-se o plasmídio pSB2.

- 1- Plasmídio pUC18 digerido com EcoRI e HindIII.
- 2- Plasmídio pSB2.
- 3- Plasmídio pSB2 digerido com EcoRI.
- 4- Plasmídio pSB2 digerido com EcoRI e HindIII.
- 5- Plasmídio pSB21.
- 6- Plasmídio pSB21 digerido com EcoRI.
- 7- Plasmídio pSB21 digerido com EcoRI e HindIII.
- 8- DNA de fago  $\lambda$  digerido com HindIII.

ATG AAT AAA GTA AAA TGT TAT GTT TTA TTT ACG GCG TTA CTA TCC  
 TCT CTA TAT GCA CAC GGA GCT CCC CAG ACT ATT ACA GAA CTA TGT  
 TCG GAA TAT CGC AAC ACA CAA ATA TAT ACG ATA AAT GAC AAG ATA  
 CTA TCA TAT ACG GAA TCG ATG GCA GGC AAA AGA GAA ATG GTT ATC  
 ATT ACA TTT AAG AGC GGC GAA ACA TTT CAG GTC GAA GTC CCG GGC  
 AGT CAA CAT ATA GAC TCC CAG AAA AAA GCC ATT GAA AGG ATG AAG  
 GAC ACA TTA AGA ATC ACA TAT CTG ACC GAG ACC AAA ATT GAT AAA  
   ↑  
 TTA TGT GTA TGG AAT AAT AAA ACC CCC AAT TCA ATT GCG GCA ATC  
 AGT ATG AAA AAC TAG

FIGURA 7- Sequência nucleotídica da subunidade B da toxina termo-lábil (LTP) produzida por amostras de *Escherichia coli* de origem suína.

Nesta figura os códons de início e término da transcrição estão grifados. A seta indica o sítio exato atingido pelo tratamento com ExoIII, no fragmento LTP presente no plasmídio pSB4.

As primeiras 18 trincas de bases da extremidade amino-terminal codificam o peptídeo sinal.

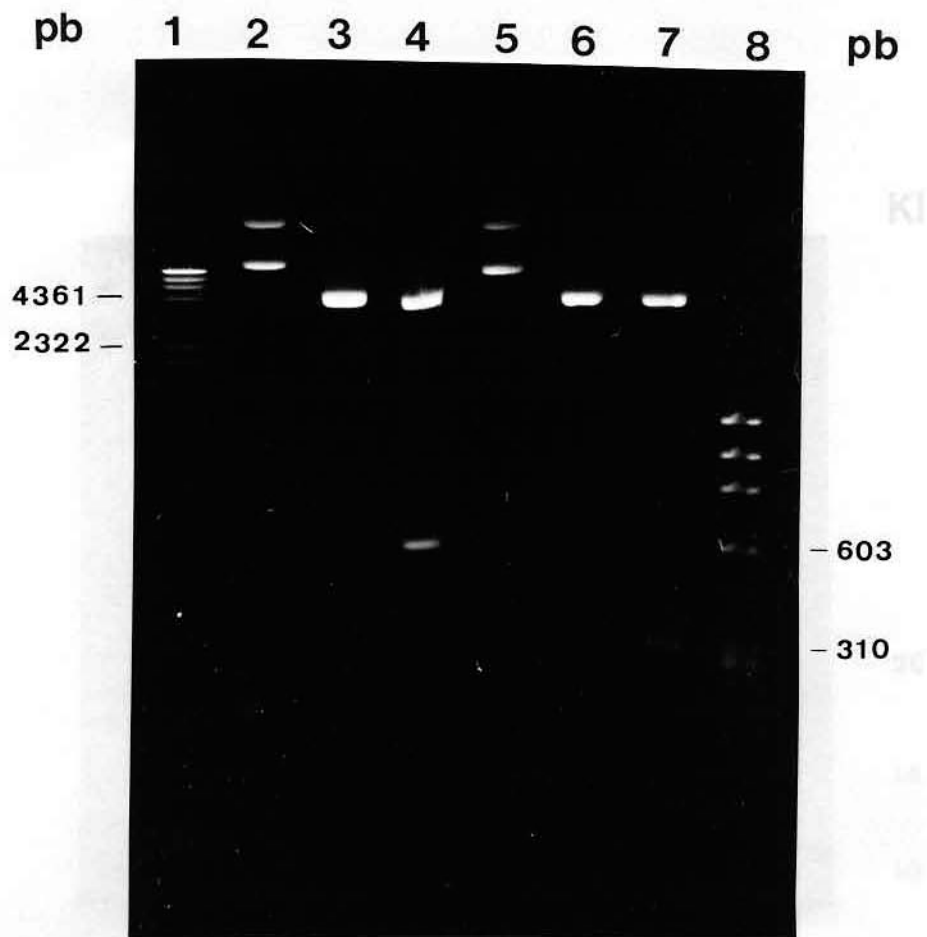


FIGURA 8- Eletroforese em gel de agarose (1,4%) demonstrando a clonagem dos genes LT<sub>B</sub> intacto e deletado no vetor de expressão plasmidial pKK2233, entre os sítios EcoRI e HindIII, construindo-se os plasmídios pSB3 e pSB4.

1- DNA do fago  $\lambda$  digerido com HindIII.

2- Plasmídio pSB3.

3- Plasmídio pSB3 digerido com EcoRI.

4- Plasmídio pSB3 digerido com EcoRI e HindIII.

5- Plasmídio pSB4.

6- Plasmídio pSB4 digerido com EcoRI.

7- Plasmídio pSB4 digerido com EcoRI e HindIII.

8- DNA do fago  $\Phi$ x174 digerido com HaeIII.

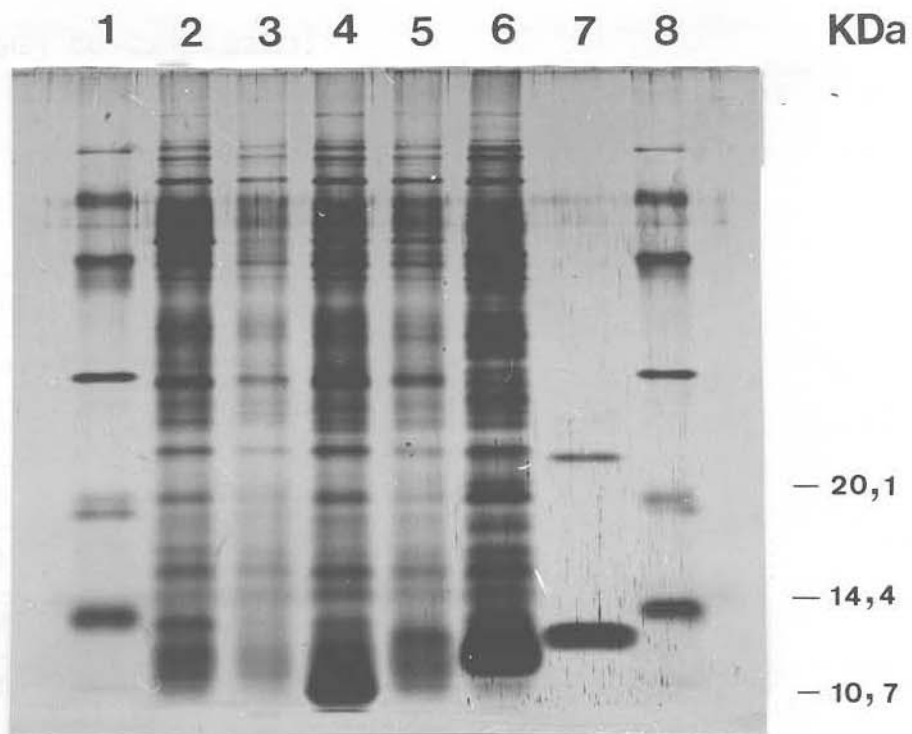


FIGURA 9- Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (13%) na presença de SDS para a detecção da produção e secreção da toxina LT no sobrenadante de culturas bacterianas.

1 e 8- Padrões de pesos moleculares.

2- Linhagem de *E. coli* JM109.

3- *E. coli* JM109 transformada com o plasmídeo pKK2233.

4- *E. coli* JM109 transformada com o plasmídeo pSB4.

5- *E. coli* JM109 transformada com o plasmídeo pSB3.

6- *E. coli* H10407, produtora padrão da toxina LT.

7- Toxina colérica purificada.

TABELA 4: DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DA SUBUNIDADE B DE LT EM DIFERENTES LINHAGENS DE *Escherichia coli* CONSTRUÍDAS POR CLONAGEM DO GENE *LT<sub>B</sub>* INTACTO OU DELETADO, EM DIFERENTES VETORES DE CLONAGEM OU EXPRESSÃO.

AMOSTRAS	RESULTADOS
JM109	-
JM109 (pKK2233)	-
JM109 (pKK2233)*	-
DH5 $\alpha$ (pSB1)	+
JM109 (pSB3)	+
JM109 (pSB3)*	+
JM109 (pSB4)	-
JM109 (pSB4)*	-
H10407	+

LEGENDA:

\*: Amostras crescidas em meio LB com IPTG.

OBSERVAÇÃO: A metodologia e os cálculos utilizados para a classificação das amostras como produtoras e não produtoras de LT e *LT<sub>B</sub>* estão descritas no item 4.26 de métodos.

## 6. DISCUSSÃO

A grande maioria das infecções bacterianas são multi-fatoriais, ou seja, vários fatores de patogenicidade estão envolvidos no desencadeamento da doença. Para uma vacina ser efetiva contra tais infecções, ela deve ativar efetivamente a resposta imunológica, tanto celular como humoral e, assim sendo, ativar a produção de anticorpos contra o maior número possível de epítopos, presentes em moléculas bacterianas importantes como fatores de patogenicidade.

A produção de anticorpos anti-toxinas é um importante componente da imunidade anti-bacteriana. Com relação à *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC), a produção de anticorpos anti-toxina termolábil (LT) e anti-toxina termo-estável (ST) por parte do hospedeiro imunizado, são importantes e vêm sendo utilizados no "design" de vacinas anti-ETEC. A associação destes antígenos toxóides com antígenos fimbrianos de ETEC, aumenta a efetividade das vacinas e promove a produção de anticorpos contra uma maior gama de linhagens de ETEC.

Com relação ao desenvolvimento de vacinas de subunidades contra ETEC, uma interessante linha de pesquisa é o desenvolvimento de genes híbridos entre as toxinas LT e ST. Como já mencionado, a toxina LT é composta por dois tipos de subunidades proteicas, LTA e LT<sub>B</sub>, sendo que ambas são imunogênicas. A toxina ST, por outro lado, é apenas fracamente imunogênica, em virtude de seu pequeno tamanho mas, pode adquirir imunogenicidade se acoplada a uma proteína carreadora. As subunidades proteicas que compõem a toxina LT são excelentes candidatas para esta finalidade. Diferentes fusões gênicas envolvendo sequências

codificadoras destas toxinas foram e estão sendo construídas, devido a seu grande potencial, no desenvolvimento de vacinas bacterianas (GUZMAN-VERDUZCO & KUPERSZTOCH, 1987; SANCHES ET AL., 1988; CLEMENTS, 1990; CLEMENTS & CARDENAS, 1990).

Em todas estas construções, o objetivo foi o desenvolvimento de vacinas contra infecções por amostras de ETEC e outros microrganismos em humanos. O desenvolvimento de vacinas animais, explorando os mesmos fatores e utilizando-se de linhas de pesquisas semelhantes foi e ainda é uma área pouco explorada, mas de grande importância. Tais abordagens podem ser utilizadas como modelos no desenvolvimento de vacinas humanas, como também têm sua importância no desenvolvimento de vacinas contra infecções bacterianas em animais, responsáveis por grandes prejuízos na criação destes. Além disto, em virtude das reações imunológicas cruzadas exibidas entre as toxinas de ETEC produzidas por amostras animais e humanas, vacinas produzidas com material biológico de linhagens de ETEC patogênicas para animais, podem ser, até certo ponto, utilizadas para imunização humana. Desta forma, o objetivo deste presente trabalho, foi a construção de um gene responsável pela expressão da subunidade B da toxina LT<sub>B</sub>, proveniente de amostras de ETEC de origem suína, capaz de ser utilizada como proteína carreadora de diferentes epítomos antigênicos, na construção de vacinas contra diferentes microrganismos patogênicos.

Para a construção desse gene carreador, o gene LT<sub>B</sub> foi subclonado no vetor pUC18, como um fragmento de aproximadamente 600 pares de bases (pb). Linhagens de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas com o plasmídeo resultante desta clonagem (pSB1) demonstraram a capacidade de produzir proteína LT<sub>B</sub>, verificada pelo teste de imuno-hemólise passiva (PIH). Esta observação indica que o gene LT<sub>B</sub>, inserido nos sítios EcoRI

e HindIII, pode ser expresso, a partir do promotor Lac presente neste vetor. Tais resultados também indicam que o peptídeo sinal presente no fragmento de 600pb codificador de LT<sub>B</sub> está funcional, já que o teste PIH é realizado a partir do sobrenadante de culturas bacterianas.

Na construção da proteína carreadora LT<sub>B</sub>, o códon de terminação TAG, foi retirado da porção carboxi-terminal por digestão com a enzima Exonuclease III (ExoIII). Dos 375 pb codificadores de LT<sub>B</sub>, 93 foram digeridos desta extremidade, o que, de certa forma, é um número excessivo de nucleotídeos extraídos. O conveniente seria o isolamento de clones apresentando deleções próximas ao códon TAG, mas onde este não estivesse presente. O isolamento desses clones ideais não foi possível porque a reação com ExoIII é de difícil controle, com relação à extensão da digestão e envolve uma série de exaustivas manipulações gênicas e a análise de um número grande de clones, que não foram obtidos dessa maneira. De qualquer forma, a maior parte dos nucleotídeos codificadores de LT<sub>B</sub> (282) estavam presentes no fragmento oriundo da digestão, e tal plasmídeo, pSB2, era um candidato atrativo para o objetivo proposto.

Na construção de um sistema carreador de epítomos baseado na proteína LT<sub>B</sub>, a produção de linhagens bacterianas que tenham a capacidade de produzir grandes quantidades de LT<sub>B</sub> são essenciais. Visando este objetivo, os fragmentos LT<sub>B</sub> intacto e digerido com ExoIII foram clonados no vetor de expressão de *E. coli* pKK2233. Este vetor foi escolhido por apresentar um forte promotor, o promotor trp-lac (tac). O promotor tac é um híbrido contendo a região -35 do promotor trp e a região -10, o sítio operador e a região de ligação do ribossomo (RBS) do promotor lac UV5. Além disso, este plasmídeo apresenta o potente terminador de transcrição rrnB. Os plasmídios resultantes dessas



construções foram denominados pSB3 e pSB4 e continham os fragmentos correspondentes ao gene LT<sub>B</sub> intacto e digerido, respectivamente.

Linhagens de *E. coli* JM109 foram transformadas com estes plasmídios e a produção de LT<sub>B</sub> foi analisada por SDS-PAGE e por PIH. Como discutido anteriormente, foram detectadas a superprodução de proteínas, verificadas nas amostras contendo os plasmídios pSB3 e 4 e não verificadas nas amostras onde estes plasmídios não estavam presentes. As amostras controle utilizadas foram a própria JM109 e a JM109 transformada com o plasmídio pKK2233. É muito grande a possibilidade destas proteínas produzidas pelos plasmídios pSB3 e 4, serem resultantes da expressão de LT<sub>B</sub> intacto e deletado. Um outro fato que corrobora com esta conclusão é a verificação que a proteína expressa a partir do plasmídio pSB4 apresenta peso molecular menor que a associada ao pSB3.

Quando verificada através de PIH, a produção de LT<sub>B</sub> foi positiva para os plasmídios pSB1 e pSB3, mas foi negativa para amostras de *E. coli* JM109 contendo o plasmídio pSB4. O teste de PIH é baseado na lise de hemácias provocada pela reação do anticorpo com o sistema complemento. O resultado negativo neste teste para a proteína LT<sub>B</sub> digerida não indica necessariamente que esta, não esteja sendo reconhecida por anticorpos anti-LT<sub>B</sub> ou CT<sub>B</sub> mas, pode ser o resultado da incapacidade desta proteína em se ligar a gangliosídeos GM1. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos por CLEMENTS (1990). Neste trabalho, a ligação de ST na extremidade carboxi-terminal de LT<sub>B</sub> impediu a ligação desta proteína híbrida a gangliosídeos GM1, resultados estes contrários aos relatados por SANCHES et al. (1988), onde a ligação de ST à extremidade amino-terminal de LT<sub>B</sub> não impediu a ligação desta proteína a esses receptores.

A produção da proteína LT<sub>B</sub> pelo plasmídeo pSB3 foi maior que a produzida pelo plasmídeo pSB1, resultados estes também esperados já que o promotor tac é mais forte que o promotor lac.

A adição de IPTG para a indução da expressão do promotor tac na produção das proteínas LT<sub>B</sub> intacta e deletada parece não ter influenciado consideravelmente a taxa de produção destas. Esta é uma observação curiosa, já que a linhagem JM109 produz altos níveis de inibidor de transcrição (produto do gene I).

Os resultados obtidos com "Western Blot" não foram bem sucedidos na tentativa de se demonstrar a reação entre a subunidade B de LT deletada e anticorpos anti-LT e anti-CT. Como mencionado no ítem 5.7 de resultados, não foi verificada reação de precipitação de DAB em regiões onde as subunidades da toxina LT estavam presentes. O aparecimento das bandas proteicas no filtro de nitrocelulose após coloração com "Ponceau S" descarta a possibilidade de não transferência das proteínas do gel para o filtro e, além disso, o gel de poliacrilamida utilizado para esta transferência, após coloração com prata, não apresentou um grande número de bandas proteicas, incluindo as bandas correspondentes às subunidades A e B da toxina LT, quando comparado com o gel controle, não submetido a transferência, o que, mais uma vez, comprova a transferência das proteínas para o filtro. Tendo em vista estes resultados, é muito provável que os anticorpos primários utilizados neste experimento (anti-LT e anti-CT) não foram capazes de reconhecer as toxinas LT e CT immobilizadas no filtro de nitrocelulose, o que explica os resultados negativos observados. Desta forma, a utilização e produção de anticorpos anti-LT ou CT ativos e funcionais são necessários, para a determinação da imunogenicidade de LT<sub>B</sub> digerida, o que será feito em breve.

A inclusão do fragmento LT<sub>B</sub> digerido no desenvolvimento de vacinas potenciais dependerá portanto, dos resultados obtidos em reações com anticorpos anti-LT ou anti-CT. Se for determinado que tal fragmento tem a capacidade de ativar a produção e ser reconhecido por tais anticorpos, epítomos antigênicos das mais variadas origens poderão ser ligados a extremidade 3' deste gene, expressos em grande quantidade a partir do vetor pKK2233. Proteínas obtidas desta forma, podem ser administrada via parenteral, em experimentos de imunização. Genes híbridos resultantes de tais construções, podem ainda, serem integrados no cromossomo de linhagens atenuadas de *Salmonella*, no desenvolvimento de vacinas vivas multifatoriais.

Um atrativo enfoque é a fusão do gene ST sintético à extremidade 3' do fragmento LT<sub>B</sub> digerido. A sequência nucleotídica do gene ST seria baseada na sequência descrita para ST produzido por amostras de *E. coli* de origem suína.

Uma ultima observação pode ser feita com relação à técnica utilizada para a deleção da extremidade carboxi-terminal do gene LT<sub>B</sub>. A técnica utilizada neste trabalho foi baseada nas atividades conjuntas das enzimas ExonucleaseIII e Nuclease S1. A enzima ExoIII é eficiente na digestão de fitas simples de DNA a partir de extremidades 3'OH livres, mas, em contrapartida, a atividade desta enzima, como já mencionada neste mesmo item, é de difícil monitoramento. no que diz respeito à extensão da digestão. Esta característica é indesejável quando relacionada à deleção do gene LT<sub>B</sub> pois, a deleção de grandes extensões deste gene pode eliminar importantes epítomos antigênicos e influenciar consideravelmente a estrutura secundária desta proteína. Desta forma, técnicas mais precisas poderiam ser utilizadas com este intuito. Uma boa sugestão é a utilização da técnica de PCR ("polimerase

chain reaction") para a amplificação de sequência nucleotídica do gene *LTB*, onde o códon de terminação TAG não estivesse presente. A utilização desta técnica para esta finalidade já vem sendo estudada e poderá ser utilizada em breve.

## 7. RESUMO

As amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC) representam um dos principais grupos bacterianos causadores de diarreia em humanos, bovinos e suínos. Muitas dessas amostras têm a capacidade de produzir uma potente enterotoxina denominada toxina termo-lábil (LT). Esta toxina é composta por dois tipos de subunidades proteicas, A e B, onde cinco subunidades B estão ligadas à uma subunidade A na formação da holotoxina.

Algumas características da subunidade B (LT<sub>B</sub>) são de grande interesse para o desenvolvimento de vacinas de subunidades contra ETEC e outros microrganismos. Este peptídeo é imunogênico, não tóxico e apresenta a capacidade de se ligar a receptores celulares localizados na mucosa intestinal. Desta forma, o peptídeo LT<sub>B</sub> é um bom carreador de diferentes epítomos antigênicos.

Neste trabalho o gene LT<sub>B</sub> de amostras de ETEC de origem suína foi subclonado no plasmídeo pUC18, originando o plasmídeo denominado pSB1. O gene LT<sub>B</sub> presente neste plasmídeo, foi então modificado por técnicas de DNA recombinante para ser utilizado como carreador de epítomos antigênicos. Estas modificações envolveram a deleção do codon de terminação "TAG" da extremidade 3'-OH deste. As enzimas Exonuclease III e nuclease S1 foram utilizadas com esta finalidade. Após este tratamento, um plasmídeo batizado de pSB2 foi identificado, através de sequenciamento de DNA, como portador de gene LT<sub>B</sub> apresentando a deleção que envolvia o codon de terminação.

Os genes LT<sub>B</sub> intacto e deletado foram subclonados no vetor de expressão pKK223-3. No sobrenadante de culturas de *E. coli* JM109

transformadas com estes plasmídios (denominados pSB3 e 4 respectivamente) foi verificada, por SDS-PAGE, a superprodução das proteínas correspondentes a estes genes. A proteína LT<sub>B</sub> nativa foi ativa no teste de Imuno-hemólise passiva (PIH), ao contrário da proteína deletada. Este resultado era esperado, já que a extremidade carboxi-terminal parece estar envolvida na ligação aos receptores em hemácias de carneiro.

Não foi possível até o momento determinar se o peptídeo LT<sub>B</sub> deletado é capaz de ser reconhecido por anticorpos anti-LT ou anti-CT, o que será realizado em um futuro próximo.

## 8. SUMMARY

The enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is one of the major causes of diarrheal diseases in humans, calves and pigs. Many strains of ETEC can produce a potent enterotoxin called heat-labile (LT toxin). This toxin is composed by two types of proteic subunits, A and B. In the active holotoxin, five B subunits are bound to one A subunit.

Some features of the B subunit (LT<sub>B</sub>) could be used to develop subunit vaccines against ETEC and others microorganisms. This peptide is immunogenic, non-toxic and it exhibit the capability to bind at cellular receptors in the intestinal mucosa. Therefore, LT<sub>B</sub> peptide is a good carrier for different antigenic epitopes.

In this work, the LT<sub>B</sub> gene from pigs ETEC strains was subcloned in pUC18 plasmid. This quimeric plasmid was called pSB1. This gene was modified by DNA manipulation technology to be used as carrier of different epitopes. This modification was the was deletion of the stop codon "TAG" from 3'-OH end. The Exonuclease III and S1 nuclease enzymes were used for this. A plasmid called pSB2 was identified by DNA sequencing analysis where a deleted LT<sub>B</sub> was present and the "TAG" was absent.

The intact and deleted LT<sub>B</sub> genes were subcloned in expression vector pKK223-3 and the resultants plasmids were called pSB3 and pSB4 respectively. In the supernatant of *E.coli* strain JM109 transformed with these plasmid was observed the overproduction of the correspondent proteins by SDS-PAGE. The wild LT<sub>B</sub> protein was active in passive immune hemolysis test (PIH) but the deleted LT<sub>B</sub> protein was inactive. This was expected because the LT<sub>B</sub> carboxi-terminal end

probably is important for binding to receptors on the sheep erithrocytes surface.

It were not possible to demonstrate if the deleted LT $\alpha$  peptide is recognize for anti-LT or anti-CT antibodies. This will be analysed in the future.



## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHTMAN, M.; HEUZENROEDER, M.; KUSECEK, B.; OCHMAN, H.; CAUGANT, D.; SELANDER, R.K.; VÄISÄNEN-RHEN, V.; KORHONEN, T.K.; STUART, S.; ORSKOV, S. & ORSKOV, I. 1986. Clonal analysis of *Escherichia coli* O2:K1 isolated from diseased humans and animals. *Infect. Immun.* **51**: 268-76.

ACHTMAN, M.; MERCER, A.; KUSECEK, B.; POHL, A.; HEUZENROEDER, M.; AARONSON, W.; SUTTON, A. & SILVER, R.P. 1983. Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. *Infect. Immun.* **39**: 315-35.

ACHTMAN, M. & PLUSCHKE, G. 1986. Clonal analysis of descent and virulence among selected *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Microbiol.* **40**: 185-210.

ACRES, D.S.; ISAACSON, R.E.; BABICK, L.A. & KAPITANY, R.A. 1979. Immunization of calves against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with purified K99 antigen and whole cell bacterins. *Infect. Immun.* **25**: 121-126.

AMANN, E.; BROSIUS, J.; & PTASHNE, M. 1983. Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene.*

25: 167-78.

ARP, L.H. & JENSEN, A.E. 1980. Piliation, hemagglutination, motility, and generation time of *Escherichia coli* that are virulent and avirulent in turkeys. Avian. Dis. 24: 153-61.

BALDINI, M.M.; KAPER, J.B.; LEVINE, M.M.; CANDY, D.C.A. & MOON, H.W. 1983. Plasmid mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2: 534-8.

BALDWIN, T.J.; BROOKS, S.F.; KNUTTON, S.; MANJARREZ HERNANDEZ, H.A.; AITKEN, A. & WILLIAMS, P.H. 1990. Protein phosphorylation by protein kinase c in HEp-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 58: 7661-65.

BERTSCHINGER, H.U. & POHLENZ, J. 198. Coliform mastitis. In: Disease in swine, 5<sup>th</sup> ed., cap. 46, pp. 491-96, The Iowa State University Press.

BETLEY, M.J.; MILLER, V.L. & MIKELANOS, J.J. 1986. Genetic of bacterial enterotoxins. Ann. Rev. Microbiol. 40: 577-608.

BLACK, R.E.; BROWN, K.H. & BECKER, S. 1984. Effects of diarrhea associated with specific enteropathogens on the

growth of children in Bangladesh. *Pediatrics*. 73: 799-805.

BLACK, R.E.; BROWN, K.H.; BECKER, S.; ABDUL ALIM, A.R.M. & HUG, I. 1982. Longitudinal studies of infectious diseases and physical growth of children in rural Bangladesh. II. Incidence of diarrheal and association with known pathogens. *Am. J. Epidemiol.* 115: 314-24.

BLUM, H.; BIER, H. & GROSS, H.J. 1987. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis*. 8: 93-99.

BOPP, C.A.; GREENE, K.D.; DOWNES, F.P.; SOWENS, E.G.; WELLS, J.E. & WACHSMUTH, I.K. 1987. Unusual verotoxin producing *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1486-89.

BOYLAN, M.; COLEMAN, C.D. & SMYTH, C.J. 1987. Molecular cloning and characterization of the genetics determinant encoding CS3 fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiol. Pathogen.* 2: 195-209.

CARTER, P.B. & COLLINS, F.M. 1974. The route of enteric infection in normal mice. *J. Exp. Med.* 136: 1189-1203.

CAUGANT, D.A.; LEVIN, B.R.; ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; SVANBORG-ÉDEN, C. & SELANDER, R.K. 1985. Genetic

- diversity to serotype in *Escherichia coli*. Infect. Immun. **49**: 407-13.
- CHANG, P.P.; MOSS, J.; TWIDDY, E.M. & HOLMES, R.K. 1987. Type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* activates adenylate cyclase in human fibroblast by ADP ribosylation. Infect. Immun. **55**: 529-36.
- CHART, H.; SCOTLAND, S.M.; WILLSHAW, G.A. & ROWE, B. 1988. adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells. J. Gen. Microbiol. **134**: 1315-21.
- CHEN, T.M.; MAZAITIS, A.J. & MAAS, W.K. 1985. Construction of a conjugative plasmid with a potential use in vaccines against heat-labile enterotoxin. Infect. Immun. **47**: 5-10.
- CLEARY, T.G.; MATHEWSON, J.J.; FARIS, E. & PICKERING, L.K. 1985. Shiga-like citotoxin production by enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. Infect. Immun. **47**: 335-37.
- CLOUD, S.S.; ROSEMBERG, J.K.; FRIES, P.A.; WILSON, R.A. & ODOR, E.M. 1986. In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli* I. Serotypes, metabolic activity and antibiotic sensitivity. Avian. Dis. **29**: 1084-93.

CLEMENTS, J.D. 1990. Construction of a nontoxic fusion peptide for immunization against *Escherichia coli* strains that produce heat-labile and heat-stable enterotoxins. *Infect. Immun.* **58**: 1159-66.

CLEMENTS, J.D. & CARDENAS, L. 1990. Vaccines against enterotoxigenic bacterial pathogens based on hybrid *Salmonella* that express heterologous antigens. *Res. Microbiol.* **141**: 981-93.

CLEMENTS, J.D. & EL-MORSHIDY, S. 1984. Construction of a potential live oral bivalent vaccine for typhoid fever and cholera-*Escherichia coli* related diarrheas. *Infect. Immun.* **46**: 564-69.

CLEMENTS, J.D.; FLINT, D.C.; ENGERT, R.F. & KLIPSTEIN, F.A. 1983. Cloning and molecular characterization of the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* **40**: 653-58.

CLEMENTS, J.D.; LYON, F.L.; KARIN, L.; LOWE, F.; ALLEN, L. & EL-MORSHIDY, S. 1986. Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella enteritidis* containing a recombinant plasmid which codes for production of the B subunit of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin. *Infection. and Immun.* **53**: 685-692.

CLEMENTS, J.D.; SACK, D.A. & HARRIS, J. 1988.  
Cross-protection by B subunit-whole cell cholerae  
vaccine against diarrhea associated with heat-labile  
toxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli*:  
results of a large scale-field trial. J. Infect. Dis.  
**158**: 372-77.

CLEMENTS, J.D.; YANCEY, R.J. & FINKELSTEIN, R.A. 1980.  
Properties of homogenous heat-labile enterotoxin from  
*Escherichia coli*. Infect. Immun. **29**: 91-7.

CRAVIOTO, A.; GROSS, R.J.; SCOTLAND, S.M. & ROWE, B. 1979.  
An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli*  
belonging to the traditional infantile enteropathogenic  
serotypes. Curr. Microbiol. **3**: 95-99.

CRAVIOTO, A. SCOTLAND, S.M. & ROWE, B. 1982.  
Hemagglutination activity and colonization factor  
antigens I and II in enterotoxigenic strains of  
*Escherichia coli* isolated from humans. Infect. Immun.  
**36**: 189-97.

CROSS, A.S.; KIM, K.S.; WRIGHT, D.C.; SADOFF, J.C. &  
GENSKI, P. 1986. Role of lipopolysaccharide and cpsule  
in the serum resistance of bacteremic strains of  
*Escherichia coli*. J. Infect. Dis. **154**: 497-503.

- CURTISS III, R.; GOLDSCHMIDT, R.M.; FLETCHALL, N.B. & KELLY, S.M. 1988. Avirulent *Salmonella typhimurium* delta cya crp oral vaccine strains expressing a streptococcal colonization and virulence antigen. *Vaccine*. **6**: 155-60.
- CURTISS III, R.; GALAN, J.E.; NAKAYAMA, K. & KELLY, S.M. 1990. Stabilization of recombinant avirulent vaccine strains in vivo. *Res. Microbiol. Immunol.* **141**: 797-805.
- CURTISS III, R. & KELLY, S.M. 1987. *Salmonella typhimurium* deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and immunogenic. *Infect. Immun.* **55**: 3035-43.
- CURTISS III, R.; KELLY, S.M.; GULIG, P.A. & NAKAYAMA, K. 1989. Selective delivery of antigens by recombinant bacteria. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **146**: 35-49.
- CZERKINSKY, C.; SVENNERHOLM, A.M.; OUIDING, M.; JONSSON, R. & HOLMGREN, J. 1991. Antibody-producing cells in peripheral blood and salivary glands after oral cholera vaccination of humans. *Infect. Immun.* **59**: 996-1001.
- DALLAS, W.S. & FALKOW, S. 1979. The molecular nature of heat-labile enterotoxin (LT) of *Escherichia coli*. *Nature*. **277**: 406-407.

- DALLAS, W.S. & FALKOW, S. 1980. Amino acid sequence homology between cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin. *Nature*. 288: 499-501.
- DALLAS, W.S.; GILL, D.M. & FALKOW, S. 1979. Cistrons encoding *Escherichia coli* heat-labile toxin. *J. Bacteriol.* 139: 850-58.
- DE GRAAF, F.K.; KRENN, B.E. & KLASSEN, P. 1984. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of K99 fimbriae. *Infect. Immun.* 43: 508-14.
- DE GRAAF, F.K. & ROORDA, I. 1982. Production, purification and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from the calf enteropathogenic *Escherichia coli* strain B41M. *Infect. Immun.* 36: 751-753.
- DRASAR, B.S. & HILL, M.J. 1974. Human intestinal flora. The distribution of bacterial flora in the intestine. London, Academic Press. pp. 36-43.
- DORMAN, C.J.; CHATFIELD, S.; HIGGINS, C.F.; HAYWARD, C. & DOUGAN, G. 1989. Characterization of porin and ompR mutants of virulent strain of *Salmonella typhimurium*: ompR mutants are attenuated in vivo. *Infect. Immun.* 57: 2136-40.



- DOUGAN, G.; CHATFIELD, S.; PICKARD, D.; BESTER, J.; O'CALLAGHAM, D. & MASKELL, D. 1988. Construction and characterization of vaccine strains of *Salmonella* harbouring mutations in two different *aro* genes. *J. Infect. Dis.* **158**: 1329-35.
- DOUGAN, G.; SELLWOOD, R.; MASKELL, D.; SWEENEY, K.; LIEW, F.Y.; BEESLEY, J. & HORMAECHE, C. 1986. In vivo properties of a cloned K88 adherence antigen determinant. *Infect. Immun.* **52**: 344-47.
- DUGUID, J.P.; SMITH, W.; DEMPSTER, G. & EDMUNDS, P.N. 1955. Non flagellar filamentous appendages (fimbrial) and hemagglutinating activity in bacterium *coli*. *J. Pathol. Bacteriol.* **70**: 335-348.
- DU PONT, H.L.; FORMAL, S.B.; HORNICK, R.B.; SNYDER, M.J.; LIBONATI, J.P.; SHEAHAN, D.G.; LA BREC, E.H. & KALAS, J.P. 1971. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *N. Engl. J. Med.* **285**: 1-9.
- DU PONT, H.L.; OLARTE, J.; EVANS, D.G.; PICKERING, L.K.; GALINDO, E. & EVANS, D.J. 1976. Comparative susceptibility of latin American and United States students to enteric pathogens. *N. Engl. J. Med.* **295**: 1520-21.
- DYKES, C.W.; HALLIDAY, I.J.; HOB DEN, A.N.; READ, M.J. & HARFORD, S. 1985. A comparison of the nucleotide

sequence of the A subunit of heat-labile enterotoxin and cholera toxin. FEMS Microbiol. Letters. 26: 171-74.

ESCHEVERRIA, P.D.; CHANG, C.P.; SMITH, D. & ANDERSON, G.L. 1976. Enterotoxigenicity and invasive capacity of enteropathogenic serotypes of *Escherichia coli*. J. Pediatr. 89: 8-10.

ESCHEVERRIA, P.; ORSKOV, F.; ORSKOV, I. & PLIAMBANGCHANG, D. 1982. Sorotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* in Thailand and the Philippines. Infect. Immun. 36: 851-56.

EVANS, D.G. & EVANS, D.J. 1978. New surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/I) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups 06 and 08. Infect. Immun. 21: 638-647.

EVANS, D.G.; EVANS, D.J.Jr. & GORBACH, S.L. 1973. Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. Infect. Immun. 8: 725-30.

EVANS, D.G.; GRAHAN, D.Y. & EVANS, D.J.Jr. 1984. Administration of purified colonization factor antigens CFA/I, CFA/II of enterotoxigenic *Escherichia coli* to volunteers. Response to challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. Gastroenterology. 87: 934-40.

- EVANS, D.G.; SILVER, R.P.; EVANS, D.J.; CHASE, D.G.;  
& GORBACH, S.L. 1975. Plasmid-controlled colonization  
factor associated with virulence in *Escherichia coli*  
enterotoxigenic for humans. *Infect. Immun.* 12: 656-667.
- FAIRBROTHER, J.M.; LARIVIÈRE, S. & LALLIER, R. 1986. New  
fimbrial antigen F165 from *Escherichia coli* serogroup  
O115 strains isolated from piglets with diarrhea.  
*Infect. Immun.* 51: 10-15.
- FIELD, M.; GRAF, L.H.; LAIRD, W.J. & SMITH, P.L. 1978.  
Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: in vitro  
effects on guanylate cyclase activity, cGMP  
concentration, and ion transport in small intestine.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 2800-4.
- FIELDS, P.I.; GROISMAN, E.A. & HEFRON, F. 1989. A  
*Salmonella* locus that controls resistance to  
microbiocidal proteins from phagocytic cells. 243:  
1059-62.
- FONDACARO, J.D. 1986. Intestinal ion transport and  
diarrheal disease. *Am. J. Physiol.* 250: G1-G8.
- FONDACARO, J.D. & HENDERSON, L.S. 1985. Evidence for  
protein kinase C as a regulator of intestinal  
electrolyte transport. *J. Physiol.* 249: G422-G426.

- FRANCIS, D.H. & WILLGOHS, J.A. 1991. Evaluation of a live avirulent *Escherichia coli* vaccine for K88<sup>+</sup>; LT<sup>+</sup> enterotoxigenic colibacillosis in weaned pigs. Am. J. Vet. Res. 52: 1051-55.
- FRANTZ, J.C.; JASO-FRIEDMAN, L. & ROBERTSON, D.C. 1984. Biding of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to rat intestinal cells and brush border membranes. Infect. Immun. 43: 622-30.
- FRANTZ, J.C. & ROBERTSON, D.C. 1981. Immunological properties of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins: development of radioimmunoassay specific of heat-stable enterotoxins with suckling mouse activity. Infect. Immun. 33: 193-98.
- GAASTRA, W. & DE GRAAF, F.K. 1982. Host specific fimbrial adhesive of man invasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Microbiol. Rev. 46: 129-61.
- GANNON, V.P.J. & GYLES, C.L. 1987. Four types of *Escherichia coli* verotoxins. Abstracts of An International Symposium and Workshop on Verocitotoxin-Producing *Escherichia coli* Infections., Toronto, Abstracts, STF-15.
- GARIEPY, J.; JUD, A. & SCHOOLNIK, G.K. 1987. Importance of disulfide bridges in the structure and activity of

*Escherichia coli* enterotoxin ST1B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **84**: 8907-11.

GARIEPY, J.; LANE, A.; FRAYMAN, F.; WILBUR, D.; ROBIEN, W.; SCHOOLNIK, G.K. & JARDETZKY, O. 1986. Structure of the toxin domain of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin ST1. Biochemistry. **25**: 7854-66.

GARIEPY, J. & SCHOOLNIK, G.K. 1986. Design of a photoreactive analogue of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin ST1b: use in identifying its receptor on rat brush border membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **83**: 483-87.

GATTI, M.S.V.; SERAFIM, M.B.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; BRITO, J.R.F. & BARCELOS, D.E.S.N. 1985. Fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênicas para suínos no Brasil. Rev. Microbiol. **16**: 21-30.

GERMANIER, R. & FURER, E. 1975. Isolation and characterization of gal E mutant Ty21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live oral typhoid vaccine. J. Infect. Dis. **141**: 553-58.

GIANNELLA, R.A.; DRAKE, K.W. & LUTRELL, M. 1981. Development of a radioimmunoassay for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin: comparison with the suckling

- mouse bioassay. *Infect. Immun.* **33**: 186-92.
- GILL, D.M. & RICHARDSON, S.H. 1980. Adenosine diphosphate-ribosylation of adenylate cyclase catalysed by heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* **33**: 677-82.
- GOLDSCHIMIDT, M.C. & DU PONT, H.L. 1976. Enteropathogenic *Escherichia coli*: lack of correlation of serotype with pathogenicity. *J. Infect. Dis.* **133**: 153-56.
- GONZALES, E.A. & BLANCO, J. 1977. Propriedades de las *Escherichia coli* causantes de diarrea en seres humanos. *E.coli* enterotoxigenicas (ETEC), enteropat6genos cl6ssicos (EPEC) y enteroinvasivos (EIEC). EDITA, Universidad de Santiago de Compostela, Espanha.
- GRANSDEN, W.R.; DAMM, M.A.S.; ANDERSON, J.D.; CARTER, J.E. & LIOR, H. Further evidence associating hemolytic uremic syndrome with infection by verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *J. Infect. Dis.* **154**: 522-4.
- GRAY, W.R.; LUQUE, A. & OLIVEIRA, B.M. 1981. Peptide toxins from *Conus geographus* venom. *J. Biol. Chem.* **256**: 4734-40.
- GREEN, B.A.; NEILL, R.J.; RUYECHAN, W.T. & HOLMES, R.U. 1983. Evidence that new enterotoxin of *Escherichia coli* which activates aderylate cyclase in eucariotic target cells is not plasmid mediated. *Infection and Immun.* **42**:

393-390.

GREEN, C.P. & THOMAS, V.L. 1981. Hemagglutination of human type O erythrocytes, hemolysin production, and serogrouping of *Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis, and asymptomatic bacteriuria. *Infect. Immun.* 31: 309-15.

GUINEE, P.A.M. & JANSEN, W.H. 1979. Behavioral of *Escherichia coli* K antigens K88ab, K88ac, and K88ad in immunoelectrophoresis, double diffusion, and hemagglutination. *Infect. Immun.* 23: 700-705.

GURWITH, M.J.; WISEMAN, D.A. & CHOW, P. 1977. Clinical and laboratory assesment of the pathogenicity of serotype of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 135: 736-43.

GUTH, B.E.C.; TWIDDY, E.M.; TRABULSI, L.R. & HOLMES, R.K. 1986. Variation in chemical properties and antigenic determinants among type II heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 54: 529-36.

GUZMAN-VERDUZCO, L.M. & KUPERSZTOCH, Y.M. 1987. Fusion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and heat-labile enterotoxin B subunit. *J. Bacteriol.* 169: 5201-08.

- GYMAH, J.E & PANIGRAHY, B. 1988. Adhesin-receptor interaction mediating the attachment of pathogenic *Escherichia coli* to chicken tracheal epithelium. Avian. Dis. 32: 74-8.
- HALE, T.L.; SANSONETTI, P.J.; SCHAD, P.A.; AUSTIN, S. & FORMAL, S.B. 1983. Characterization of virulence plasmids and plasmid-associated outer membrane proteins in *Shigella flexneri*, *S. sonnei* and *Escherichia coli*. Infect. Immun. 40: 340-50.
- HANAHAN, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biology. 166: 557-80.
- HARRIS, J.R.; WACHSMUTH, I.K.; DAVIS, B.R. & COHEN, M.L. 1982. High-molecular-weight plasmid correlates with *Escherichia coli* enteroinvasiveness. Infect. Immun. 37: 1295-98.
- HENSLEY, R.V.; BARNUM, D.A. & INGRAM, D.G. 1967. Biochemical and serological studies of avian strains of *Escherichia coli*. Avian. Dis. 11: 90-7.
- HINSON, G. & WILLIAMS, P.H. 1989. Adhesins of pathogenic *Escherichia coli*. In: HOPWOOD, D.A. & CHARTER, K.E. Genetics of Bacterial Diversity, cap. 14, pp. 287-307, Academic Press limited, London, U.K.



- HIRST, T.R.; RANDAL, L. & HARDY, S.J. 1984. Cellular location of heat-labile enterotoxin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **157**: 637-42.
- HOISETH, S.K. & STOCKER, B.A.D. 1981. Aromatic dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccine. *Nature* **291**: 238-39.
- HOLMGREN, J. 1973. Comparison of the tissue receptors for *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins by means of gangliosides and natural cholerae toxoid. *Infect. Immun.* **8**: 851-59.
- HOLMGREN, J. 1991. Mucosal immunity and vaccination. *FEMS Microbiol. Immunol.* **89**: 1-10.
- HOLMGREN, J.; FREDMAN, P.; LINDBALD, M.; SVENNERHOLM, A.M. & SVENNERHOLM, L. 1982. Rabbit intestinal glycoprotein receptor for *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin lacking affinity for cholerae toxin. *Infect. Immun.* **38**: 424-33.
- HOMES, T.K.; TWIDDY, E.M. & PICKETT, C.L. 1986. Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*: *Infect. Immun.* **53**: 464-73.

- HONDA, T.; ARITA, M. & MIWATANI, T. 1984. Characterization of new hydrophobic pili of human enterotoxigenic *Escherichia coli*: a possible new colonization factor. *Infection and Immun.* **43**: 959-965.
- HONDA, T.; TSUJI, T. TAKEDA, Y. & MIWATANI, T. 1981. Immunological nonidentity of heat-labile enterotoxins from human and porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immun.* **34**: 337-340.
- HONE, D.; ATTRIDGE, S.; VAN DEN BOSCH, L. & HACKETT, J. 1988. A chromosomal integration system for stabilization of heterologous genes in *Salmonella*-based vaccine strains. *Microb. Pathogen.* **5**: 407-18.
- HUGHES, J.M.; MURAD, F.; CHANG, B. & GUERRANT, R.L. 1978. Role of cyclic GMP in the action of heat stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *NATURE*, **271**: 755-56.
- ISAACSON, R.E. 1985. Development of vaccines for bacterial diseases using recombinant DNA technology. *Avian.Dis.* **30**: 28-36.
- JACKSON, M.P.; NEILL, R.J.; O'BRIEN, A.D.; HOLMES, R.K. & NEWLAND, J.W. 1987. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-Like toxin I and Shiga-Like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbiol. Letters.* **44**:

109-114.

JACOB, C.O.; ARNON, R. & FINKELSTEIN, R.A. 1986. Immunity to heat-labile enterotoxins of porcine and human *Escherichia coli* strains achieved with synthetic cholera toxin peptides. *Infect. Immun.* 52: 562-67.

JOHNSON, J.R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 4: 80-128.

JOHNSON, W.M.; LIOR, H, & BEZANSON, G.S. 1983. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colits in Canada. *The Lancet.*I: 76.

JOHNSON, J.R. & STAMM, W.E. 1989. Urinary tract infections in women: diagnosis and therapy. *Ann. Intern. Med.* 111: 906-17.

KAPER, J.B.; LOCKMAN, H.; BALDINI, M.M. & LEVINE, M.M. 1984. Aerocombinant live oral vaccine. *Biotechnology.*

KARCH, H.; HEESEMAN, J.; LAUFS, R.; O'BRIEN, A.D.; TACKET, C.O. & LEVINE, M.M. 1987. A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. *Infect. Immun.* 55: 455-61.

- KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; CORAZON, L.; FLEMING, P.C.; ARBUS, G.S. & LIOR, H. 1985. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. **151**: 775-82.
- KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; LIM, C.; FLRMING, P.C. & STEELE, B.T. 1983. *Escherichia coli* cytotoxin, hemolytic uremic syndrome, and hemorrhagic colits. Lancet **2**: 1299-1300.
- KAUFMANN, F. 1947. The serology of the coli group. J. Immunol. **57**: 71-100.
- KAUFFMAN, P.E. 1981. Production and evaluation of antibody to the heat-stable enterotoxin from a human strain of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. **42**: 611-14.
- KENNEDY, D.J.; GREENBERG, R.N.; DUNN, J.A.; ALBERTHY, R.; RYERSE, J.S. & GUERRANT, R.L. 1984. Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STb on the intestine of mice, rats, rabbits and piglets. Infect. Immun. **46**: 639-46.
- KLEMM, P. & EDEGAARD, L. 1990. Fimbriae of *Escherichia coli* as carriers of heterologous antigenic sequences. Res. Microbiol. **141**: 1013-17.

- KLIPSTEIN, F.A.; ENGERT, R.F. & CLEMENTS, J.D. 1981.  
Protection in rats immunized with *Escherichia coli*  
heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* **34**: 637-39.
- KLIPSTEIN, F.A.; ENGERT, R.F. & CLEMENTS, J.D. 1982.  
Development of a vaccine of cross-linked heat-stable and  
heat-labile enterotoxins that protects against  
*Escherichia coli* producing either enterotoxin. *Infect.*  
*Immun.* **37**: 550-7.
- KLIPSTEIN, F.A.; ENGERT, R.F.; CLEMENTS, J.D. & HOUGHTEN,  
R.A. 1983. Protection against human and porcine  
enterotoxigenic strains of *Escheerichia coli* in rats  
immunized with a cross linked toxoide vaccine. *Infect.*  
*Immun.* **40**: 924-29.
- LEE, C.H.; MOSELEY, S.L.; MOON, H.W.; WHIPP, S.C.; GYLES,  
C.L. & SO, M. 1983. Characterization of the gene  
encoding heat-stable toxin II and preliminary molecular  
epidemiological studies of eenterotoxigenic *Escherichia*  
*coli* heat-stable toxin II produceers. *Infect. Immun.* **42**:  
264-68.
- LEVINE, M.M. 1984. *Escherichia coli* infections. In:  
*Bacterial Vaccines*, cap. 7, pp. 187-235, Landom,  
Academic Press.

LEVINE, M.M. 1987. *Escherichia coli* that causes diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J. Infect. Dis. **155**: 377-89.

LEVINE, M.M. 1988. Studies on the determinants of immunity to ETEC in volunteers. Meeting on Development of Vaccines for Cholerae and ETEC Diarrhoea, pp. 1-20, Baltimore, USA.

LEVINE, M.M.; BERGQUIST, E.J.; NALIN, D.R.; WATERMAN, D.H.; HORNICK, R.B.; YOUNG, C.R.; SOTMAN, S. & ROWE, B. 1978. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. Lancet. I: 1119-22.

LEVINE, M.M. & EDELMAN, R. 1984. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. Epidemiol. Rev. **6**: 31-51.

LEVINE, M.M.; FERRECIO, C.; BLACK, R.E.; GERMANIER, R. & CHILEAN TYPHOID COMMITTEE. 1987. Large-scale field trial of Ty21a live oral typhoid vaccine in enteric-coated capsule formulation. Lancet. I: 1049-52.

LEVINE, M.M.; KAPER, J.B.; BLACK, R.E. & CLEMENTS, M.L. 1983. New knowledge of pathogenesis of bacterial enteric

infectious as applied to vaccine development. Microbiol. Rev. 47: 510-50.

LEVINE, M.M.; MORRIS, J.G. & LOSONSKY, G. 1986. Fimbriae (pili) adhesins as vaccines. In LARK, D.; NORMARK, S. & BRENT-UHLIN, E.; eds. Molecular biology of microbial pathogenicity. London, Academic Press. pp: 143-45.

LEVINE, M.M.; NALIN, D.R. & HOOVER, D.L. 1979. Immunity to enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 23: 729-36.

LEVINE, M.M.; NATARO, J.P.; KARCH, H.; BALDINI, M.M.; KAPER, J.B.; BLACK, R.E.; CLEMENTS, M.L. & O'BRIEN, A.D. 1985. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. J. Infect. Dis. 152: 550-9.

LEVINE, M.M.; XU, J.; KAPER, J.B.; LICR, H.; PRADO, V.; TALL, B.; NATARO, J.; KARCH, H. & WACHSMUTH, K. 1987. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and others serotypes that cause hemorrhagic uremic syndrome. J. Infect. Dis. 156: 175-82.

LIPSKY, B.A. 1989. Urinary tract infections in men. Epidemiology, pathophysiology, diagnosis, and treatment. Ann. Intern. Med. 110: 138-50.

- MANNING, P.A.; TIMMIS, K.N. & STEVENSON, G. 1985. Colonization factor antigen II (CFA/II) of enterotoxigenic *Escherichia coli*: molecular cloning of the CS3 determinant. *Molecular and General Genetics* **200**: 322-327.
- MARQUES, L.R.M.; MOORE, M.A.; WELLS, J.G.; WACHSMUTH, I.K. & O'BRIEN, A.D. 1986. Production of Shiga-Like toxin by *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **154**: 338-41.
- MARQUES, L.R.M.; PEIRIS, J.S.M.; CRYZ, S.J. & O'BRIEN, A.D. 1987. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-Like toxin II. *FEMS Microbiol. Letters.* **44**: 33-8.
- MASKELL, D.; LIEW, F.Y.; SWEENEY, K.; DOUGAN, G. & HORMAECHE, C.E. 1986. Attenuated *Salmonella typhimurium* as live oral vaccines and carriers for delivering antigens to the secretory immune system, pp. 213-17. In: BROWN, F.,; CHANNOK, R.M. & LERNER, R.A. (ed.), *Vaccines 86*: New approaches to immunization. Developing vaccines against parasitic, bacterial, and viral diseases. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- MATHEWSON, J.J.; JOHNSON, P.C.; DU PONT, H.L.; MORGAN, D.R.; THORNTON, S.A.; WOOD, L.V. & ERICSSON, C.D. 1985. A newly recognized cause of traveller's diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **151**:



471-75.

MATHEWSON, J. J.; JOHNSON, P. C.; DU PONT, H. L.; SATTERWHITE, T. K. & WINSOR, D. K. 1986. Pathogenicity of enteroadherent *Escherichia coli* in adult volunteers. *J. Infect. Dis.* **154**: 824-27.

MATSUDAIRA, P. T. & BURGESS, D. R. 1982. Partial reconstruction of the microvillus core bundle: characterization of villin as a  $Ca^{2+}$  dependent actin-bundling/depolymerizing protein. *J. Cell Biol.* **92**: 648-56.

MAURELLI, A. & SANSONETTI, P. J. 1988. Genetic determinants of *Shigella* pathogenicity. *Ann. Rev. Microbiol.* **42**: 127-50.

MCCONNELL, M. M.; THOMAS, L. V.; DAY, N. P. & ROWE, B. 1985. Enzyme linked immunosorbent assays for the detection of adhesin factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **152**: 1120-27.

MCCONNELL, M. M.; THOMAS, L. V.; SCOTLAND, S. M. & ROWE, B. 1986. The possession of coli surface CS6 by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O25, O27, O148 and O159: a possible colonization factor ? *Curr. Microbiol.* **14**: 51-54.

- MEAS, R.; SILVA, R.M.; GOMES, T.A.T.; TRABULSI, L.R.; MAAS, W.K. 1985. Detection of genes for heat-stable enterotoxin I in *Escherichia coli* strains isolated in Brazil. *Infect. Immun.* **49**: 46-51.
- MERSON, M.H.; MORRIS, R.K.; SACK, D.A.; WELLS, J.G.; FREELEY, J.C.; SACK, R.B.; GREECH, W.B.; KAPIKIAN, A.Z. & GANGAROSA, E.J. 1976. Traveller's diarrhea in Mexico. A prospective study of physicians and family members attending a congress. *N. Engl. J. Med.* **294**: 1299-1305.
- MERSON, M.H.; ORSKOV, F.; ORSKOV, I.; SACK, R.B.; HUQ, I. & KOSTEN, F.T. 1979. Relationship between enterotoxin production and serotype in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **23**: 325-29.
- MOOI, F.R. & DE GRAAF, F.K. 1985. Molecular Biology of fimbrial of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Current Topics Microbiology and Immunol.* **118**: 119-138.
- MOOI, F.R.; DE GRAAF, F.K. & VAN EMBDEN, J.D.A. 1979. Cloning, mapping and expression of the genetic determinant that encodes for the K88ab antigen. *Nucleic. Acid. Res.* **6**: 849-65.
- MOOI, F.R.; HARMS, N.; BAKKER, D. & DE GRAAF, F.K. 1981. Organization and expression of genes involved in the production of the K88ad antigen. *Infect. Immun.* **32**:

1155-63.

MODI, F.R.; VAN BUBREN, M.; KOOPMAN, G.; ROSSENDAEL, B. & DE-GRAAF, F.K. 1984. A K88ab gene of *Escherichia coli* codes a fimbria like protein distinct from the K88ab fimbrial adhesin. *J.Bacte.Mol.* **159**: 482-487.

MODI, F.R.; WOUTERS, C.; WIJFJES, A. & DE GRAAF, F.K. 1982. Construction and characterization of mutants impaired in the biosynthesis of the K88ab antigen. *J. Bacteriol.* **150**: 512-21.

MOON, H.W. 1981. Protection against enteric colibacillosis in pigs suckling orally vaccinated dams: evidence for pili as protective antigens. *Am. J. Vet. Res.* **42**: 173-7.

MOON, H.W.; ROGERS, D.G. & ROSE, R. 1988. Effects of a orally administered live *Escherichia coli* pilus vaccine on duration of lacteal immunity to enterotoxigenic *Escheerichia coli* in swine. *Am. J. Vet. Res.* **49**: 2068-71.

MORGAN, R.L.; ISAACSON, R.E.; MOON, H.W.; BRINTON, C.C. & TO, C.C. 1978. Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic *Escherichia coli* induced diarrheal disease by vaccinating dams with purified 987P or K99 pili: protection correlates with pilus homology of vaccine and challenge. *Infect.Immun.* **22**: 771-777.

- MOSELEY, S.L.; HARDY, J.W.; HUG, M.I.; ESCHEVERRIA, P. & FALKOW, S. 1983. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 39: 1167-74.
- NAGARAJA, K.V.; EMERY, D.A.; NEWMAN, J.A. & POMEROY, B.S. 1983. Identification and isolation of somatic pili from pathogenic *Escherichia coli* of turkeys. *Am. J. Vet. Res.* 44: 284-87.
- NAGY, B.; MOON, H.W. & ISAACSON, R.E. 1976. Colonization of porcine small intestine by *Escherichia coli*: ileal colonization and adhesion by pig enteropathogens that lack K88 antigen and by some capsular mutants. *Infect. Immun.* 13: 1214-1220.
- NAGY, B.; MOON, H.W.; ISAACSON, R.E.; ITO, C.C. & BRINTON, C.C. 1978. Immunization of suckling pigs enteric enterotoxigenic *Escherichia coli* infection by vaccinating dams with purified pili. *Infect. Immun.* 21: 269-74.
- NATARD, J.P.; BALDINI, M.M.; KAPER, J.B.; BLACK, R.E.; BRAVO, N. & LEVINE, M.M. 1985. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. *J. Infect. Dis.* 152: 560-65.

- NATARO, J.P.; KAPER, J.B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V. & LEVINE, M.M. 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells. *Ped. Infect. Dis. J.* 6: 829-31.
- NAVEH, M.W.; ZUSMAN, T.; SKUTELSKY, E. & RON, E.Z. 1983. Adherence pili in avian strains of *Escherichia coli*: effect of pathogenicity. *Avian. Dis.* 28: 651-61.
- NEIDHART, F.C. 1987. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*-Cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- NETER, E.; WESTPHAL, O.; LUDERITZ, O. & NEEDELL, M.H. 1955. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. *Pediatrics.* 16: 801-8.
- NIELSEN, N.O. 1984. Edema disease. In: Diseases in swine, 5<sup>th</sup> ed., cap. 45, pp. 478-90, The Iowa State University Press.
- NIGHIUCHI, Y. & SAKAKIBARA, S. 1982. Primary and secondary structure of conotoxin G1, a neurotoxic tridecapeptide from a marine snail. *FEBS Letter.* 148: 260-62.
- NORNGREN, M.; NORMAK, S.; LARK, N.; O'HANLEY, P.; SCHOOLNIK, G.; FALKOW, S.; SVENBORG-EDEN, C.; BAGA, M. & UHLIN,

- B.E. 1984. Mutations in *Escherichia coli* cistrons affecting adhesion to human cells do not abolish Pap pili fiber formation. *EMBO J.* 3: 1159-65.
- O'BRIEN, A.D. & HOLMES, R.K. 1987. Shiga and Shiga-Like toxins. *Microbiol. Rev.* 51: 206-20.
- O'BRIEN, A.D.; LIVELY, T.A.; CHEN, M.E.; ROTHMAN, S.W. & FORMAL, S.B. 1983. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with hemorrhagic colitis in the United States produced a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) Like cytotoxin. *Lancet* I: 702.
- O'BRIEN, A.D.; NEWLEND, J.W.; MILLER, S.F.; HOLMES, R.K.; SMITH, H.W. & FORMAL, S.B. 1984. Shiga-Like toxin converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis of infantile diarrhea. *Science.* 226: 694-96.
- ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; SMITH, H.W. & SOJKA, W.J. 1975. 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.* 83: 31-36.
- ORSKOV, F.; ORSKOV, I.; EVANS, Jr.D.G.; SACK, R.B; SACK, D.A. & WADSTRÖM, T. 1976. Special *Escherichia coli* serotypes among enterotoxigenic strains from diarrhea in

adults and childrens. Med. Microbiol. Immunol. **162**:  
73-80.

ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; SOJKA, W.J. & WITTING, W. 1964. K  
antigens K88ab (L) e K88ac (L) in *Escherichia coli*. A  
new O antigen: O147 and a new K antigen: K88 (B). Acta.  
Pathol. Microbiol. Scand. **62**: 439-77.

PAL, T.; PACSA, A.S.; EMÖDY, L.; VÖRÖS, S. & SÉLLEY, E.  
1985. Modified enzyme-linked immunosorbent assay for  
detecting enteroinvasive *Escherichia coli* and virulent  
*Shigella* strains. J. Clin. Microbiol. **21**: 415-18.

PICKETT, C.L.; TWIDDY, E.M.; BELISLE, B.W. & HOLMES, R.K.  
1986. Cloning of genes that encode a new heat-labile  
enterotoxin of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **165**:  
348-52.

PICKETT, C.L.; WEISTEIN, D.L. & HOLMES, R.K. 1987. Genetics  
of type IIa heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*:  
operon fusions, nucleotide sequences, and hybridization  
studies. J. Bacteriol. **169**: 5180-87.

PORTER, P.; KENWORTHY, R. & ALLEN, W.D. 1974. Effect of  
oral immunization with *Escherichia coli* antigens on  
postweaning enteric infectin in the young pig. Vet. Rec.  
**95**: 99-104.

- REIS, M.H.L.; MATOS, D.P.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; TOLEDO, M.R.F. & TRABULSI, L.R. 1980. Relationship among enterotoxigenic phenotypes and sources of strains in enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 28: 24-27.
- REMIS, R.S.; MACDONALD, K.L.; RILEY, L.W.; PUHR, N.D.; WELLS, J.D.; DAVIS, B.R.; BLAKE, P.A. & COHEN, M.L. 1984. Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7. Ann. Intern. Med. 101: 624-6.
- RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.D.; MAGEE, H.B.; WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; HEBERT, R.J.; OLCOTT, E.S.; JOHNSON, L.M.; HARGRETT, N.T.; BLAKE, P.A. & COHEN, M.L. 1982. Hemorrhagic colitis associated with rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med. 308: 681-85.
- ROBINS, A. & FREEMAN, P. 1988. Obstacles to developing vaccines for the third world. Scientific American. 128: 90-95.
- ROOSEDAAL, B.; GAASTRA, W. & DE GRAAF, F.K. 1984. The nucleotide sequence of the gene encoding the K99 subunit of enterotoxigenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Letters. 22: 253-58.



- ROTHBAUM, R.; MCADANS, A.J.; GIANELLA, R. & PARTIN, J.C. 1982. A clinocopathologic study of enterocyte-adherent *Escherichia coli*: a cause of protracted diarrheain infants. *Gastroenterology*. 83: 441-54.
- SACK, R.B. 1976. Enterotoxigenic *Escherichia coli*-an emerging pathogen. *N. Engl. J. Med.* 295: 893-94.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York, Cold Spring Harbour Press.
- SANCHES, J.; BENNETT, P.M. & RICHMOND, M.H. 1982. Expression of elt-B, the gene encoding the B subunit of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*, when cloned in pACYC 184. *Fems Microbiol. Letters*. 14: 1-5.
- SANCHES, J.; SVENNERHOLM, A.M. & HOLMGREN, J. 1988. Genetic fusion of a non toxic heat-stable enterotoxin-related dodecapeptide antigen to cholera toxin B subunit. *FEBS Letter*. 241: 110-14.
- SANCHES, J.; UHLIN, B.E.; GRUNDSTRÖN, T.; HOLMGREN, J. & HIRST, T.R. 1986. Immunoactive chimeric ST-LT enterotoxins of *Escherichia coli* generated by in vitro gene fusion. *FEBS Letter*. 208: 194-98.

- SACK, R.B.; KLINE, R.L. & SPRIA, W.M. 1988. Oral immunization of rabbits with enterotoxigenic *Escherichia coli* protects against intraintestinal challenge. *Infect. Immun.* **56**: 387-94.
- SACK, D.A.; KAMINSKY, D.C.; SACK, R.B.; ITOTIA, J.N.; ARTHUR, R.R.; KAPIKIAN, A.Z.; ORSKOV, F. & ORSKOV, I. 1978. Prophylactic doxycycline for travellers diarrhoea. Results of a double-blind study of peace corps volunteers in Kenya. *N. Engl. J. Med.* **298**: 758-63.
- SCOTLAND, S.M.; RICHMOND, J.E. & ROWE, B. 1983. Adhesion of enteropathogenic strains of *Escherichia coli* (EPEC) to Hep-2 cells is not dependent on the presence of fimbriae. *FEMS Microbiol. Letters.* **20**: 191-95.
- SCOTLAND, S.M.; SMITH, H.R. & ROWE, B. 1985. Two distinct toxins active in Vero cells from *Escherichia coli* 0157. *Lancet.* **II**: 885-86.
- SCOTLAND, S.M.; SMITH, H.R.; WILLSHAW, G.A. & ROWE, B. 1983. Vero cytotoxin production in strain of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage. *The Lancet.* **II**: 216-24.
- SELANDER, R.K.; CAUGANT, D.A. & WHITTAM, T.S. 1987. Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*, p.p. 1625-48. In: NEIDHARDT, F.C.

*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

SERAFIM, M.B.; CASTRO, A.F.; REIS, M.H.L. & TRABULSI, L.R. 1979. Passive immune haemolysis for the detection of heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **24**: 606-10.

SHIMONISHI, Y.; HIDAKA, Y.; KOIZUMI, M.; HANE, M.; AIMOTO, S.; TAKEDA, T.; MIWATANI, T. & TAKEDA, Y. 1982. Mode of disulfide bond formation of a heat-stable enterotoxin (STh) produced by a human strain of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEBS Letter.* **215**: 165-70.

SHIPLEY, P.L.; DOUGLAN, G. & FALKON, S. 1981. Identification and cloning of the genetic determinant that encodes for the K88ac adherence antigen. *J.Bacteriol.* **145**: 920-925.

SHÖDEL, F. & WILL, H. 1989. Construction of a plasmid for expression of foreign epitopes as fusion proteins with subunit B of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* **57**: 1347-50.

SHÖDEL, F. & WILL, H. 1990. Expression of hepatitis B virus antigens in attenuated *Salmonella* for oral immunization. *Res. Microbiol.* **141**: 831-37.

- SMITH, W.H.; GREEN, P. & PARSELL, Z. 1983. Vero cells toxins in *Escherichia coli* and related bacteria: transfer by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens and pigs. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 3121-37.
- SMITH, N.W. & SACK, R.B. 1973. Immunologic cross-reactions of enterotoxins from *Escheerichia coli* and *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Dis.* **127**: 164-70.
- SMITH, H.R.; SCOTLAND, S.M.; CHART, H. & ROWE, B. 1987. Vero cytotoxin production and presence of VT genes in strains of *Escherichia coli* and *Shigella*. *FEMS Microbiol. Letters.* **42**: 173-77.
- SMITH, H.R.; SCOTLAND, S.M. & ROWE, B. 1983. Plasmid that code for the production of colonization factor antigen II a 1 enterotoxin production in strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **40**: 1236-1239.
- SMITH, H.R.; WILLSHAW, G.A. & ROWE, B. 1982. Mapping of a plasmid, coding for colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin production, isolated from a enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **149**: 264-75.
- SO, M.; DALLAS, W.S. & FALKOW, S. 1978. Characterization of an *Escherichia coli* plasmid encoding for synthesis of

heat-labile toxin. Molecular cloning of the toxin determinant. *Infect. Immun.* 21: 405-11.

SO, M. & MACARTHY, B.J. 1980. Nucleotide sequence of the bacterial transposon *Tn1681* encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 4011-15.

SOJKA, W.J. 1965. *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. Review series n<sup>o</sup>7. Commonwealth Bureau of Animals Health, Welbridge.

SOJKA, W.J. & CARNAGHAM, R.B.A. 1961. *Escherichia coli* infection in poultry. *Res. Vet. Sci.* 2: 340-51.

SPICER, E.K. & NOBLE, J.A. 1982. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin-nucleotide sequence of the A subunit gene. *J. Biol. Chem.* 257: 5716-21.

STEVENSON, A.J. 1963. Coliform infections in the young pig and a practical approach to the control of enteritis. *Vet. Rec.* 75: 1241-1246.

STEVENSON, G. & MANNING, P.A. 1985. Galactose-epimeraseless (GalE) mutant G30 of *Salmonella typhimurium* is a good potential live oral vaccine carrier for fimbrial antigens. *FEMS Microbiol. Letters.*

28: 317-21.

TACKET, C.O.; LOSONSKY, G. & LINK, H. 1988. Protection by milk immunoglobulin concentrate against oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. N. Engl. J. Med. 318: 1240-43.

TACKET, C.O.; MANEVAL, D.R. & LEVINE, M.M. 1987. Purification, morphology, and genetics of a new fimbrial putative colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* O159:H4. Infect. Immun. 55: 1063-69.

TAKAO, T.; HITOUJI, T.; AIOMOTO, S.; SHIMONISHI, Y. & HARA, S. 1983. Amino acid sequence of a heat-stable enterotoxin isolated from enterotoxigenic *Escherichia coli* strain 18D. FEBS Letter. 152: 1-2.

TAKAO, T.; SHIMONISHI, Y.; KOBAYASHI, M.; NISHIMURA, O.; ARITA, M.; TAKEDA, T.; HONDA, T. & MIWATANI, T. 1985. Amino acid sequence of heat-stable enterotoxin produced by *Vibrio cholerae* non O1. FEBS Letter. 193: 250-54.

TAKAO, T.; TOMINAGA, M.; YOSHIMURA, S.; SHIMONISHI, Y.; HARA, S.; INOUE, T. & MIYAMA, A. 1985. Isolation, primary structure and synthesis of a heat-stable enterotoxins produced by *Yersinia enterocolitica*. Eur. J. Biochem. 152: 199-206.

TAYLOR, R.K. 1989. Genetic studies of enterotoxin and other potential virulence factors of *Vibrio cholerae*. In: HOPWOOD, D.A. & CHARTER, K.E. Genetics of bacterial diversity, cap. 15, pp. 310-329, Academic Press Limited, London, U.K.

THOMAS, L.V.; CRAVIOTO, A.; SCOTLAND, S.M. & ROWE, B. 1982. New fimbrial antigenic type (E8775) that may represent a colonization factor in enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans. *Infect. Immun.* **35**: 1119-24.

THOMAS, L.V.; MCCONNELL, M.M.; ROWE, B. & FIELD, A.M. 1985. The possession of three novel coli surface antigens by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains positive for the putative colonization factor PCF 8775. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 2319-26.

THOMAS, L.V.; ROWE, B. & MCCONNELL, M.M. 1987. In strains of *Escherichia coli* O157 a single plasmid encodes for the coli surface antigens CS5 e CS6 of putative colonization factor PCF 8775, heat-stable enterotoxin, and colicin Ia. *Infect. Immun.* **55**: 1929-31.

THOMPSON, M.R. & GIANELLA, R.A. 1985. Revised amino acid sequence for a heat-stable enterotoxin produced by an *Escherichia coli* strain (18D) that is pathogenic for humans. *Infect. Immun.* **47**: 834-836.

TOLEDO, M.R.F.; ALVARIZA, M.C.B.; MURAHOVSKI, J.; RAMOS, S.R.T.S. & TRABULSI, L.R. 1983. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. *Infect. Immun.* 39: 586-89.

TOLEDO, M.R.F. & TRABULSI, L.R. 1983. Correlation between biochemical and serological characteristics of *Escherichia coli* and results of sereny test. *J. Clin. Microbiol.* 17: 419-21.

TZIPORI, S.; WACHSMUTH, I.K.; CHAPMAN, C.; BIRNER, R.; BRINTTINGHAM, J.; JACKSON, C. & HOGG, J. The pathogenesis of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. *J. Infect. Dis.* 154: 712-16.

ULSHEN, M.H. & ROLLO, J.L. 1980. Pathogenesis of *Escherichia coli* gastroenteritis in man-another mechanism. *N. Engl. J. Med.* 302: 99-101.

VAN DIE, I.; VAN MEGEN, I.; HOEKSTRA, W. & BERGANS, H. 1989. Molecular organization of the genes involved in the production of fimbrial, causing manose resistant hemagglutination of a uropathogenic *Escherichia coli* O6:K2:H1:F7 strains. *MGG* 194: 528-533.

VAN EMBDEN, J.D.A.; DE GRAAF, F.K.; SCHOULS, L.M. & TERPEMA, J.S. 1980. Cloning and expression of a



desoxiribonucleic acid fragment that encodes for the adhesive antigen K99. *Infect. Immun.* 29: 1125-33.

VIAL, P.; PRADO, V.; ROBINS-BROWNE, R.; LIOR, H.; MANEVAL, D.; TALL, B.; KAPER, J.; NATARO, J. & LEVINE, M.M. 1987. Autoagglutinating *Escherichia coli* (AU-EC)-A new enteric pathogen. Abstract of 27<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, New York, Abstract n<sup>o</sup> 285.

VIEIRA, J. & MESSING, J. 1982. The pUC plasmids, and M13mp-7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primer. *Gene.* 19: 259-68.

WEIKEL, C.S.; NELLANS, H.N. & GUERRANT, R.L. 1986. In vivo and in vitro effects of a novel enterotoxin, ST1b, produced by *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 153: 893-901.

WEINSTEIN, D.L.; JACKSON, M.P.; SAMUEL, T.E.; HOLMES, R.K. & O'BRIEN, A.D. 1988. Cloning and sequence of a Shiga-Like toxin II variant from a *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J. Bacteriol.* 130: 4223-30.

WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; WACHSMUTH, I.K.; RILEY, R.W.; REMIS, R.S.; SOKOLOW, R. & MORRIS, G.K. 1983. Laboratory

investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. J. Clin. Microbiol. 18: 512-20.

WHIPP, S.G.; MOON, H.W. & ARGENZIO, R.A. 1981. Comparison of enterotoxic activities of heat-stable enterotoxins from class 1 and class 2 *Escherichia coli* of swine origin. Infect. Immun. 31: 245-51.

WILLSHAW, G.A.; SMITH, H.R.; MCCONNELL, M.M. & ROWE, B. 1985. Expression of cloned plasmid regions encoding colonization factor antigen I (CFA/I) in *Escherichia coli*. Plasmid. 13: 8-16.

WILLSHAW, G.A.; SMITH, H.R.; MCCONNELL, M.M. & ROWE, B. 1987. Clone of genes encoding coli-surface antigens in enterotoxigenic *Escherichia coli* and development of specific DNA probes. Abstracts of the 109<sup>th</sup> Meeting of the Society for General Microbiology, Durham, p. 28.

WILLSHAW, G.A.; SMITH, H.R. & ROWE, B. 1983. Cloning of regions encoding colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Letters. 16: 101-6.

WILSON, M.R. 1984. Enteric colibacillosis. In: Diseases in swine, 5<sup>th</sup> ed., cap. 44, pp. 471-77, Iowa State University Press.

- WOOD, P.K.; MORRIS, Jr. J.G.; SMALL, P.L.C.; SETHABUTR, O.; TOLEDO, M.R.E.; TRABULSI, L.R. & KAPER, J.B. 1986. Comparison of DNA probes with the sereny test for identification of invasive *Shigella* and *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* **24**: 498-500.
- YAMAMOTO, T. ; GORJOBORI, T. ; YOKOTO, T. 1987. Evolutionary origin of pathogenic determinants in enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* 01. *Journal of Bacteriology* **169**: 1352-1357.
- YAMAMOTO, T.; TAMURA, Y. & YOKOTA, T. 1985. Enteroadhesion fimbriae and enterotoxin of *Escherichia coli*: genetic transfer to a streptomycin-resistant mutant of the gal E oral-route live-vaccine *Salmonella typhi* Ty21a. *Infect. Immun.* **50**: 925-28.
- YAMAMOTO, T. & YOKOTA, T. 1981. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins genes are flanked by repeated deoxyribonucleic acid sequences. *J. Bacteriol.* **145**: 850-60.
- YAMAMOTO, T.; YOKOTA, T. & KAJI, A. 1981. Molecular organization of heat-labile enterotoxin genes originating in *Escherichia coli* of human origin and construction of heat-labile toxoid-producing strains. *J. Bacteriol.* **148**: 983-87.

YANISCH-PERRON, C.; VIEIRA, J. & MESSING, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. 33: 103-19.

YANO, T.; LEITE, D.S.; CAMARGO, I.J.B. & PESTANA DE CASTRO, A.F. 1986. A probable new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. *Microbiol. Immunol.* 30: 495-508.