

JOSÉ LUCIANO BEZERRA MOREIRA

ESTUDO GENÉTICO-MOLECULAR EM PLASMÍDIOS R DE  
**Proteus mirabilis**

Tese de Doutorado apresentada  
ao Curso de Pós-Graduação em  
Microbiologia e Imunologia da  
Escola Paulista de Medicina.

SÃO PAULO  
1982

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

ORIENTADOR: PROF. DR. DIÓGENES SANTIAGO SANTOS

Este trabalho foi integralmente realizado no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina, com auxílio financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processos nºs 2222/1581/77 e 400550/80 do Plano Integrado de Genética (PIG II e III).

À minha esposa Aurélia Lúcia  
e aos nossos filhos Camila,  
André e Rodrigo, dedico.

## A G R A D E C I M E N T O S

Ao Professor e amigo Diógenes Santiago Santos pelos ensinamentos, orientação e participação efetiva na realização deste trabalho.

Prof. Luiz Rachid Trabulsi

Prof. Héctor Montes de Oca

Prof. Sérgio Olavo Pinto da Costa

Clotilde de Amorim Pinto

Ioshie Ibara Tanaka

Leda Maria Cummings

Márcia Zorello Laporta

Marilda Carlos Vidotto

Colegas e funcionários do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina.

Colegas do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

" WHAT IS NEW AND SIGNIFICANT MUST ALWAYS BE CONNECTED  
WITH OLD ROOTS,  
THE TRULY VITAL ROOTS THAT ARE CHOSEN WITH GREAT CARE  
FROM THE ONES THAT MERELY SURVIVE."

BELA BARTOK

## SUMÁRIO

	Página
1 - INTRODUÇÃO .....	1
2 - MATERIAL E MÉTODOS .....	19
2.1. Amostras Bacterianas .....	19
2.1.1. <i>Proteus mirabilis</i> .....	19
2.1.2. <i>Escherichia coli</i> empregadas como recepto <u>r</u> as em experimentos de conjugação .....	19
2.1.3. <i>Escherichia coli</i> portadoras de plasmídios conjugativos usadas em experimentos de mobilização de plasmídios R não conjugativos .....	20
2.1.4. <i>Escherichia coli</i> portadoras dos plasmídios de referência dos grupos de incompatibilidade .....	20
2.1.5. <i>Escherichia coli</i> portadoras de plasmídios do tipo <i>Fin O<sup>+</sup> tra O<sup>-</sup></i> , <i>Fin O<sup>+</sup> tra O<sup>C</sup></i> e <i>Fin O<sup>+</sup></i> , empregadas na determinação de caráter <i>Fin O tra O</i> dos plasmídios das amostras PM-04/69, PM-50/69 e PM-51/69 ..	21
2.1.6. <i>Escherichia coli</i> portadoras de plasmídios com peso molecular referência para eletroforese em gel de agarose .....	22
2.2. Meios de Cultura, Soluções e Reagentes .....	22
2.2.1. Agar estoque .....	22
2.2.2. Caldo triptona de soja (TSB) e agar triptona de soja (TSA) .....	23
2.2.3. Agar Mac Conkey modificado .....	23
2.2.4. Agar Müller-Hinton .....	24

	Página
2.2.5. Agar mínimo .....	24
2.2.6. Meio padrão para produção de enterotoxi- na termolábil (LT) .....	25
2.2.7. Drogas antimicrobianas, açúcares, aminoá- cidos, tiamina e timina .....	26
2.2.7.1. Drogas antimicrobianas .....	26
2.2.7.2. Açúcares .....	26
2.2.7.3. Aminoácidos, tiamina e timina .	26
2.2.8. Soluções tampões e outros reagentes em- pregados na análise eletroforética de plasmídios .....	27
2.2.8.1. Tampão Tris-Acetato pH 8.0 (Tam- pão E) .....	27
2.2.8.2. Tampão Tris-EDTA pH 8.0 (Tampão T.E.) .....	27
2.2.8.3. Solução detergente, SDS pH 12.4	28
2.2.8.4. Solução de tris HCl 2 M pH 6.0.	28
2.2.8.5. Solução de fenol-clorofórmio 1 : 1 (v/v) .....	28
2.2.8.6. Solução de ficol-azul de bromo- fenol .....	28
2.2.8.7. Solução de brometo de etídio 1 mg/ml .....	29
2.2.9. Soluções e reagentes empregados na extra- ção de plasmídios por ultracentrifugação em gradiente de densidade de cloreto de césio-brometo de etídio .....	29
2.2.9.1. Tampão Tris-OH - Na <sub>2</sub> EDTA - NaCl (TES) pH 8,0 .....	29
2.2.9.2. Sacarose a 25% .....	29
2.2.9.3. Lisozima 10 mg/ml .....	30
2.2.9.4. Na <sub>2</sub> EDTA 0,25 M pH 8,0 .....	30
2.2.9.5. Sarcosil - Desoxicolato de Sô- dio .....	30
2.2.9.6. NaCl 5 M .....	30
2.2.9.7. Ribonuclease 5 mg/ml .....	30

	Página
2.2.10. Soluções e reagentes empregados na clivagem de plasmídios com <u>en</u> donucleases de restrição .....	31
2.2.10.1. Tampão tris HCl - NaCl (TS) pH 7,4 .....	31
2.2.10.2. Tampão tris OH-Na <sub>2</sub> EDTA - H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (TEB) pH 8,3 .	31
2.2.10.3. Solução estabilizadora	31
2.2.10.4. Soroalbumina bovina (BSA) .....	32
2.2.11.5. Acetato de potássio 3 M .....	32
2.2.10.6. Solução de ressuspensão .....	32
2.2.10.7. Endonuclease de restrição .....	32
2.3. Estudos Biológicos .....	33
2.3.1. Manutenção das amostras bacterianas ....	33
2.3.2. Determinação do nível de resistência a drogas antimicrobianas das amostras de <i>Proteus mirabilis</i> .....	33
2.3.3. Transferência de plasmídios por conjugação .....	35
2.3.3.1. Conjugação simples .....	35
2.3.3.2. Conjugação tripla .....	36
2.3.4. Teste de placa réplica .....	37
2.3.5. Determinação de grupo de incompatibilidade de plasmidial .....	38
2.3.6. Determinação do genótipo <i>fin O tra O</i> dos plasmídios das amostras PM-49/69, PM-50/69 e PM-51/69 .....	39
2.3.7. Detecção da enterotoxina LT .....	40
2.3.8. Determinação da sensibilidade de amostras bacterianas aos bacteriófagos R17 e ØII .....	41
2.4. Estudo Físico-Químicos .....	41

	Página
2.4.1. Análise eletroforética de plasmídios ...	41
2.4.2. Determinação do peso molecular de plasmí- dios bacterianos .....	44
2.4.3. Extração de DNA plasmidial por ultracen- trifugação em gradiente de densidade de cloreto de cécio - brometo de etídio ...	45
2.4.4. Análise de DNA plasmidial com nucleases de restrição .....	47
3 - RESULTADOS .....	54
3.1. Nível de resistência a drogas antimicrobianas das amostras de <i>Proteus mirabilis</i> .....	54
3.1.1. Nível de resistência a drogas dos <i>Pro-</i> <i>teus mirabilis</i> isolados em 1969 .....	54
3.1.2. Nível de resistência a drogas dos <i>Pro-</i> <i>teus mirabilis</i> isolados em 1980 .....	54
3.2. Estudo eletroforético em gel de agarose das a- mostras dos plasmídios de <i>Proteus mirabilis</i> ...	55
3.2.1. Eletroforese dos plasmídios dos <i>Proteus</i> <i>mirabilis</i> isolados em 1969 .....	55
3.2.2. Eletroforese dos plasmídios dos <i>Proteus</i> <i>mirabilis</i> isolados em 1980 .....	56
3.3. Pesos moleculares dos plasmídios de <i>Proteus mi-</i> <i>rabilis</i> .....	56
3.3.1. Pesos moleculares dos plasmídios dos <i>Pro-</i> <i>teus mirabilis</i> isolados em 1969 .....	57
3.3.2. Pesos moleculares dos plasmídios dos <i>Pro-</i> <i>teus mirabilis</i> isolados em 1980 .....	57
3.4. Transferência de Plasmídios R de <i>Proteus mirabi-</i> <i>lis</i> para <i>Escherichia coli</i> 711 F <sup>-</sup> , por conjuga- ção .....	57
3.4.1. Conjugações de <i>Proteus mirabilis</i> isola- dos em 1969 com <i>Escherichia coli</i> 711 F <sup>-</sup> .	58
3.4.1.1. Teste em placa réplica dos re- combinantes dos <i>Proteus mirabi-</i> <i>lis</i> isolados em 1969 .....	59
3.4.1.2. Frequência de transferência dos	

	Página
plasmídios de <i>Proteus mirabilis</i> , isolados em 1969, para <i>Escheri- chia coli</i> 711 F <sup>-</sup> , por conjuga- ção .....	59
3.4.1.3. Análise eletroforética e deter- minação dos pesos moleculares dos plasmídios dos recombinan- tes provenientes dos <i>Proteus mi- rabilis</i> isolados em 1969 .....	60
3.4.1.4. Retransferência dos plasmídios dos transconjugantes de <i>Proteus mirabilis</i> isolados em 1969 para <i>Escherichia coli</i> J53 F <sup>-</sup> , por con- jugação .....	63
3.4.2. Conjugações de <i>Proteus mirabilis</i> isola- dos em 1980 com <i>Escherichia coli</i> 711 F <sup>-</sup> .	63
3.4.2.1. Teste em placa réplica dos trans- conjugantes de <i>Proteus mirabi- lis</i> isolados em 1980 .....	64
3.4.2.2. Frequência de transferência dos plasmídios de <i>Proteus mirabilis</i> isolados em 1980 para <i>Escheri- chia coli</i> 711 F <sup>-</sup> por conjugação	64
3.4.2.3. Análise eletroforética e deter- minação dos pesos moleculares dos plasmídios dos recombinan- tes provenientes de <i>Proteus mi- rabilis</i> isolados em 1980 .....	65
3.4.2.4. Retransferência dos plasmídios dos transconjugantes de <i>Proteus mirabilis</i> isolados em 1980 para <i>Escherichia coli</i> J53 F <sup>-</sup> , por con- jugação .....	66
3.5. Classificação do grupo de incompatibilidade dos plasmídios de PM-49/69, PM-50/69 e PM-51/69 ...	66

	Página
3.6. Genótipo <i>Fin O tra O</i> dos plasmídios das amostras PM-49/69, PM-50/69 e PM-51/69 .....	67
3.7. Análise dos plasmídios de PM-49/69, PM-50/69 e PM-51/69 com nucleases de restrição .....	68
3.8. Mobilização de plasmídios R não conjugativo por plasmídios Ent e F'Lac conjugativos .....	68
3.8.1. Teste em placa réplica dos transconjugantes obtidos por conjugação tripla .....	70
3.8.2. Análise eletroforética dos plasmídios dos transconjugantes obtidos por conjugação tripla .....	71
3.8.3. Sensibilidade das amostras <i>E. coli</i> 711 pPM2a-Sm, <i>E. coli</i> 711 EP1b, <i>E. coli</i> F'Lac e seus recombinantes, obtidos por conjugação tripla, aos fagos R17 e ØII .....	73
3.8.4. Produção de enterotoxina LT por transconjugantes obtidos por conjugação tripla ..	74
3.8.5. Retransferência dos plasmídios dos transconjugantes obtidos por conjugação tripla para <i>Escherichia coli</i> C600 F <sup>-</sup> ou J53 F <sup>-</sup> , por conjugação .....	75
3.8.5.1. Retransferência de plasmídio de transconjugantes obtidos por conjugação tripla e defectivos para as marcas de Ap e Te, para <i>Escherichia coli</i> C600 F <sup>-</sup> , por conjugação .....	75
3.8.5.2. Análise eletroforética dos transconjugantes obtidos por conjugação tripla e defectivos para as marcas de Ap e Te .....	76
3.8.5.3. Produção de enterotoxina LT pelos transconjugantes obtidos em conjugação tripla, defectivos para as marcas de Ap e Te, e pelos seus transconjugantes .....	77

## Página

3.8.5.4. Estudo com nucleases de restrição dos plasmídios pPM2a-Sm, EP 16 e de um plasmídio defectivo para as marcas de Ap e Te .....	78
4 - DISCUSSÃO .....	103
5 - RESUMO .....	122
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	125

## 1 - INTRODUÇÃO

A década de 40 foi pródiga em estudos que a estabeleceram como um marco na evolução dos conhecimentos sobre genética bacteriana ( 57, 71, 82 ). Além disso, tais conhecimentos adquiridos e os métodos de estudo então desenvolvidos, acabaram por influenciar também e de modo realmente positivo o progresso da genética de sistemas eucarióticos ( 71 ).

Quanto aos mecanismos de transferência de informações genéticas entre bactérias, havia até o início da referida década apenas trabalhos sobre transformação. Dentre estes podemos citar o estudo pioneiro mas pouco conhecido de Cantacuzene & Bonciu, publicado em 1926 ( 17 ) e o de Griffith, publicado em 1928 ( 63 ). Entretanto, só em 1944 Avery, MacLeod e McCarty estabeleceram as bases sobre tal mecanismo, inclusive determinando ser o DNA o princípio transformante ( 6 ). A seguir a conjugação foi descoberta por Lederberg e Tatum, em 1946 ( 94 ), enquanto a transdução foi descoberta por Zinder e Lederberg, em 1952 ( 164 ).

Dada a sua ocorrência freqüente e maior efetividade para transferir informações genéticas, a conjugação foi então tida como o mais importante processo dentre os acima citados. Naquela época, Lederberg e Tatum ( 94 ), trabalhando com diferen

tes mutantes auxotróficas derivadas de *Escherichia coli* K12 selvagem, demonstraram a ocorrência de recombinação entre as mesmas, fato denotado pelo crescimento de recombinantes ou transconjugantes em meio seletivo. Para tanto, tais transconjugantes haviam sido reparados nas marcas genéticas que conferiam a auxotrofia antes existente. Estes achados, por analogia com o que se conhecia na época sobre seres superiores, foram inicialmente interpretados como sendo devidos à formação de um zigoto diplóide então denominado merozigoto.

Estudos subsequentes vieram demonstrar que a transferência de informações genéticas por conjugação era um evento distinto do que se conhecia em genética clássica até então. Assim o casal Lederberg & Cavalli-Sforza ( 95 ) e Hayes ( 69, 70 ), mostraram que a conjugação era um processo unidirecional de transferência de material genético, que ocorria de uma bactéria, dita doadora, para uma outra que se comportava como receptora. Uma vez que as células doadoras exibiam fertilidade, este caráter foi designado  $F$  e a estrutura contendo os seus respectivos genes tida como um fator sexual. Ademais, as células doadoras foram ditas  $F^+$  e as receptoras  $F^-$ . Foi também demonstrado que, de modo geral, marcas cromossômicas só eram transmitidas raramente por conjugação, e que enquanto células  $F^+$  permaneciam como tais após este evento, as células antes  $F^-$  passavam a comportar-se como  $F^+$  ou doadoras. Isto implicava em que células  $F^+$  ao doarem o seu fator sexual permanecessem com uma cópia do mesmo.

Nesse ínterim foram isoladas por Cavalli-Sforza ( 18 ) e Hayes ( 70 ) mutantes de *E. coli* K12  $F^+$  que quando acasaladas com células  $F^-$  exibiam uma alta frequência de recombinação,

sendo por isso mesmo chamadas Hfr. Estas mutantes Hfr apresentavam diferenças significativas em relação às células  $F^+$  antes descritas, como por exemplo: a) a frequência de recombinação das células Hfr era pelo menos mil vezes maior que a das células  $F^+$ ; b) enquanto no mais das vezes as conjugações  $F^+ \times F^-$  resultavam em recombinantes  $F^+$  e os genes envolvidos com o fator sexual eram transferidos uniformemente em baixa frequência, os cruzamentos Hfr  $\times F^-$  quase sempre resultavam em transconjugantes  $F^-$  e genes cromossômicos distintos eram transmitidos em frequência variável; c) embora a ocorrência fosse rara, os mutantes Hfr podiam reverter à forma  $F^+$ ; d) enquanto corantes derivados da acridina podiam eliminar o fator F de células  $F^+$  tornando-as  $F^-$ , o mesmo não podia ser obtido com linhagens Hfr (18, 82 ).

Em seguida, estudos sobre conjugação a nível celular, realizados por Wollman, Jacob & Hayes ( 79 ), demonstraram que células Hfr transferem seus genes segundo uma seqüência ordenada e com uma frequência tanto maior quanto mais próximos estes genes estiverem do início desta seqüência. Por outro lado, genes situados em posições mais distais eram transferidos com uma frequência proporcionalmente menor. A propósito, a transferência rara do fator sexual de mutantes Hfr foi então interpretada como sendo devido à sua posição, devendo o mesmo estar situado no final da seqüência de genes transferidos. A partir de estudos sobre seqüência de genes cromossômicos transferidos por células Hfr, Jacob & Wollman ( 82 ) propuseram que o cromossomo de *E. coli* K12 deveria ser circular. Esta proposição foi mais tarde confirmada não só para *E. coli* K12 mas também para bactérias em

geral e alguns vírus (14, 15, 148).

Com base na estrutura circular do cromossomo de *E. coli* K12, foi estabelecido que o fator sexual de células  $F^+$  era estruturalmente autônomo em relação ao cromossomo, enquanto em células Hfr este fator estava integrado ao cromossomo das mesmas. Nos anos de 1959 e 1960 foram descritas as primeiras amostras de *E. coli* K12 portando fatores sexuais do tipo F primo ( $F'$ ) (2, 18, 57, 80), os quais correspondiam a fatores F, que uma vez integrados ao cromossomo, ao se separarem deste, levavam consigo uma ou mais marcas genética cromossômicas vizinhas ao seu ponto de inserção.

No fim da década de 50, quando já se dispunha de conhecimentos significativos sobre a genética de *E. coli* K12 e seu fator sexual, um outro importante tema começava a chamar a atenção dos microbiologistas; tratava-se da descoberta em bactérias de um outro tipo de elemento extracromossômico, em certos aspectos similar ao fator F, mas que codificava para resistência a drogas antimicrobianas. A propósito, vale lembrar que entre 1945 e 1952, vários estudos genéticos pareciam ter esclarecido definitivamente que a resistência bacteriana a drogas ocorria apenas por mutação cromossômica (50, 50, 51, 61, 117, 144).

Aspectos relativos a esta resistência cromossômica foram então sumarizados como a seguir: a) a resistência a drogas era motivada por mutação cromossômica; b) esta mutação conferia alto ou baixo nível de resistência e para uma só droga; c) esta resistência não era transferida para bactérias da mesma espécie ou espécies diferentes, mas apenas para células filhas.

Como a base do conhecimento genético sobre resistência

bacteriana a drogas se fundamentava nos dados acima, o isolamento das primeiras cepas de *Shigella* e *Escherichia* portadoras de resistência múltipla a drogas, ocorrido no Japão entre 1956 e 1960 ( 5, 57, 89 ), provocou surpresa e preocupação entre os microbiologistas da época. Em seguida, foi demonstrado que este novo tipo de resistência podia ser transmitido por conjugação, em bloco, tanto *in vivo* como *in vitro* e entre bactérias de espécies diferentes ( 5, 85, 106, 109, 116, 153 ).

Em 1960 foi proposto por Mitsuhashi ( 106 ) a denominação de Fator R para este elemento genético que mediava a resistência a drogas múltipla e transferível, até então só descrito no Japão. Em 1962 foram isoladas cepas de *Salmonella typhimurium*, na Inglaterra, por Naomi Datta ( 40 ), que também apresentavam resistência múltipla. Em 1963 Watanabe ( 155 ) publicou a primeira revisão sobre fatores R e desde então, em vários países do mundo, vêm sendo descritas amostras bacterianas, notadamente de enterobactérias, albergando fatores R ( 3, 57, 62, 86 ).

Relevantes estudos sobre genética e fisiologia bacterianas, conduzidos desde a descoberta dos fatores R, resultaram na identificação de outros elementos extracromossômicos portando informações genéticas para as mais distintas funções ( 3, 4, 7, 10, 13, 21, 57, 99, 133 ). Tais elementos, coletivamente denominados de plasmídios, segundo termo previamente cunhado por Lederberg ( 96 ), correspondem a elementos genéticos extracromossômicos que podem replicar-se autonomamente em células hospedeiras. Em relação a este conceito Jacob & Brenner ( 84 ) introduziram a hipótese do replicon, envolvendo o cromossomo e e-

lementos extracromossômicos. Em 1976, Novick e colaboradores ( 112 ) redefiniram os plasmídios como replicons que são herdados estavelmente no estado extracromossômico.

Após a verificação de que alguns plasmídios R eram conjugativos, foi demonstrado por Egawa & Hirota ( 54 ) e Meynell & Datta ( 101, 102 ) que tais replicons codificavam para a síntese de uma fímbria sexual, que por sua vez mediava a transferência dos seus gens durante a conjugação. Em princípio esta fímbria foi tida como semelhante àquela codificada pelo fator F de *E. coli* K12. Entretanto, foi demonstrado em seguida que o pilus sexual dos plasmídios R continha antígenos diferentes dos da fímbria sexual de F, não sendo por isso aglutinado por soro específico anti F e vice versa. Além disso, bacteriófagos ditos macho específicos, porque só adsorvem à fímbria sexual de células  $F^+$  ou com função semelhante (F like), não adsorvem ao pilus sexual de outros tipos de plasmídios, como por exemplo de plasmídios R.

Egawa & Hirota ( 54 ) observaram ainda que quando plasmídios R eram introduzidos em células  $F^+$ , na maioria das vezes as funções relacionadas à fertilidade de F eram abolidas. Isto foi interpretado como sendo devido à presença de repressores citoplasmáticos, codificados por genes de R e que inibiam as funções de transferência de F. Vale lembrar que enquanto F é naturalmente desreprimido, se transferindo por conjugação em alta frequência ( 9 ), a maioria dos plasmídios R é constituída por elementos naturalmente reprimidos ( 103 ). Além da transferência por conjugação, aspectos outros relacionados com F, tais como sensibilidade para fago macho específico ( 54, 154 ), for

mação do antígeno F ( 76 ) e exclusão de superfície ( 159 ), são também inibidos na presença de plasmídios.

Com base na inibição dos genes de transferência *tra* de F, os plasmídios R foram classificados por Egawa & Hirota ( 54 ) em  $\lambda^+$ , quando inibem estas funções, e em  $\lambda^-$ , quando não suprimem tais funções. Apesar da inibição dos genes *tra*, o fator F, nestes casos, permanece como unidade estrutural íntegra do citoplasma bacteriano, permitindo concluir que sua replicação não é afetada ( 54 ). O gene do plasmídio R que codifica para a síntese do repressor que inibe a sua própria transferência, e também a do plasmídio F que coexiste na mesma bactéria, recebeu várias designações: inicialmente de  $\lambda$ , por Egawa & Hirota ( 54 ), em seguida de  $\lambda_i$ , por Watanabe e cols. ( 156 ), depois de  $\lambda_{in}$ , por Finnegan & Willetts ( 59 ) e finalmente de  $\lambda_{in}^0$ , por Willetts e cols. ( 158 ); a designação  $\lambda_{in}^0$  continua sendo empregada atualmente. Entretanto, a inibição da fertilidade de F e de R, quando este último é do tipo  $\lambda_{in}^0$ , não se explica apenas pela presença de um repressor citoplasmático, mas corresponde à interação de vários componentes. Estudos conduzidos em fins dos anos 60 e ao longo da década de 70, tendo inicialmente como modelo o conceito do operon criado por Jacob & Monod ( 81 ), renderam interessantes resultados que esclareceram em grande parte os mecanismos de controle da fertilidade de tais plasmídios. Por exemplo, Meynell & Datta ( 103 ), isolaram um plasmídio R com mutação no gen que codifica para a síntese do repressor em questão, o qual era transferido em frequência até 300 vezes superior à do plasmídio original. Este elemento, originado do plasmídio R 100 e designado R 100-1, não su

primia a fertilidade dele mesmo ou de F, comportando-se como um elemento desreprimido (drd). Neste caso, células que albergavam ao mesmo tempo os plasmídios F e R drd, este último portanto do tipo  $\phi_{in} O^-$ , apresentavam um pilus sexual que geralmente tinha antígenos comuns aos pelos sexuais codificados por F e R, permitindo também a adsorção de fago macho específico ( 92 , 110 ).

Foi ainda estabelecido nesta série de trabalhos que plasmídios R,  $\phi_{in} O^-$  não correspondem a mutantes drd de R  $\phi_{in} O^+$ , pois não promovem sua transferência em alta frequência e as células que o albergam apresentam fímbria sexual antigenicamente distinta das encontradas nas células hospedeiras de plasmídios R  $\phi_{in} O^+$ . Pouco tempo depois, Meynell & Cooke ( 104 ), isolaram um outro plasmídio R mutante, que a despeito de comportar-se como R  $\phi_{in} O^+$ , era resistente à ação dos repressores citoplasmáticos. Assim, este elemento extracromossômico inibia as funções de transferência de F mas não era inibido pelos seus próprios repressores, ou ainda pelos de outros plasmídios do tipo  $\phi_{in} O^+$ . Este plasmídio, que segundo os mesmos autores havia sofrido uma mutação num gen operador, foi tido como um mutante operador constitutivo e por isso mesmo designado  $O^c$ . A partir de então inúmeros outros estudos foram realizados, demonstrando que vários cistrons, distribuídos em mais de um operon, estavam envolvidos com o controle da transferência de F (1, 58, 78, 105, 109, 115, 160, 161 ).

Em 1973, Finnegam & Willetts (58, 59) propuseram o seguinte modelo para a regulação da expressão dos genes de transferência de plasmídios R  $\phi_{in} O^+$  e também de F, quando este F

coexiste na mesma células bacteriana com um plasmídio R do tipo  $\phi_{in} O^+$ : os plasmídios R  $\phi_{in} O^+$  possuem os genes  $\phi_{in} O$  e  $\phi_{in} P$ , cujos produtos quando interagem atuam sobre o operador  $\phi_{is} O$  do gen  $tra J$ , prevenindo a sua expressão e por conseguinte a síntese do produto  $tra J$ . Por sua vez este produto  $tra J$  é requerido para que os genes do operon  $tra$  sejam expressos. Como a expressão do gen  $tra J$  é inibida pela substância resultante da interação dos produtos dos genes  $\phi_{in} O$  e  $\phi_{in} P$ , levando a uma ausência do produto  $tra J$ , os produtos dos genes do operon  $tra$  não são sintetizados e o plasmídio R em questão não é transferido por conjugação. Já o plasmídio F, naturalmente desreprimido que é, não possui o gen  $\phi_{in} O$  ( 10 ). Todavia, o produto do gen  $\phi_{in} O$  de plasmídios R  $\phi_{in} O^+$  interage com o produto do gen  $\phi_{in} P$  de F, formando um outro produto que atua sobre o operador  $\phi_{is} O$  do gen  $tra J$  de F, resultando na ausência do produto  $tra J$ . O produto  $tra J$  não estando presente previne a síntese dos produtos dos genes que compõem o operon  $tra$  e o plasmídio F não é transferido por conjugação.

Os plasmídios R e outros tipos de plasmídios podem ser classificados, além do critério de repressão sobre os genes  $tra$ , pela sua habilidade ou não de coexistência estável com outros plasmídios numa mesma células hospedeira. Aqueles pares que cohabitam estavelmente a mesma células bacteriana são ditos compatíveis, enquanto os que não coexistem estavelmente em tais condições são considerados incompatíveis.

Os estudos sobre incompatibilidade entre plasmídios foram iniciados em 1962, quando Scaife & Gross ( 135 ), demonstraram que o plasmídio F'Lac, ao ser transferido para amostras con-

tendo o plasmídio F ou para células Hfr, não se mantinha estávelmente em qualquer destas células hospedeiras. Estes achados foram interpretados em princípio como sendo devidos à grande homologia entre tais elementos, os quais competiriam pelos sítios comuns envolvidos com a replicação de cada um deles. Na mesma época, outros estudos realizados com plasmídios F demonstraram resultados similares ( 39, 76 ). A seguir, em 1964, Watanabe e cols. ( 156 ), demonstraram que pares de plasmídios R  $\phi$ in O<sup>+</sup> ou  $\phi$ in O<sup>-</sup>, também não coexistiam estávelmente numa mesma célula hospedeira. Desde então o teste de incompatibilidade plasmidial vem sendo empregada com frequência, tanto para classificar plasmídios R como outros tipos de plasmídios.

A incompatibilidade entre plasmídios foi definida por Timmis ( 146 ) como a inability de 2 plasmídios distintos serem coherdados estávelmente num único clone celular, na ausência de pressão seletiva para qualquer destes elementos. Ainda segundo esta definição, ficam excluídas outras modalidades de perda de plasmídios, tais como restrição pelo hospedeiro e exclusão de superfície.

Alguns modelos foram propostos para explicar a incompatibilidade entre plasmídios. O primeiro deles se baseia no conceito de replicon, proposto por Jacob e cols. ( 83, 84 ): este modelo sugere que a duplicação de tais replicons se faz em sítios específicos da membrana citoplasmática, e que tais sítios também distribuem replicons recém sintetizados, democraticamente, para células filhas. Neste caso, a replicação de plasmídios compatíveis toma lugar em sítios distintos da membrana. Todavia, plasmídios compatíveis competem pelos mesmos sítios, só

sendo possível a replicação de um deles de cada vez. Um outro modelo foi proposto por Prittchard e cols. ( 123 ) e segundo este, o controle da replicação do DNA plasmidial é feito por uma substância inibitória, livremente difusível no citoplasma bacteriano, a qual limitaria a frequência de replicações. Cada plasmídio produziria o seu repressor, o qual atuaria sobre o outro, levando a uma inibição mútua da replicação de tais unidades extracromossômicas.

Na maioria das vezes um dado plasmídio só se mostra incompatível com plasmídios de uma das classes existentes ( 9 , 39, 57, 64, 65, 97, 135, 156 ). Entretanto, Smith e cols. ( 139 ) e Willshaw e cols. ( 162 ), descreveram plasmídios que exibem incompatibilidade frente a plasmídios de 2 diferentes grupos.

As células bacterianas podem conter também, além dos plasmídios, 2 tipos de segmentos lineares de DNA que são as seqüências de transposição ou translocação, denominadas de transposons ou translocons ( $T_n$ ), e seqüências de inserção menores, também referidas como unidade de inserção (IS). Estes segmentos de DNA, coletivamente denominados de elementos de translocação, podem mover-se dentro das células bacterianas de um plasmídio para outro, de um plasmídio para o cromossomo e vice-versa ( 13, 34, 35, 36, 72, 87, 88, 91, 124, 127, 141, 142 ).

Os elementos de translocação foram encontrados inicialmente em sistemas eucarióticos. Hoje, eles já foram descritos em bactérias, leveduras, milho e moscas de frutas ( 16, 36 ) e em células humanas normais e neoplásicas ( 88 ).

Os elementos translocáveis  $T_n$  podem ser diferenciados

dos IS porque os transposons carregam gens completos e detectáveis, como aqueles que conferem resistência a drogas antimicrobianas, enquanto as unidades IS correspondem a segmentos de DNA com pares de bases em número significativamente menor. De modo geral os elementos  $Tn$  se apresentam com 2.000 a 38.000 pares de base, e as unidades IS com aproximadamente 800 a 5.000 pares de bases. As unidades IS, de um modo constante, apresentam extremidades que correspondem a seqüências repetidas e invertidas, com cerca de 20 a 40 pares de bases. Por outro lado, os transposons apresentam seqüências repetidas, invertidas ou diretas, com aproximadamente 800 a 1.500 pares de bases. Os transposons são freqüentemente flanqueados por unidades IS, correspondendo mesmo a segmentos de DNA que são mobilizados pelas IS em questão. Estes aspectos, embora por um lado estabeleçam diferenças entre os elementos  $Tn$  e IS, por outro deixam clara a significativa interrelação entre os mesmos.

Os elementos translocáveis são ainda capazes de promover a fusão de segmentos de DNA não relacionados, causar fortes mutações polares, bem como conter o código genético referente à iniciação e término da transcrição de determinados operons.

Os dados até aqui descritos, sobre elementos translocáveis, estão citados em ampla literatura, ficando sugeridas algumas revisões (13, 36, 87, 88, 141, 142).

Os plasmídios bacterianos podem ser investigados por métodos físico-químicos. Estes incluem, entre outros, um ou a combinação de mais de um dos seguintes métodos: marcação por radioisótopos, extração por ultracentrifugação, observação por microscopia eletrônica e detecção por eletroforese em gel de a-

garose.

Os métodos físico-químicos facilitaram de modo significativo o isolamento e caracterização de plasmídios. Antes do seu desenvolvimento e emprego, a demonstração de plasmídios só podia ser feita indiretamente, através de estudos genéticos. Tais estudos levavam em conta, notadamente, as marcas genéticas presentes nestes elementos, sua transferência para outras bactérias e sua perda espontânea ou induzida por corantes derivados da acridina ( 57, 74, 155). Além disso, essa abordagem limitada podia dar margem a falsas interpretações, já que tais parâmetros não eram absolutos. Por exemplo, nem todos os plasmídios são autotransferíveis ( 140 ), ou ainda, têm a sua replicação inibida pelo alaranjado de acridina ou outros corantes intercálantes (3, 152).

Várias investigações bem conduzidas concorreram indireta ou diretamente para a caracterização físico-química de diferentes tipos de plasmídios. Inicialmente os mais empregados foram os plasmídios *F*, *R*, o elemento colicinogênico *Col* e o enterotoxigênico *Ent*. Estas investigações estabeleceram que os plasmídios eram realmente constituídos de DNA ( 93 ), sendo este material isolado pela primeira vez em 1961, por Marmur e cols. ( 98 ). Neste estudo, o plasmídio *F' Lac* presente em uma amostra de *Serratia marcescens*, foi extraído em separado do DNA cromossômico da amostra em questão, por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céσιο.

Um exame detalhado de plasmídios íntegros revelou que a estrutura secundária em dupla hélice apresenta-se retorcida, originando uma estrutura terciária em forma de novelo ( 149 ).

Unidade de DNA com este tipo de estrutura são distintas de formas lineares e cíclicas abertas, as quais tenham mesmo tamanho e mesma composição nucleotídica ( 148, 149, 150, 151). Além disso, sedimentam mais rápido em gradiente de cloreto de césio ou sacarose, e a separação das fitas componentes deste DNA exige uma temperatura de 20°C acima daquela requerida para que o mesmo aconteça com formas lineares e cíclicas abertas ( 74 ). É requerido pH alcalino para que as pontes de hidrogênio existentes entre os nucleotídios sejam rompidas ( 31, 74, 136).

A intercalação de corantes derivados da acridina como o brometo de etídio à molécula de DNA circular aberta ou linear, leva a uma diminuição significativa da densidade de flutuação de tais estruturas. Entretanto, os plasmídios com estrutura em novelo são pouco sensíveis à intercalação por este corante, e por isso podem ser separados daqueles tipos de moléculas de DNA, em gradiente de densidade na presença de brometo de etídio (151, 152 ).

A medida do peso molecular de plasmídios era inicialmente feita de modo comparativo, em gradiente de sacarose onde partículas de peso molecular e coeficiente de sedimentação conhecidos eram usadas ( 24 ). Em seguida passou-se a medir diretamente o contorno da molécula plasmidial, por microscopia eletrônica ( 75 ). Ultimamente tem sido empregada a eletroforese em gel de agarose ( 100 ). Por este método, também comparativo mas deveras prático, com o uso de plasmídios com peso molecular previamente estabelecido, tem sido possível determinar o peso molecular aproximado de plasmídios em geral. Além disso, o estudo eletroforético se presta também para determinar o peso

molecular aproximado de fragmento de DNA, de plasmídios submetidos a clivagem com nucleases de restrição (1, 10).

Os plasmídios R têm sido descritos em diferentes espécies bacterianas, sendo encontrados com maior frequência na família Enterobacteriaceae ( 57 ). Dentro desta família o grupo *Proteus* se destaca dos demais por uma série de propriedades (25, 27, 37, 53). Dentre tantas vale lembrar o seu crescimento dito em bafo sobre meios de cultura sólidos, a capacidade de desaminar oxidativamente a fenilalanina em ácido fenilpirúvico e, notadamente, a sua composição molar de bases que é de 39%, contra cerca de 50% de G-C nas demais Enterobactérias ( 27 ). Tais diferenças encontram ressonância no comportamento genético das amostras do grupo *Proteus*, principalmente *Proteus mirabilis* (25, 27 ).

A análise genética de *Proteus mirabilis* tem sido realizado através de transdução ( 26, 28, 29, 30 ), conjugação ( 55, 56 ), transfecção ( 126 ) e transformação ( 125 ).

Diversos marcadores genéticos têm sido transduzidos para *P. mirabilis*, incluindo crescimento em bafo ( 26 ) resistência a estreptomicina ( 30 ), resistência a canamicina ( 29 ), a ampicilina e canamicina ( 30 ) e fatores R íntegros ( 28 ). A maioria dos transdutantes de *P. mirabilis* são decorrentes da transferência de marcadores genéticos não conjugativos os quais mantêm esta característica no novo hospedeiro. Além disso, são instáveis em ambiente não seletivo ( 28, 128 ).

Transferência de material cromossômico, por conjugação, entre *P. mirabilis*, *P. vulgaris* e *P. morgani* não foi conseguida ( 77 ). Por outro lado, através do cruzamento com linhagens

Hfr, segmentos cromossômicos puderam ser transferidos em baixa frequência para *P. mirabilis*. Todavia os recombinantes obtidos correspondiam a merozigotos instáveis (7, 60, 163).

Transferência de plasmídios R, por conjugação, *P. mirabilis* para *E. coli* foi conseguida por vários autores (37, 52, 106, 108, 113, 138). Por outro lado, embora em baixa frequência, também tem sido possível a transferência de plasmídios R de *E. coli* para *P. mirabilis* (41, 72).

Os primeiros estudos sobre plasmídios R, em enterobactérias, davam idéia de que tais elementos extracromossômicos correspondiam a unidades simples de replicação e transmissão (106, 109, 153, 155). Entretanto, trabalhos posteriores demonstraram que o comportamento molecular e replicativo de um plasmídio R pode variar significativamente em diferentes hospedeiros (32, 33, 57, 90, 128, 130, 131, 132). Assim, o plasmídio *NRL*, as vezes designado de R100 ou 222 por diferentes autores (10), é segregado com maior frequência em *Salmonella typhimurium* do que em *E. coli* (157). Este mesmo plasmídio que pode ser isolado de *E. coli* K12 como uma molécula única, com peso molecular de  $64 \times 10^6$  daltons (128), quando transferido para *P. mirabilis* pode dissociar-se em 3 moléculas distintas, dotadas de replicação independente (32, 111). Uma destas 3 moléculas tem o mesmo peso molecular daquela encontrada em *E. coli* K12. Quanto às outras duas, uma tem peso molecular de  $52 \times 10^6$  daltons e a outra de  $12 \times 10^6$  daltons. Tais achados foram interpretados como se estas duas moléculas menores correspondessem a subunidades, dissociadas, da molécula maior, pois a reassociação das duas formava uma unidade equivalente à molécula maior

( 128, 130 ).

Outros dados interessantes foram relatados com o plasmídeo NR1 em *P. mirabilis*. Foi demonstrado que a proporção de moléculas, bem como o número de cópias de cada delas, variam neste hospedeiro na dependência da fase de crescimento em presença de drogas. Quando a amostra é cultivada em meio isento de droga, é detectado quase exclusivamente um tipo de plasmídeo, com peso molecular  $64 \times 10^6$  dältons, portanto semelhante àquele encontrado em *E. coli*. Por outro lado quando o *P. mirabilis* é cultivado em presença de cloranfenicol ou estreptomicina, é observada uma progressiva transição, para mais, na quantidade total de DNA plasmidial. Além disso é verificada predominância do plasmídeo com peso molecular de  $12 \times 10^6$  dältons. Este plasmídeo corresponde à unidade de resistência a drogas, fato denotado pelo concomitante aumento do nível de resistência da amostra hospedeira ( 68 ).

Em *E. coli* o plasmídeo NR1 é encontrado na proporção de uma cópia por cromossomo bacteriano, enquanto em *P. mirabilis* na proporção de 5 a 10 cópias por cromossomo ( 128, 130 ). Na vigência de dissociação deste plasmídeo em *P. mirabilis*, foi observado que a molécula íntegra de NR1, contendo a unidade replicativa (RTF) e os determinantes de resistência ( $64 \times 10^6$  dältons), bem como a unidade intermediária que continha apenas o RTF e a marca de tetraciclina mantêm a proporção de 5 cópias por cromossomo bacteriano. Por outro lado a unidade menor ( $12 \times 10^6$  dältons), contendo apenas determinantes de resistência apresenta-se com 50 cópias por cromossomo ( 68, 130 ).

Em 1972 Clowes ( 24 ) sugeriu que durante o estado de

transição, as moléculas dissociadas correspondiam a unidades fisicamente separadas; neste caso o plasmídeo completo e aquele correspondente ao *RTF*, estariam sob controle estrito de replicação, enquanto o elemento contendo os determinantes de resistência estariam sob controle relaxado. Em um modelo alternativo foi sugerido que o segmento de DNA contendo os determinantes de resistência, estava ligado ao restante do plasmídeo *NR1* como uma estrutura com movimento em balsa. Isto explicava alguns dados até então obtidos, como a ocorrência das unidades dissociadas, assim como o achado de plasmídios contendo na sua estrutura mais de uma unidade dos determinantes de resistência, o que foi denominado de amplificação ( 111, 118, 119, 120, 121, 130 ). Em seguida foi demonstrado que a ocorrência de amplificação, dissociação e reassociação estavam relacionadas com a presença de elementos translocáveis no plasmídeo *NR1* ( 124 )

No presente trabalho, realizado na Disciplina de Microbiologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina, e que teve como finalidade o estudo de propriedades genéticas e físico-químicas de plasmídios R de *Proteus mirabilis* isolados de materiais clínicos, foram considerados os seguintes aspectos: a) nível e modelo de resistência a drogas; b) transmissibilidade por conjugação; c) estimativa dos pesos moleculares por eletroforese em gel de agarose; d) incompatibilidade; e) ultracentrifugação em gradiente de cloreto de césio - brometo de etídio; f) clivagem com endonucleases de restrição.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Amostras Bacterianas

#### 2.1.1 - *Proteus mirabilis*

Foram investigadas 120 amostras de *P. mirabilis*, das quais metade foi isolada em 1969 e o restante em 1980. Tais amostras eram provenientes de materiais clínicos diversos e pertencentes à bacterioteca da Disciplina Microbiologia da Escola Paulista de Medicina. As amostras acima receberam a seguinte notação: as letras maiúsculas PM (relativas a *P. mirabilis*), seguidas do número das amostras neste trabalho e do ano de seu isolamento. Os números das amostras variaram de 01 a 60 e os anos de isolamento foram designados apenas pelas dezenas 69 e 80. Por exemplo, a notação PM-20/69 significa a amostra de *P. mirabilis* de número 20 que foi isolada em 1969.

#### 2.1.2 - *Escherichia coli* empregadas como receptoras em experimentos de conjugação

Foram utilizadas como receptoras, na maioria dos experimentos de conjugação, as seguintes amostras derivadas de *E.*

*coli* K12: *E. coli* 711 F<sup>-</sup>, *E. coli* C600 F<sup>-</sup> e *E. coli* J53 F<sup>-</sup>. Suas marcas de auxotrofia e resistência a drogas, relacionadas com a seleção de transconjugantes, encontram-se na Tabela I.

### 2.1.3 - *Escherichia coli* portadoras de plasmídios conjugativos usadas em experimentos de mobilização de plasmídios R não conjugativos

Foram empregadas 4 amostras derivadas de *E. coli* K12, portadoras de plasmídios conjugativos. Os plasmídios pTM2, pTM9 e pTM16, albergados em *E. coli* 711 F<sup>-</sup>, respectivamente denominadas 711 EP2, 711 EP9 e 711 EP16, eram provenientes de amostras de *E. coli* selvagens, codificavam para a síntese de enterotoxina termolábil (LT) e não apresentavam marcas de resistência a drogas antimicrobianas ( 99 , 145 ). O plasmídio F'Lac da amostra 711 corresponde ao elemento F de *E. coli* K12 acrescido dos genes envolvidos com utilização de lactose como fonte de carbono e energia ( 134 ). Estas amostras e outras de suas propriedades encontram-se na Tabela II.

### 2.1.4 - *Escherichia coli* portadoras dos plasmídios de referência dos grupos de incompatibilidade

As 28 amostras que constituem este grupo foram obtidas da Dra. E.M. Lederberg, do Centro de Referência de Plasmídios (PRC - Stanford University, School of Medicine, E.U.A.). As importantes características destas amostras e de seus plasmídios estão na Tabela III.

2.1.5 - *Escherichia coli* portadoras de plasmídios do tipo  $\text{Fin } O^+ \text{ tra } O^-$ ,  $\text{Fin } O^+ \text{ tra } O^c$  e  $\text{Fin } O^+$ , empregadas na determinação do caráter  $\text{Fin } O \text{ tra } O$  dos plasmídios das amostras PM-49/69, PM-50/69 e PM-51/69

Amostras derivadas de *E. coli* K12 albergando, separadamente, plasmídios com os genótipos acima citados, foram empregadas em experimentos de repressão e determinação do genótipo  $\text{fin } O \text{ tra } O$  dos plasmídios das amostras PM-49/69, PM 50/69 e PM-51/69. A amostra 711 P307 alberga um plasmídio Ent (síntese de enteroxina termolábil), do tipo  $\text{Fin } O^+ \text{ tra } O^-$  que codifica para a síntese de um repressor que atua no sistema  $\text{tra}$  do plasmídio F, sendo também sensível a este repressor ( 133 ). A amostra J53 possui o plasmídio R386 com marca de resistência para tetraciclina é do tipo  $\text{fin } O^+ \text{ tra } O^c$  e codifica para a síntese de um repressor da transferência do plasmídio F, sendo contudo resistente a este repressor ( 48 ). Finalmente, a amostra 711 F'Lac alberga o plasmídio F primo com a marca cromossômica de lactose, do tipo  $\text{fin } O^- \text{ tra } O^+$ , que não codifica para a síntese de repressor da transferência do plasmídio F e é sensível a este repressor ( 133 ). Os dados sobre estas amostras estão expressos na Tabela IV.

2.1.6 - *Escherichia coli* portadoras de plasmídios com peso molecular referência para eletroforese em gel de agarose.

Foram utilizadas 5 amostras derivadas de *E. coli* K12, portando cada uma delas um plasmídio com peso molecular distinto. Foram elas J53 pR27, 711 p307, J53 pRP4, J53 pS-a e HB101 pBR322. Tais amostras e pesos moleculares dos respectivos plasmídios encontram-se na Tabela V.

## 2.2 - Meios de Cultura, Soluções e Reagentes.

Os meios de cultura e reagentes empregados neste trabalho, quando não especificados foram de procedência Difco ou Sigma.

### 2.2.1 - Agar estoque

Foi empregado na manutenção das amostras bacterianas, sendo constituído dos seguintes componentes por litro de água destilada:

Neopeptona .....	4,0 g
Extrato de carne .....	2,0 g
NaCl (Merck) .....	1,0 g
Agar .....	15,0 g

Os componentes foram dissolvidos a quente em água destilada, o meio distribuído em alíquotas de 2 ml para tubos de

vidro 12 x 100 e autoclavados a 121°C por 15 minutos. Após esterilização os tubos com meio foram deixados a esfriar em posição levemente inclinada.

### 2.2.2 - Caldo triptona de soja (TSB) e agar triptona de soja (TSA).

O TSB e o TSA foram preparados de acordo com as especificações do fabricante. Quando necessário foram suplementados com timina para concentração final de 10 µg/ml.

### 2.2.3 - Agar Mac Conkey modificado.

Este meio foi preparado com os seguintes componentes por litro de água destilada:

Bacto peptona .....	17,0 g
Proteose peptona .....	3,0 g
Cloreto de sódio (Merck) .....	5,0 g
Sais biliares (sol. a 15%) .....	5,0 ml
Vermelho neutro (Merck-sol. 20 mg/ml) ....	1,5 ml
Cristal violeta (Merck-sol. 1 mg/ml) ....	0,5 ml
Agar .....	20,0 g

O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e lactose ou glicose, previamente esterilizada, adicionada para concentração final de 1%.

#### 2.2.4 - Agar Müeller-Hinton

Preparado de acordo com as especificações do fabricante e quando necessário suplementado com nicotinamida para concentração final de 10 µg/ml.

#### 2.2.5 - Agar mínimo

Foi preparado com agar a 2% em água destilada, esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e em seguida acrescido do meio A descrito por Davis & Mingioli ( 47 ). O meio A foi preparado 20 vezes concentrado, sendo constituídos dos seguintes sais por litro de água destilada:

$K_2HPO_4$ .....	140,0 g
$KH_2PO_4$ .....	60,0 g
$(NH_4)_2SO_4$ .....	20,0 g
Citrato de sódio .....	10,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .....	2,0 g

O sulfato de magnésio em separado e a solução contendo os demais sais foram esterilizados a 121°C por 15 minutos, em autoclave. Uma vez à temperatura ambiente as duas soluções foram misturadas. Este meio basal foi complementado com glicose ou lactose, ambas em solução a 20%, para concentração final de 1%. Quando necessário foram adicionados aminoácidos (40 µg/ml), timina (20 µg/ml), tiamina (10 µg/ml) e drogas antimicrobianas.

2.2.6 - Meio padrão para a produção de enterotoxina ter  
molável (LT).

Este meio foi descrito por Evans e colaboradores (133) e consiste dos seguintes reagentes por litro de água destilada:

Bacto casaminoácido .....	20,0 g
Cloreto de sódio (Merck) .....	2,0 g
$K_2HPO_4$ .....	8,71g
Extrato de levedura .....	6,0 g

Os 3 primeiros reagentes foram dissolvidos em 900 ml de água destilada, o pH ajustado para 8,75 e o meio autoclavado a  $121^{\circ}C$  por 15 minutos. O extrato de levedura foi dissolvido separadamente em 100 ml de água destilada e autoclavado a  $121^{\circ}C$  por 15 minutos. Uma vez a temperatura ambiente as duas soluções foram misturadas e em seguida adicionado 1 ml de uma solução de sais que continha:

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .....	5,0 g
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ .....	0,05 g
$MnCl_2$ .....	0,5 g
$H_2SO_4$ 0,0001 N .....	100,0 ml

A solução salina foi esterilizada em filtro Millipore com porosidade de 22 micra de diâmetro e mantida a  $-16^{\circ}C$  até o momento do uso.

### 2.2.7 - Drogas antimicrobianas, açúcares, aminoácidos, tiamina e timina.

#### 2.2.7.1 - Drogas antimicrobianas.

Foram empregadas as seguintes drogas: sulfadiazina (Su), trimetoprin (Tm), furadantina (Fu), ácido nalidíxico (An), ampicilina (Ap), cefaloridina (Cf), cloranfenicol (Cm), tetraciclina (Tc), estreptomicina (Sm), canamicina (Km), neomicina (Nm), gentamicina (Gm), tobramicina (Tb), sisomicina (Si) e amicacina (Ac). Foram preparadas soluções nas seguintes concentrações: 5 mg/ml para o cloranfenicol e tetraciclina e 10 mg/ml para as demais drogas. Estas soluções foram mantidas a  $-16^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

#### 2.2.7.2 - Açúcares

Foram utilizados os açúcares lactose e glicose, em soluções a 20% em água destilada, esterilizadas sob vapor fluente por 1 hora. As soluções assim obtidas foram mantidas a temperatura ambiente.

#### 2.2.7.3 - Aminoácidos, tiamina e timina

Os aminoácidos prolina (pro), fenilalanina (phe), histidina (his), triptofano (trp), treonina (thr), leucina (leu), metionina (met), a vitamina B1 tiamina (thi) e a base pirimídica timina (thy) foram preparados na concentração de 10 mg/ml em

água destilada. As soluções foram esterilizadas a 121°C por 15 minutos em autoclave e mantidas a temperatura ambiente.

#### 2.2.8 - Soluções tampões e outros reagentes empregados na análise eletroforética de plasmídios.

##### 2.2.8.1 - Tampão Tris-Acetato pH 8.0 (Tampão E).

Usado para corridas eletroforéticas era preparado segundo a fórmula:

Tris (hidroximetil)aminometano  -	40 mM
Ácido Etilenodiaminotetracético (Na <sub>2</sub> EDTA) -	2 mM

O Na<sub>2</sub>EDTA era dissolvido a quente em água bidestilada e após a adição do Tris-OH o pH era ajustado com auxílio de um potenciômetro Beckman (4.000) utilizando-se Ácido Acético Glacial (Merck) até atingir-se o pH desejado. O tampão era preparado 10 vezes concentrado e diluído no momento do uso.

##### 2.2.8.2 - Tampão Tris-EDTA pH 8.0 (Tampão T.E)

Tris (hidroximetil)aminometano  -	50 mM
Ácido Etilenodiaminotetracético (Na <sub>2</sub> EDTA) -	10 mM

Solução tampão usada para lavagem de células bacterianas e para ressuspensão de sedimentos bacterianos, quando acrescido de Ribonuclease 15 µg/ml, era preparado pela dissolução do Na<sub>2</sub>EDTA à quente e após adição do Tris-OH o pH era ajustado pa-

ra 8.0 com HCl 6 N, e estocado a 4°C.

#### 2.2.8.3 - Solução detergente, SDS pH 12.4.

Esta solução usada para lise bacteriana era preparada da seguinte maneira: o SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) era dissolvido lentamente em uma solução contendo Tris-OH 50 mM - Na<sub>2</sub>EDTA 10 mM e o pH 12.4 ajustado com NaOH 8 N. Após o volume ser completado com água bidestilada a solução era filtrada em membrana millipore de 0,45 µ de diâmetro e conservada à temperatura ambiente até o momento do uso.

#### 2.2.8.4 - Solução de tris HCl 2 M pH 6.0.

O tris HCl 2 M era preparado em água bidestilada e mantido a 4°C, após o pH ser ajustado para 6.0 com NaOH 8 N.

#### 2.2.8.5 - Solução de Fenol-Cloroformio 1 : 1 (v/v).

Foram empregados fenol bidestilado e cloroformio PA (Merck), na proporção 1 : 1 (v/v). A solução uma vez preparada era mantida a temperatura ambiente.

#### 2.2.8.6 - Solução de ficol-azul de bromofenol

Foi preparada em tampão TE pH 8,0 acrescentando-se ficoll (PM 400.000) e azul de bromofenol, respectivamente para concentrações finais de 10 e 0,025%. A solução assim preparada foi

mantida a temperatura ambiente.

#### 2.2.8.7 - Solução de brometo de etídio 1 mg/ml.

Esta solução foi preparada em tampão TE pH 8,0, na concentração de 1 mg/ml, mantida a 4°C e sob proteção da luz.

#### 2.2.9 - Soluções e reagentes empregados na extração de plasmídios por ultracentrifugação em gradiente de densidade de cloreto de césio-brometo de etídio.

##### 2.2.9.1 - Tampão Tris-OH - Na<sub>2</sub>EDTA - NaCl (TES) pH 8,0.

O tampão TES pH 8,0 (Tris-OH 0,3 M, Na<sub>2</sub>EDTA 0,05M, NaCl 0,5 M) foi preparado 10 vezes concentrado da seguinte forma: dissolveu-se inicialmente o Na<sub>2</sub>EDTA em água bidestilada, a quente, em 60% do volume total a ser preparado. Em seguida o Tris-OH e o NaCl foram acrescentados e o volume final completado com água bidestilada. O pH foi acertado para 8,0 com HCl 6 N e o tampão mantido a 4°C. No momento do uso a solução tampão foi diluída 10 vezes em água bidestilada.

##### 2.2.9.2 - Sacarose a 25%.

A sacarose a 25% (p/v) foi preparada em Tris HCl 0,05M e mantida a 4°C.

### 2.2.9.3 - Lisozima 10 mg/ml.

A solução de lisozima (Wortington) a 10 mg/ml foi preparada no máximo 24 horas antes do uso, em TES pH 8,0. Lisozima cristalizada foi depositada no frasco contendo TES pH 8,0 e deixada dissolver sem agitação à temperatura de 4°C.

### 2.2.9.4 - Na<sub>2</sub>EDTA 0,25 M pH 8,0.

O Na<sub>2</sub>EDTA 0,25 M era dissolvido em água bidestilada, a quente, o pH ajustado com NaOH 8 N e estocado a 4°C até o momento do uso.

### 2.2.9.5 - Sarcosil - Desoxicolato de Sódio.

A solução de sarcosil a 4% e desoxicolato de sódio a 1% (sarcosil-DOC) foi preparada em tampão TES pH 8,0, sendo mantida à temperatura ambiente.

### 2.2.9.6 - NaCl 5 M

Foi empregado NaCl PA (Merck). A solução foi feita em água bidestilada, a quente, e mantida a 4°C.

### 2.2.9.7 - Ribonuclease 5 mg/ml

Era preparada em uma solução contendo NaCl 100 mM - Acetato de sódio 10 mM pH 5,2 e após a dissolução, fervida por 2

minutos para destruição de uma possível contaminação por nucleases.

2.2.10 - Soluções e reagentes empregados na clivagem de plasmídios com endonucleases de restrição.

2.2.10.1 - Tampão tris HCl - NaCl (TS) pH 7,4.

O tampão TS pH 7,4 (tris HCl 12 mM, NaCl 100 mM) foi preparado em água bidestilada e mantido a 4°C. Exceptuando-se para a enzima Eco RI, em que a milimolaridade do tris HCl era 200, o tampão TS pH 7,4 foi usado como acima para todas as demais enzimas empregadas.

2.2.10.2 - Tampão tris OH - Na<sub>2</sub>EDTA - H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (TEB) pH 8,3.

O tampão TEB pH 8,3 (Tris OH 89 mM, Na<sub>2</sub> EDTA 2,5 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 89 mM) foi preparado da seguinte maneira: inicialmente o Na<sub>2</sub>EDTA foi dissolvido a quente, em 60% do volume total a ser preparado, em água bidestilada. A seguir o tris OH e o Ácido Bórico foram acrescentados, o volume final completado e o pH ajustado para 8,3.

2.2.10.3 - Solução estabilizadora.

Foi preparada no momento do uso constando de 0,5 ml de MgCl<sub>2</sub> 60 mM, 0,25 ml de gelatina a 0,2% e β-mercaptoetanol 10 mM.

A gelatina era previamente autoclavada a 118°C por 15 minutos. Uma vez preparada, a solução estabilizadora foi mantida imersa em gelo.

#### 2.2.10.4 - Soroalbumina bovina (BSA).

Era preparada em tampão TS pH 7,4 na concentração de 100 µg/ml, sendo mantida a 4°C.

#### 2.2.10.5 - Acetato de potássio 3 M.

Era preparado em água bidestilada e mantido a 4°C.

#### 2.2.10.6 - Solução de ressuspensão.

Era preparada no momento do uso constituindo-se de 5% de ficoll (PM 40.000) e 0,025% de azul de bromofenol, em tampão TEB pH 8,3.

#### 2.2.10.7 - Endonuclease de restrição.

Foram empregadas 4 endonucleases de restrição do tipo II, todas de procedência (BRL INC.). Foram elas: Hind III, Eco RI, Hae III e Pst I.

## 2.3 - Estudos Biológicos.

### 2.3.1 - Manutenção das amostras bacterianas

As amostras foram mantidas em agar estoque à temperatura ambiente, em tubos hermeticamente fechados e ao abrigo da luz. Os estoques, em duplicata, foram renovados em média a cada 6 meses.

### 2.3.2 - Determinação do nível de resistência a drogas antimicrobianas das amostras de *Proteus mirabilis*.

O nível de resistência das 120 amostras de *P. mirabilis* foi determinado frente às seguintes 15 drogas: sulfadiazina (Su), trimetoprin (Tm), furadantina (Fu), ácido nalidíxico (An), ampicilina (Ap), cefaloridina (Cf), cloranfenicol (Cm), tetraciclina (Tc), estreptomina (Sm), canamicina (Km), neomicina (Nm), gentamicina (Gm), tobramicina (Tb), sisomicina (Si) e amicacina (Ac). A determinação do nível de resistência das amostras frente a cada droga foi feita pelo método de diluição seriada em meio sólido, o qual consistiu em semear as amostras a serem estudadas em placas contendo meio com diferentes concentrações de cada antimicrobiano ( 99 ).

A partir de cultura líquida em fase estacionária, cada amostra de *P. mirabilis* foi semeada em 3 ml de TSB e incubada a 37°C por aproximadamente 4 horas, isto é, até atingir a fase exponencial ( $10^8$  bactérias de ml). A cultura foi diluída 1:10 em

solução salina 0,85% estéril e após homogeneização, 0,6 ml desta suspensão celular de cada amostra foi transferido para distintos orifícios de um inoculador automático de Steers ( 143 ). Com este equipamento foi processado um total de 32 amostras em cada placa, sendo 30 de *P. mirabilis* e os 2 orifícios restantes ocupados por uma amostra de *E. coli* K12 sensível a todas as drogas empregadas. As suspensões celulares assim preparadas foram semeadas com o inoculador automático de Steers em placas com o meio de Mueller-Hinton (suplementado com 10 µg/ml de nicotinamida), contendo diferentes concentrações de cada droga e em uma placa com o mesmo meio, sem droga, servindo esta última como controle de viabilidade das amostras em estudo. Tratando-se das placas com sulfadiazina e trimetoprim, o meio de cultura empregado foi o agar mínimo suplementado com 10 µg/ml de nicotinamida e glicose para concentração final de 1%.

Para determinação do nível de resistência a drogas, as soluções estoques de cada antimicrobiano eram preparadas no dia do uso, em volume de 10 ml, na concentração de 5 mg/ml para o cloranfenicol e tetraciclina e 10 mg/ml para as demais drogas.

As placas eram preparadas no dia do uso, adicionando-se adequadas quantidades do meio de cultura fundido e resfriado a aproximadamente 50°C à droga previamente colocada na placa, também na diluição e volume adequados. As concentrações finais de drogas obtidas nas placas eram de 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 e 1.000 µg/ml de meio. Após solidificação do meio as placas eram deixadas em estufa a 40°C por aproximadamente 20 minutos, para permitir a evaporação da água de condensação que se formava à superfície do meio.

Semeadas com o inoculador automático as placas eram incubadas a 37°C por 24 horas. Foi considerado como nível de resistência das amostras a maior concentração de antimicrobiano onde estas apresentaram crescimento igual ou superior a 50% do seu próprio crescimento na placa sem droga.

### 2.3.3 - Transferência de plasmídios por conjugação

#### 2.3.3.1 - Conjugação simples

As amostras doadora e receptora foram semeadas separadamente em 3 ml de TSB e incubadas a 37°C por 20 horas. A amostra doadora foi repicada com alça em 3 ml de TSB e incubada a 37°C em banho maria com agitação por 2 a 3 horas, o suficiente para que a cultura entrasse em fase de crescimento exponencial. A seguir, 1,2 ml da cultura da doadora em fase de crescimento exponencial e 0,6 ml da cultura da receptora em fase estacionária eram transferidos para um erlenmayer de 250 ml. A mistura das culturas era então agitada de modo a ser homogenizada e distribuída por toda a base do frasco, sendo incubada a 37°C por 8 horas. Em seguida era acrescentado à cultura conjugante 1 ml de caldo TSB e esta reincubada por 2 horas a 37°C. A cultura era centrifugada a 4.000 rpm (centrífuga Sorvall RC2-B, rotor GSA, temperatura de 10°C) por 10 minutos, o sobrenadante desprezado e as células ressuspensas em igual volume de salina esteril.

A partir da suspensão celular foram preparadas diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  também em salina. Aliquotas de 0,1 ml da suspensão celular não diluída e das suspensões celulares diluídas

foram semeadas com alça de Drigalski em agar mínimo, acrescido dos nutrientes e drogas antimicrobianas requeridos para a seleção dos transconjugantes. Quando presentes, as drogas antimicrobianas foram utilizadas nas seguintes concentrações: sulfadiazina - 300 µg/ml, ampicilina 15 µg/ml e as drogas cloranfenicol, tetraciclina, estreptomicina, canamicina e ácido nalidixico a 20 µg/ml. Uma vez semeadas as placas eram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. Como controle, suspensões não diluídas das amostras doadoras e receptoras foram também semeadas separadamente em placas semelhantes a seletora de transconjugantes. A partir de placas seletoras com crescimento, 5 a 10 colônias eram purificadas em placa contendo o meio seletor e em seguida investigadas quanto às suas novas características.

A frequência de transferência de plasmídeo foi calculada dividindo-se o número de colônias recombinantes obtidas pelo número de bactérias doadoras viáveis empregadas em cada conjugação.

#### 2.3.3.2 - Conjugação tripla

As conjugações triplas, isto é, empregando em um só experimento 3 amostras distintas, eram conduzidas da seguinte forma: as amostras eram semeadas separadamente em 3 ml de TSB e incubadas a 37°C por 18 horas. A doadora inicial e a primeira receptora eram repicadas com alça para 3 ml de TSB e incubadas a 37°C em banho maria com agitação, por 2 a 3 horas, o suficiente para que as culturas entrassem em fase de crescimento exponencial. Em seguida 0,6 ml de cada uma delas eram transferidos

para erlenmayer de 250 ml e misturados de modo a cobrir toda a base do frasco. A cultura conjugante era incubada em estufa a 37°C por 8 horas. Finalmente, 0,6 ml da terceira amostra, *E. coli* J53F<sup>-</sup> ou *E. coli* C600F<sup>-</sup>, também em fase exponencial de crescimento, era adicionado à cultura conjugante e homogenizado. A cultura era incubada a 37°C por 15 a 18 horas. O restante do procedimento se fez como descrito para o primeiro tipo de conjugação.

Este tipo de conjugação foi empregado na mobilização de plasmídio R não conjugativo.

#### 2.3.4 - Teste em placa réplica

Quando necessário, ao final de cada conjugação 100 colônias foram purificadas em placas contendo o meio seletor e a seguir, juntamente com as amostras doadora e receptora, foram semeadas com palitos de madeira estéreis em uma placa com TSA e sem droga, denominada placa réplica. Esta placa foi incubada a 37°C por 2 a 3 horas e em seguida, com o auxílio de um veludo estéril, as colônias foram replicadas para placas com agar mínimo ou Mac Conkey contendo droga, segundo o método descrito por Lederberg & Lederberg ( 96 ). Com o emprego deste método era possível verificar se transconjugantes selecionados em placa contendo uma só droga antimicrobiana apresentavam as demais marcas de resistência encontradas no plasmídio da amostra doadora.

### 2.3.5 - Determinação de grupo de incompatibilidade plasmidial

Plasmídios R conjugativos de *P. mirabilis*, previamente transferido para uma amostra de *E. coli* 711F<sup>-</sup>, foram investigados quanto ao seu grupo de incompatibilidade. Para tanto eram analisadas frente aos plasmídios de referência dos 28 grupos conhecidos até o momento. Segundo o Centro de Referência de Plasmídios, tais elementos de DNA extracromossômicos estão distribuídos nos seguintes tipos de amostras derivadas de *E. coli* K12: 24 em J53, 3 em C600 e 1 em *E. coli* prototrófica (Tabela III).

Cada amostra de *E. coli* 711, contendo o plasmídio R em estudo, foi empregada como doadora e acasalada com cada amostra receptora contendo os plasmídios referência. Com base nas marcas de auxotrofia e resistência a drogas foram selecionadas 100 colônias transconjugantes de cada acasalamento contendo os 2 plasmídios. Estas 100 colônias foram repicadas por 2 vezes em agar Mac Conkey sem droga e em seguida, juntamente com as amostras doadora e receptora portando apenas seus plasmídios originais, semeadas através placa réplica, em um conjunto de placas com meio mínimo e em uma placa com Mac Conkey sem droga. Aqui, a placa com TSA foi usada como controle de viabilidade das amostras e o conjunto de placas com meio mínimo continha diferentes drogas antimicrobianas de modo a se demonstrar a permanência de apenas um ou outro plasmídio, ou ainda a coexistência de ambos nas colônias investigadas.

A coexistência dos 2 plasmídios em todas ou quase todas as 100 colônias, caracterizava compatibilidade entre os mes

mos. Por outro lado, a segregação de um deles, denotada pela ausência de crescimento da amostra hospedeira em placa seletora adequada, em pelo menos 25% das colônias estudadas era fortemente indicativo de incompatibilidade. Como controle da segregação por incompatibilidade, determinou-se a frequência de perda espontânea de cada um destes plasmídios, em separado, na amostra hospedeira onde a incompatibilidade entre os mesmos foi demonstrada.

Dois plasmídios foram considerados incompatíveis quando, descontada a respectiva frequência de perda espontânea, a frequência de segregação de um ou de outro deles foi igual ou superior a 25%.

#### 2.3.6 - Determinação do genótipo *fin O tra O* dos plasmídios das amostras PM-49/69, PM-50/69 e PM-51/69

O estudo em questão foi realizado inicialmente com o plasmídio pPM13 da amostra PM-51/69, com marcas de resistência para Tc e Sm (Tabelas VI e VIII). Para tanto o plasmídio pPM13 foi transferido por conjugação para amostras derivadas de *E. coli* K12 (Tabela I), sendo obtidos os transconjugantes 711 pPM13, C600 pPM13 e J53 pPM13. A partir do transconjugante obtido na amostra C600 o plasmídio pPM13 foi transferido por conjugação para a amostra 711 p307 (Tabela V), sendo obtido o recombinante 711 p307 pPM13. Em seguida as amostras 711 pPM13 e 711 p307 pPM13 foram conjugadas em separado com a amostra J53 F<sup>-</sup> e a frequência de transferência de plasmídio pPM13 calculada em cada a

casalamento. A partir do recombinante obtido na amostra 711 o plasmídeo pPM13 foi transferido para a amostra P53pR386 (Tabela IV), sendo obtido o transconjugante J53pR386 pPM13. As amostras J53 pMM13 e J53 pR386 pPM13 foram conjugadas com a amostra C600 F<sup>-</sup> e a frequência de transferência do plasmídeo pPM13 calculada nas conjugações. Finalmente, a partir do transconjugante C600 pPM13, este plasmídeo foi transferido por conjugação para a amostra 711 F'Lac (Tabela IV), obtendo-se o recombinante 711 F'Lac pPM13. A seguir as amostras 711 F'Lac e 711 F'Lac pPM13 foram separadamente acasaladas com a amostra C600 F<sup>-</sup> e a frequência de transferência do plasmídeo F'Lac calculada em cada conjugação.

Experimentos semelhantes foram realizados com os plasmídios pPM11 e pPM12, respectivamente das amostras PM-49/69 e PM-50/69.

### 2.3.7 - Detecção da enterotoxina LT.

As amostras em estudo foram inoculadas em 1 ml do meio padrão para a produção de enterotoxina ( 99 ) e incubadas a 37°C, sob agitação, por 18 horas. As culturas centrifugadas a 3.000 rpm por 20 minutos e 25 µl de cada sobrenadante transferidos para distintos orifícios de uma miniplaca (Falcon) contendo células Y-1. A miniplaca foi incubada a 37°C por 18 horas, procedendo-se então a leitura do teste. Foi considerado positivo para enterotoxina LT todo sobrenadante capaz de alterar morfológicamente as células Y-1, arredondando-as. Tais células, fibroblásticas, são normalmente alongadas.

### 2.3.8 - Determinação da sensibilidade de amostras bacterianas aos bacteriófagos R17 e ØII.

Várias amostras deste trabalho e alguns de seus transconjugantes foram investigados quanto a sua sensibilidade à infecção e lise pelo fago macho específico R17 e pelo fago fêmea específico ØII. Em cada experimento foram incluídas as amostras *E. coli* 711 F<sup>-</sup> resistente ao fago R17 e sensível a ØII, e a amostra *E. coli* CA77 sensível ao fago R17 e resistente ao ØII. As amostras foram cultivadas a 37°C em TSB, até que atingissem a fase de crescimento exponencial. A seguir, 0,2 ml de cada cultura foi homogenizado em 1,8 ml de agar semi-sólido (agar a 0,7% em TSB com 10 mM de CaCl<sub>2</sub>) a aproximadamente 50°C e vertido sobre uma placa com TSA. Após esfriamento da camada de agar semi-sólido foi pingada uma gota de suspensão de cada fago e as placas foram incubadas a 37°C por 15 a 18 horas. A presença de áreas de lise eram indicativas da sensibilidade da bactéria ao fago em questão.

## 2.4 - Estudo Físico-Químicos

### 2.4.1 - Análise eletroforética de plasmídios

As 120 amostras de *P. mirabilis*, a maioria dos transconjugantes obtidos neste trabalho e amostras de *E. coli* contendo plasmídios com peso molecular referência, foram analisadas quanto ao seu conteúdo de DNA plasmidial sob eletroforese em gel de agarose. Para tanto, cada amostra era submetida ao seguinte tra

tamento: a amostra foi semeada a partir de crescimento em meio líquido em 3 ml de TSB e incubada a 37°C por 8 horas em banho maria com agitação. A cultura era centrifugada a 5.000 rpm por 15 minutos (centrífuga Sorvall RC2-B, rotor SS-34, temperatura de 5°C), o sobrenadante desprezado e as células ressuspensas em 1 ml de tampão TE pH 8,0. A suspensão celular era transferida para tubo tipo Eppendorff e centrifugada nas condições acima descritas. Desprezado o sobrenadante, as células eram ressuspensas em 50 µl de tampão TE pH 8,0 contendo 15 µg/ml de RNase e a suspensão celular transferida para outro tubo tipo Eppendorff contendo 300 µl de SDS a 3%, em tampão TE pH 12,4. O tubo contendo a mistura era agitado por inversão por 5 vezes e em seguida incubado estaticamente em banho maria a 60°C por 20 minutos. Após o que, eram acrescentados 20 µl de tris HCl 2 M e 0,7 ml da solução fenol-clorofórmio 1:1 (v/v). A mistura era agitada por inversão por 5 vezes e centrifugada a 7.000 rpm por 15 minutos (centrífuga Sorvall RC2-B, rotos HL-4, temperatura de 0 a 5°C). Foram transferidos 50 µl de sobrenadante para tubo tipo Eppendorff contendo 15 µl da solução de ficoll 10% - azul de bromofenol 0,025%, em tampão TE pH 8,0. A mistura foi homogenizada e todo o volume transferido com micropipeta (Shwartz-Mann) para a canaleta do gel de agarose. Por este método podiam ser analisadas até 15 amostras em uma só corrida eletroforética.

A preparação e montagem do gel de agarose na cuba para eletroforese eram feitas como a seguir: 70 ml de agarose (Seakem) (na concentração de 0,8%, em tampão E pH 8,0 eram fundidos a 100°C e resfriados a aproximadamente 50°C. Cerca de 10 ml desta agarose eram depositados na calha da câmara inferior da cuba

de eletroforese. Em seguida, duas placas de vidro medindo 14 x 15 x 0,5 cm, separadas entre si por 3 espaçadores de acrílico (2 laterais e 1 inferior) medindo 14 x 1 x 0,4 cm e presas com o auxílio de garras metálicas especiais, eram montadas verticalmente. A agarose era derramada entre as placas de vidro preenchendo todo o espaço entre as mesmas. Um pente de acrílico contendo um número variável entre 4 e 15 dentes, foi também posicionado entre as placas de vidro e por sobre a porção mais superior da camada de agarose. O conjunto era mantido à temperatura ambiente e, após solidificação da agarose, o pente era retirado cuidadosamente, deixando no gel, canaletas correspondentes às posições e número de dentes. Após retirada do espaçador inferior, o conjunto era montado em cuba de eletroforese vertical com auxílio das mesmas garras empregadas anteriormente. As câmaras superior e inferior eram então preenchidas com tampão TE.

A preparação era inicialmente submetida a uma corrente elétrica de 10 mA por 15 minutos, e daí em diante a 50 mA, por cerca de 2 horas ou até que o corante da preparação (azul de bromofenol) migrasse ao longo do gel e surgisse no tampão da câmara inferior. Finda a corrida eletroforética, o conjunto placas e gel de agarose era retirado da cuba e este último transferido para uma cuba de vidro contendo 100 ml de uma solução de brometo de etídio a 1 µg/ml. A preparação foi mantida sob proteção da luz por 15 a 20 minutos e em seguida examinada em um transiluminador (Chromato vue Transiluminador C-61) equipado com lâmpadas ultravioleta ondas curtas.

Quando necessário, a preparação era fotografada com câmera tipo 35 mm, equipada com lente de 50 mm 1/1.4 e anéis de a

proximação Nikon nº 1 e 3. As fotografias foram tomadas com filme tri X panatomic ou High Contrast, sendo revelados de acordo com as especificações do fabricante (Kodak).

Os plasmídios de tais amostras analisadas, foram designados com a letra p minúscula seguidas das letras maiúsculas PM, relativas a *Proteus mirabilis*, e de um número crescente correspondente à ordem em que cada plasmídio foi detectado. Os números dos plasmídios não correspondem aos números das amostras em que foram encontrados. Quando uma amostra apresentou mais de um plasmídio, todos eles receberam o mesmo número, acrescido de letras minúsculas e em ordem alfabética, iniciando-se pelo de maior peso molecular. Assim, por exemplo, se a amostra PM-01/69 albergasse 3 plasmídios, estes elementos extracromossômicos seriam designados pPMLa (maior peso molecular), pPMLb (peso molecular intermediário) e pPMLc (menor peso molecular).

#### 2.4.2 - Determinação do peso molecular de plasmídios Bacterianos

Foram determinados os pesos moleculares aproximados dos plasmídios de várias amostras deste trabalho, incluindo alguns transconjugantes. Para tanto, os lisados de tais bactérias e daquelas contendo plasmídios referência foram submetidos a eletroforese em gel de agarose. Com base nas medidas de migração de cada plasmídio, tomadas em fotografia de cada gel, foram construídos gráficos de migração relativa dos plasmídios em estudo, frente aos plasmídios referência. Os gráficos foram construídos em papel Log x Log, conforme descrito por Meyers e cols. (100).

### 2.4.3 - Extração de DNA plasmidial por ultracentrifugação em gradiente de densidade de cloreto de césio - brometo de etídio

Os plasmídios de 6 amostras deste trabalho foram extraídos por ultracentrifugação em gradiente de densidade de cloreto de césio-brometo de etídio. Cada amostra foi cultivada em 3 ml de TSB a 37°C por 18 horas e a seguir, 1 ml desta cultura foi usada para inocular 1 litro de TSB que foi incubado a 37°C por 12 horas e sob agitação - 150 rpm (Controlled Environment Incubator Shaker - New Brunswick). A amostra era centrifugada a 5.000 rpm por 15 minutos (Centrífuga Sorvall RC2-B, rotor GL-4 temperatura de 5°C), o sobrenadante desprezado, o sedimento ressuspenso em 50 ml de tampão TES e centrifugado como acima. O sobrenadante era desprezado e o sedimento celular ressuspenso em cerca de 10 ml de sacarose a 25% (p/v) em tris HCl 0,05 M.

Aqui o processamento podia ser interrompido por tempo indeterminado, bastando para tanto que a amostra fosse mantida a -16°C, ou continuado subdividindo-se a suspensão celular em alíquotas de aproximadamente 3 ml.

Era adicionado 0,3 ml de lisozima 10 mg/ml em TES pH 8,0 (Tris 0,03 M, EDTA 0,005 M, NaCl 0,05 M) a cada tubo com suspensão celular e estes incubados em banho maria a 26°C (Gyrotory Water Bath Shaker New Brunswick) por 15 minutos sob discreta agitação. Após o que era acrescentado 0,3 ml de Na<sub>2</sub>EDTA 0,25 M a cada tubo e a incubação em banho mantida como acima. Após esta fase o material era transferido para banho de gelo, sendo adicionado de 1,5 ml de sarcosil-DOC e a lise promovida por agita-

ção suave de cada tubo. Foi adicionado 1 ml de NaCl 5 M a cada tubo e o conjunto destes mantido em banho de gelo por 3 horas. O material era centrifugado a 15.000 rpm por 15 minutos (Centrífuga Sorvall RC2-B, rotor SS-34, temperatura de 0 a 5°C) e o sobrenadante transferido para frascos previamente fervidos e contendo 50 µl de RNase a 20 µg/ml em tampão TES. Os tubos com material eram deixados a temperatura ambiente por 20 minutos.

Nesta fase do processamento, visando verificar a qualidade das preparações, por vezes foi feita eletroforese em gel de agarose dos sobrenadantes em estudo.

Cloreto de césio foi acrescentado e dissolvido em cada preparação até que a mesma atingisse um Índice de refração (IR) de 1,39-8. Para tanto foi empregado um refratômetro (Carl Zeiss) previamente padronizado com água bidestilada (IR = 1,33-3). Era acrescentado brometo de etídio para concentração final de aproximadamente 100 µg/ml e a preparação mantida sob proteção da luz. O material era transferido para tubos de ultracentrífuga que eram tarados cuidadosamente e centrifugados a 44.000 rpm por 46 horas (Ultracentrífuga Beckman L5-50, rotor 50-TI, temperatura de 13°C).

As preparações foram visualizadas sob luz ultravioleta (Lâmpada UVL-21 - Ultra-Violet Products) e as bandas correspondentes a plasmídios colhidas com o auxílio de um coletor de fração (Beckman). O brometo de etídio foi extraído com álcool isopropílico a 4°C e a preparação submetida a diálise por 48 horas em tampão TE pH 7,5 também a 4°C. O material dialisado foi transferido para tubo e precipitado com 2,5 vezes o seu volume inicial com etanol PA (Merck) mantido a -16°C. A preparação foi a

gitada por inversão e quando homogenizada, incubada a  $-16^{\circ}\text{C}$  por pelo menos 12 horas. O material foi centrifugado a 10.000 rpm (centrífuga Sorvall RC2-B, rotor SS-34, temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$ ) por 30 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspense em 100  $\mu\text{l}$  de tampão TE pH 7,5. O conteúdo de DNA plasmidial assim extraído foi mantido a  $4^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

#### 2.4.4 - Análise de DNA plasmidial com nucleases de restrição.

Plasmídios bacterianos extraídos por ultracentrifugação em gradiente de densidade de cloreto de césio-brometo de etídio foram analisados com as seguintes nucleases de restrição do tipo II: Hind III, Eco RI, Hae III e Pst I. Cada conteúdo plasmidial foi tratado como a seguir: inicialmente foi feita uma mistura constando de 20  $\mu\text{l}$  de tampão TS pH 7,4 (tris HCl 12 mM, NaCl 100 mM), 10  $\mu\text{l}$  de solução estabilizadora, 0,2  $\mu\text{l}$  de soroalbumina bovina, 2  $\mu\text{l}$  de DNA plasmidial, 1  $\mu\text{l}$  de enzima de restrição e 6,8  $\mu\text{l}$  de água bidestilada estéril. Esta mistura era homogenizada e incubada em banho maria a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. Tratando-se de enzima Pst I, a incubação foi feita a  $30^{\circ}\text{C}$ ; eram a acrescentados 4  $\mu\text{l}$  de acetato de potássio 3 M e 100  $\mu\text{l}$  de etanol PA (Merck) a  $-16^{\circ}\text{C}$ . A preparação era mantida em gelo seco moído por 15 minutos e então centrifugada a 15.000 rpm (centrífuga Sorvall RC2-B, rotor SS-34, temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$ ) por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o tubo com sedimento submetido a vácuo por 5 minutos, dentro de um dessecador acoplado a uma bomba de vácuo. Eram acrescentados 20  $\mu\text{l}$  da solução de

ressuspensão constituída de ficoll a 5% e azul de bromofenol a 0,25% em tampão TEB pH 8,3 (tris OH 89 mM, EDTA 2,5 mM,  $H_3BO_3$  89 mM). Essa mistura final foi homogenizada e o seu volume total transferido para canaleta do gel de agarose. Como controle, para cada gel onde foram examinados plasmídios pelas enzimas em questão, duas dessas amostras eram constituídas de DNA do fago lambda, submetido a preparo similar mas clivado apenas com a enzima Hind III. As preparações foram submetidas a eletroforese, conforme metodologia já descrita. A partir daqui o material foi processado como descrito em 2.4.1.

TABELA I - Amostras derivadas de *Escherichia coli* K12 empregadas como receptoras em experimentos de conjugação.

Amostras	Marcadores Genéticos
<i>E. coli</i> 711 F <sup>-</sup>	phe, his, trp, pro, lac, Nal <sup>r</sup>
<i>E. coli</i> C600 F <sup>-</sup>	thr, leu, thy, lac
<i>E. coli</i> J53 F <sup>-</sup>	pro, met, Nal <sup>r</sup>

TABELA II - Características dos plasmídios conjugativos da amostra de *Escherichia coli* 711, empregados na mobilização de plasmídio R não conjugativo.

Amostra hospedeira	Características dos plasmídios			
	Designação	Marcadores	Grupo INC	Genótipo <i>Fin</i> <i>O</i> <i>tra</i>
<i>E. coli</i> 711 EP2	pTM2	Ent <sup>+</sup> (LT)	L	<i>fin</i> O <sup>+</sup> <i>tra</i> O <sup>C</sup>
<i>E. coli</i> 711 EP9	pTM9	Ent <sup>+</sup> (LT)	L	<i>fin</i> O <sup>+</sup> <i>tra</i> O <sup>C</sup>
<i>E. coli</i> 711 EP16	pTM16	Ent <sup>+</sup> (LT)	L	<i>fin</i> O <sup>+</sup> <i>tra</i> O <sup>C</sup>
<i>E. coli</i> 711 F'Lac	F'Lac	Lac <sup>+</sup>	FI	<i>fin</i> O <sup>-</sup> <i>tra</i> O <sup>+</sup>

TABELA III - Plasmídios de referência dos grupos de incompatibilidade.

Número da amostra no PRC*	Grupo de incompatibilidade	Designação do plasmídio	Marcadores genéticos
101	A	RA1	Su, Tc
094	C	pIP55 (R55)	Ap, Cm, Gm, Km, Su
611	D	R711b	Kn
103	FI	R386	Tc
352	FI <sub>me</sub>	TP181	Ap, Cm, Km, Sm, Sp, Su, Tc
329	FII	R6-5	Cm, Km, Nm, Sm, Sp, Su
629	FIII	pSU104	Cb, (Hly <sup>-</sup> )
105	FIV	R124	Tc
301	FV	Fo Lac	Lac
107	H1	R27	Tc
108	I, I <sub>1</sub> , I, I	R144	Kn, Tc
109	I	R621a	Tc
309	I	R721	Sm, Tp
314	I	R805a	Kn
361	I <sub>2</sub>	TP114	Kn
110	J	R391	Kn
226	K	R387	Cm, Sm
113	L=M	R446b	Sm, Tc
114	N	N3	Sm, Su, Tc
115	O=B	R <sup>16</sup>	Ap, Sm, Su, Tc
116	P	RP4	Ap, Km, Tc
117	S=H2	R478	Cm, Km, Tc
118	T	Rts1	Kn
119	W	S-a	Cm, Km, Sm, Su
200	X	R6K	Ap, Sm
648	Y	pSM14	Cm, Tc
241	9	pIP71a	Ap, Cm, Sm, Su, Tc
215	H3	pIP233	Suc

\*PRC - Plasmid Reference Center.

TABELA IV - Características das amostras de *Escherichia coli* e respectivos plasmídios, empregados na determinação do genótipo *Fin O tra O* dos plasmídios das amostras PM-49/69, PM-50/69 e PM-51/69.

Amostra hospedeira	Características dos plasmídios			
	Designação	Marcadores	Grupo INC	Genótipo <i>Fin O tra</i>
<i>E. coli</i> 711	P307	Ent+(LT)	FI	<i>fin O<sup>+</sup> tra O<sup>-</sup></i>
<i>E. coli</i> J53	R386	Tc	FI	<i>fin O<sup>+</sup> tra O<sup>C</sup></i>
<i>E. coli</i> 711	F'Lac	Lac <sup>+</sup>	FI	<i>fin O<sup>-</sup> tra O<sup>-</sup></i>

TABELA V - *Escherichia coli* portadoras de plasmídios com peso molecular padrão para eletroforese em gel de agarose.

Amostra hospedeira	Características dos plasmídios	
	Designação	Peso molecular (Daltons)
<i>E. coli</i> J53	pR27	110 x 10 <sup>6</sup>
<i>E. coli</i> 711	p307	54 x 10 <sup>6</sup>
<i>E. coli</i> J53	pRP4	34 x 10 <sup>6</sup>
<i>E. coli</i> J53	pS-a	23 x 10 <sup>6</sup>
<i>E. coli</i> HB101	pBR322	2,7 x 10 <sup>6</sup>

### 3 - RESULTADOS

3.1 - Nível de resistência a drogas antimicrobianas das amostras de *Proteus mirabilis*.

3.1.1 - Nível de resistência a drogas dos *Proteus mirabilis* isolados em 1969.

Dentro deste grupo de 60 amostras, 20 delas exibiram resistência a concentrações de pelo menos 20 µg/ml frente a uma ou mais drogas antimicrobianas. Por outro lado, as demais amostras mostraram-se sensíveis a todos os antimicrobianos empregados, apresentando de modo geral crescimento em concentrações inferiores a 5 µg/ml. As 20 amostras consideradas resistentes a uma ou mais drogas, assim como seus respectivos níveis de resistência, estão discriminados na Tabela IV.

3.1.2 - Nível de resistência a drogas dos *Proteus mirabilis* isolados em 1980.

Dentre as amostras componentes deste grupo, 12 delas mostraram resistência para concentrações de drogas a partir de 20 µg/ml, para um ou mais dos antimicrobianos utilizados. As

tras amostras deste grupo comportam-se como sensíveis, não apresentando crescimento em concentrações de drogas iguais ou superiores a 5 µg/ml. As 12 amostras resistentes a uma ou mais drogas e seus respectivos níveis de resistência encontram-se na Tabela VII.

### 3.2 - Estudo eletroforético em gel de agarose das amostras dos plasmídios de *Proteus mirabilis*.

#### 3.2.1 - Eletroforese dos plasmídios dos *Proteus mirabilis* isolados em 1969.

Foram demonstrados plasmídios em 16 das 60 amostras deste grupo, estudadas por eletroforese em gel de agarose. Nas amostras PM-06/69 e PM-56/69 foram detectados 2 plasmídios em cada uma delas, enquanto nas amostras PM-04/80, PM-08/80, PM-10/69, PM-11/69, PM-25/69, PM-26/69, PM-43/69, PM-47/69, PM-48/69, PM-49/69, PM-50/69, PM-51/69, PM-55/69 e PM-57/69 foi encontrado apenas 1 elemento extracromossômico em cada uma delas. Todas as 16 amostras acima citadas fazem parte daquele subgrupo de 20 amostras resistentes a drogas descrito anteriormente (Tabela IV).

As Figuras I e II correspondem aos géis com os plasmídios das 16 amostras em questão, juntamente com os plasmídios com peso molecular referência para eletroforese em gel de agarose (Tabela V). As designações conferidas aos plasmídios encontrados nas amostras de *P. mirabilis* isolados em 1969 estão expressos nas Figuras I e II, e na Tabela VIII.

### 3.2.2 - Eletroforese dos plasmídios dos *Proteus mirabilis* isolados em 1980.

A análise eletroforética deste grupo de 60 amostras detectou plasmídios em apenas 8 delas. Observando a Figura III pode-se verificar que na amostra PM-06/80 foram encontrados 3 plasmídios, nas amostras PM-02/80, PM-03/80 e PM-04/80 foram demonstrados 2 plasmídios em cada uma delas e nas amostras PM-01/80, PM-05/80, PM-07/80 e PM-08/80 apenas 1 plasmídio para cada uma delas. Estas 8 amostras fazem parte daquele subgrupo de 12 amostras resistente a drogas descrito previamente (Tabela VII). As notações conferidas aos plasmídios detectados nas amostras de *P. mirabilis* isoladas em 1980 constam da Figura III e Tabela IX.

### 3.3 - Pesos moleculares dos plasmídios de *Proteus mirabilis*.

A Figura IV ilustra o tipo de curva em papel log x log através da qual foram calculados os pesos moleculares aproximados, em Daltons, dos plasmídios de 8 das 16 amostras de *P. mirabilis* isoladas em 1969. A curva em questão foi construída conforme descrição de Meyers e colaboradores (100), com o auxílio de plasmídios com peso molecular referência para eletroforese em gel de agarose (Tabela V). Por este método foram calculados os pesos moleculares aproximados de todos os plasmídios das amostras de *P. mirabilis* empregadas nesta investigação e de alguns de seus transconjugantes.

3.3.1 - Pesos moleculares dos plasmídios dos *Proteus mirabilis* isolados em 1969.

Os pesos moleculares aproximados dos 18 plasmídios das 16 amostras acima variaram entre  $2,5 \times 10^6$  e  $56 \times 10^6$ . Estes valores estão expressos na Tabela VIII.

3.3.2 - Pesos moleculares dos plasmídios dos *Proteus mirabilis* isolados em 1980.

Os pesos moleculares aproximados dos 12 plasmídios deste subgrupo de 8 amostras variaram de  $20 \times 10^6$  a  $90 \times 10^6$ . Tais valores encontram-se na Tabela IX.

3.4 - Transferência de plasmídios R de *Proteus mirabilis* para *Escherichia coli* 711 F<sup>-</sup>, por conjugação.

As amostras recombinantes obtidas pelo cruzamento entre *P. mirabilis* e *E. coli* 711 F<sup>-</sup> foram denominadas *E. coli* 711 mais a notação dada ao plasmídio ou plasmídios que elas albergavam. A notação dos plasmídios dos transconjugantes seguiu basicamente as diretrizes empregadas para os plasmídios de *P. mirabilis*, isto é, cada plasmídio detectado por eletroforese em *E. coli* 711 recebeu a denominação que já tinha no respectivo *P. mirabilis* doador, acrescida da notação relativa à droga antimicrobiana presente na placa onde tal recombinante foi isolado. Assim, por exemplo, supondo que quando PM-06/69 foi acasalado com *E. coli* 711 F<sup>-</sup> tenham sido obtidos transconjugantes em placas se

letoras com Tc, Ap e Sm, e mais, que a análise eletroforética mostrou em seguida que tais recombinantes hospedavam respectivamente 3, 2 e 1 plasmídeo, estes transconjugantes receberiam a seguinte notação: a) recombinantes selecionados em Tc, portadores de 3 plasmídios, seriam denominados de 711 pPM2abc-Tc porque hospedavam 1 plasmídeo semelhante a pPM2a e outro semelhante a pPM2b, encontrados na amostra doadora PM-06/69, bem como uma terceira banda, extra, não detectada em PM-06/69 e por isso designada de pPM2c. Neste caso o transconjugante albergaria os plasmídios pPM2a-Tc, pPM2b-Tc e pPM2c-Tc, sendo sua notação simplificada para *E. coli* 711 pPM2abc-Tc. b) recombinantes isolados em Ap, albergando 2 plasmídios (pPM2a-Ap e pPM2b-Ap), seriam designados de *E. coli* 711 pPM2ab-Ap. c) finalmente, transconjugantes selecionados em Sm e com 1 só plasmídeo seriam denominados de *E. coli* 711 pPM2a-Sm.

#### 3.4.1 - Conjugações de *Proteus mirabilis* isolados em 1969 com *Escherichia coli* 711 F<sup>-</sup>.

As 16 amostras deste grupo, apresentando resistência a drogas (Tabela VI) e plasmídios (Figuras I e II), foram acasaladas com *E. coli* 711 F<sup>-</sup> e após repetidas tentativas verificou-se que de apenas 4 das 16 doadoras, isto é, PM-06/69, PM-49/69, PM-50/69 e PM-51/69, foram obtidos transconjugantes. As demais amostras, apresentando plasmídios não conjugativos, foram ainda acasaladas com amostras de *E. coli* J53 F<sup>-</sup> e C600 F<sup>-</sup> por pelo menos duas vezes, mas sem sucesso.

A partir do cruzamento envolvendo a amostra PM-06/69,

hospedando os plasmídios pPM2a e pPM2b (Figura I, Tabela VIII) e exibindo resistência frente a Tc, Su, Ap, Cm, Sm e Km (Tabela VI), foram obtidos transconjugantes em placas seletoras com cada uma destas drogas em separado. Por outro lado, a partir das amostras PM-49/69, PM-50/69 e PM-51/69, albergando cada uma delas 1 só plasmídio, respectivamente pPM11, pPM19 e pPM13, e resistência a Tc e Sm (Tabela VI), foram obtidos transconjugantes com cada uma destas drogas em separado.

#### 3.4.1.1 - Teste em placa réplica dos recombinantes dos *Proteus mirabilis* isolados em 1969.

Os recombinantes do acasalamento entre PM-06/69 x *E. coli* 711 F<sup>-</sup>, quando estudados em placa réplica exibiram de modo uniforme resistência para todas as 6 drogas (Tc, Su, Ap, Cm, Sm e Km), independentemente da droga presente na placa em que foram selecionados. Também, de modo relativamente similar, os transconjugantes oriundos do cruzamento entre cada uma das amostras PM-49/69, PM-50/69 e PM-51/69 x *E. coli* F<sup>-</sup>, demonstraram resistência tanto para Tc como para Sm, indiferentemente da droga em que foram selecionados.

#### 3.4.1.2 - Frequência de transferência dos plasmídios de *Proteus mirabilis*, isolados em 1969, para *Escherichia coli* 711 F<sup>-</sup>, por conjugação.

Os plasmídios transferíveis das amostras de *P. mirabilis* isoladas em 1969 exibiram uma frequência de transferência

que variou entre  $1,24 \times 10^{-7}$  e  $7,33 \times 10^{-7}$ . As frequências obtidas com cada plasmídeo se encontram na Tabela VIII.

3.4.1.3 - Análise eletroforética e determinação dos pesos moleculares dos plasmídios dos recombinantes provenientes dos *Proteus mirabilis* isolados em 1969.

A Figura V corresponde à eletroforese em gel de agarose dos plasmídios da amostra PM-06/69 e de seus transconjugantes. Através desta análise verificou-se que os recombinantes oriundos do acasalamento entre PM-06/69 e *E. coli* 711 F<sup>-</sup>, mostraram comportamento variável entre si, em relação à droga presente na placa seletora.

A amostra PM-06/69 que em repetidas eletroforeses apresentava apenas dois plasmídios bem característicos (Figuras I e IV), em raras eletroforeses como esta correspondente à Figura V, exibe uma terceira banda posicionada entre as duas comumente encontradas. Por isso, segundo o parão de designação de plasmídios anteriormente descrito no item 3.4, nesse caso a amostra PM-06/69 apresenta os elementos pPM2a, pPM2b e pPM2c. Conduta semelhante é aplicada os plasmídios extras encontrados nos seus transconjugantes.

Os recombinantes selecionados em placas com Sm ou Km exibem sempre uma só banda plasmidial, respectivamente pPM2a-Sm e pPM2a-Km, que migra para a mesma posição da banda correspondente ao maior plasmídeo de PM-06/69 (pPM2a), com  $56 \times 10^6$  dältons (Figura V, Tabela VIII).

Diferentemente dos recombinantes acima, aqueles selecionados em placas com Tc, Su, Ap e Cm, apresentam sempre duas ou três bandas plasmidiais. De modo uniforme e constante, estas quatro amostras exibem uma banda similar àquela dos transconjugantes selecionados em Sm e Km, respectivamente pPM2a-Sm e pPM2a-km, e portanto também situada na mesma posição do plasmídeo de PM-06/69 (pPM2a). A amostra selecionada em Tc apresenta mais duas bandas: uma que invariavelmente coincide com a posição da banda inferior de PM-06/69, neste caso pPM2c (Figura V), e uma outra extra, situada em plano superior ao da maior banda de PM-06/69, o que denota maior peso molecular. Por conseguinte, este transconjugante selecionado em Tc se caracteriza por ser o único do grupo, a apresentar sempre dois plasmídios que são eletroforéticamente semelhantes àqueles encontrados na amostra PM-06/69 (pPM2b-Tc é semelhante a pPM2a e pPM2c-Tc é semelhante a pPM2c). O aparecimento da banda de maior peso molecular (pPM2a-Tc) é inconstante, variando de um para outro experimento eletroforético.

Os outros 3 transconjugantes, selecionados em Su, Ap e Cm, também apresentam mais uma ou duas bandas na corrida eletroforética. Estas 3 amostras exibem sempre um plasmídeo cuja banda, de modo uniforme, se localiza um pouco acima da banda inferior de PM-06/69 (pPM2c), coincidindo com a posição da banda intermediária desta amostra (pPM2b). Tais bandas nem sempre são de fácil registro fotográfico.

Assim como a amostra selecionada em Tc pode apresentar um plasmídeo extra, de maior peso molecular que os comumente encontrados, os recombinantes selecionados em Su, Ap e Cm também

exibem tal propriedade: na Figura V esta banda extra é encontrada também nos recombinantes selecionados em Su e Cm. No último recombinante ela é tênue e por isso de difícil observação e registro fotográfico. Esta banda extra não é encontrada no transconjugante selecionado com Ap. Entretanto, este achado não é constante, havendo variação de um experimento eletroforético para outro, para qualquer dos transconjugantes selecionados com Tc, Su, Ap ou Cm.

Na Figura V são vistas 3 bandas correspondentes e elementos extracromossômicos nas canaletas relativas às amostras PM-06/69, recombinantes selecionados em Tc, Su e Cm, duas bandas na canaleta do transconjugante selecionado em Ap e apenas uma na- dos recombinantes selecionados em Sm e Km. As bandas encontradas nas últimas canaletas (lado direito), são dos plasmí-  
dios com peso molecular referência para eletroforese (Tabela V).

Os pesos moleculares de todos os plasmídios acima descritos estão discriminados na Tabela X.

A Figura VI corresponde a uma análise eletroforética dos plasmídios das amostras acima descritas, exceptuando-se aqueles elementos com peso molecular referência. Neste caso os transconjugantes foram previamente cultivados em meio com e sem a respectiva droga antimicrobiana onde foram originalmente selecionados. Como pode ser depreendido pelo exame sumário da Figura VI, o tratamento com as drogas em questão não determinou qual-  
quer diferença significativa nos plasmídios dos pares de amos-  
tras investigadas.

O estudo eletroforético dos plasmídios dos transconju-  
gantes 711 pPM11-Tc e 711 pPM12-Sm, provenientes de PM-49/69,

711 pPM12-Tc e 711 pPM12-Sm, oriundos de PM-50/69, 711 pPM13-Tc e 711 pPM14-Sm, procedentes de PM-51/69, demonstrou que invariavelmente tais amostras albergam um só plasmídio, em tudo semelhante ao das respectivas doadoras.

3.4.1.4 - Retransferência dos plasmídios dos transconjugantes de *Proteus mirabilis* isolados em 1969 para *Escherichia coli* J53 F<sup>-</sup>, por conjugação.

Os transconjugantes 711 pPM2abc-Tc, 711 pPM2abc-Su, 711 pPM2ab-Ap e 711 pPM2abc-Cm quando acasalados com uma amostra de *E. coli* J53 F<sup>-</sup> foram capazes de transferirem seus plasmídios para esta receptora. Por outro lado, os transconjugantes 711 pPM2a-Sm e 711 pPM2a-Km, ao contrário dos 4 primeiros, se mostraram incapazes de transferirem seus plasmídios para esta receptora. Finalmente, os transconjugantes 711 pPM11-Tc, 711 pPM12-Sm, 711 pPM12-Tc, 711 pPM12-Sm, 711 pPM13-Tc e 711 pPM13-Sm apresentaram em comum a capacidade de retransferência de seus plasmídios para a receptora em questão.

3.4.2 - Conjugações de *Proteus mirabilis* isolados em 1980 com *Escherichia coli* 711 F<sup>-</sup>.

Dentro do grupo de 8 amostras exibindo resistência a drogas (Tabela VII) e plasmídios (Figura III), apenas as amostras PM-04/80 e PM-06/80 foram capazes de transferirem seus plasmídios, quando acasaladas com *E. coli* 711 F<sup>-</sup>. As outras 6 amostras

tras, hospedando plasmídios não conjugativos, foram ainda acasa ladas por pelo menos duas vezes com *E. coli* J53 F<sup>-</sup> e C600 F<sup>-</sup>, sem que fosse contudo obtido qualquer transconjugante. A amostra PM-04/80 resistente a Su e Ap (Tabela VII) e portando 2 plasmídios (Figura III) permitiu a obtenção de transconjugantes em plcas seletoras com Su e Ap, em separado. Já da amostra PM-06/80, com resistência para as drogas Su, Ap, Cm e Km (Tabela VII) e hospedando 3 plasmídios (Figura III), foram isolados recombinantes selecionados em placas com qualquer das 4 drogas.

#### 3.4.2.1 - Teste em placa rêplica dos transconjugantes de *Proteus mirabilis* isolados em 1980.

Os recombinantes obtidos a partir do cruzamento entre PM-04/80 e PM-06/80 x *E. coli* 711 F<sup>-</sup>, quando examinados em plca rêplica exibiram de modo uniforme resistência frente a todas as drogas em que foram selecionados, independentemente de qual destas drogas foi empregada em cada uma das placas seletoras. Assim, cada um dos recombinantes do primeiro cruzamento apresentou resistência para Su e Ap, enquanto os do segundo resistência para Su, Ap, Cm e Km.

#### 3.4.2.2 - Frequência de transferência dos plasmídios de *Proteus mirabilis* isolados em 1980 para *Escherichia coli* 711 F<sup>-</sup>, por conjugação.

Os plasmídios conjugativos das amostras de *P. mirabilis* isoladas em 1980, pPM20a e pPM22a, apresentaram uma frequência

de transferência de respectivamente  $1,66 \times 10^{-6}$  e  $1,78 \times 10^{+7}$ . Estes valores estão inseridos na Tabela IX.

3.4.2.3 - Análise eletroforética e determinação dos pesos moleculares dos plasmídios dos recombinantes provenientes de *Proteus mirabilis* isolados em 1980.

A Figura VII diz respeito à eletroforese em gel de agarose dos plasmídios das amostras PM-04/80 e PM-06/80 e seus respectivos transconjugantes. Nela pode-se verificar que os recombinantes de ambas as amostras apresentam, diferentemente destas, apenas 1 plasmídio. Quanto aos transconjugantes de Pm-04/80, isto é, 711 pPM20a-Su e 711 pPM20a-Ap, verifica-se que o plasmídio do primeiro deles migra para a posição semelhante a do maior plasmídio de PM-04/80 (pPM20a), enquanto o segundo, selecionado em placa com ampicilina, migra para posição discretamente acima do mesmo plasmídio de PM-04/80. Com os recombinantes de PM-04/80 observa-se fato relativamente similar: os transconjugantes 711 pPM22a-Su, 711 pPM22a-Cm e 711 pPM22a-Km apresentam em comum um só plasmídio cuja banda em eletroforese se posiciona à mesma altura da banda correspondente ao maior plasmídio de PM-06/80 (pPM22a), enquanto o plasmídio do transconjugante selecionado em Ap migra para posição um pouco acima deste.

A posição assumida pelos plasmídios selecionados em placas com Ap, em ambos os casos acima descritos, reflete aumento de peso molecular. Os pesos moleculares de todos estes plasmídios encontram-se na Tabela XI.

3.4.2.4 - Retransferência dos plasmídios dos transconjugantes de *Proteus mirabilis* isolados em 1980 para *Escherichia coli* J53 F<sup>-</sup>, por conjugação.

Todos os transconjugantes oriundos de *P. mirabilis* isolados em 1980, isto é, 711 pPM20a-Su, 711 pPM20a-Ap, 711 pPM22a-Su, 711 pPM22a-Ap, 711 pPM22a-Cm e 711 pPM22a-Km, quando acasalados com uma amostra de *E. coli* J53 F<sup>-</sup> se mostraram capazes de transferirem seus respectivos plasmídios para esta receptora.

3.5 - Classificação do grupo de incompatibilidade dos plasmídios de PM-49/69, PM-50/69 e PM-51/69.

Os plasmídios das amostras acima, respectivamente pPM11, pPM12 e pPM13, com resultados semelhantes quando investigados sobre a sua capacidade de autotransferência, resistência a drogas antimicrobianas (Tabela VI) e pesos moleculares (Figura II e Tabela VIII), também são pertencentes ao mesmo grupo de incompatibilidade plasmidial. Os plasmídios destas 3 amostras, após transferidos para *E. coli* 711 F<sup>-</sup> e investigados frente às 28 amostras constantes da Tabela III, foram lotados dentro do grupo I gama de incompatibilidade, por não serem capazes de coexistirem com o plasmídio R621a, com marca de resistência para Tc. Na fase final dos experimentos de incompatibilidade foi demonstrado que os plasmídios originalmente provenientes de *P. mirabilis* foram desalojados pelo plasmídio R621a em respectivamente 70, 75 e 78% das colônias investigadas.

### 3.6 - Genótipo *Fin* $O$ *tra* $O$ dos plasmídios das amostras PM-49/69, PM-50/69 e PM-51/69.

Foram uniformemente altas as frequências de transferências dos plasmídios das amostras acima, quando hospedados por *E. coli* 711, a partir dos acasalamentos em separado dos pares de doadores 711 pPM12 e 711 pPM12p307, 711 pPM12 e 711 pPM12p307, 711 pPM13 e 711 pPM13p307 com *E. coli* C600  $F^-$ . Estes resultados permitem concluir que os plasmídios das 3 amostras de *P. mirabilis* acima são insensíveis aos repressores dos genes *tra* codificados pelo plasmídio p307, que tem genótipo *Fin*  $O^+$  *tra*  $O^-$  ( ). Tal insensibilidade determina ainda que os plasmídios pPM11, pPM12 e pPM13, de *P. mirabilis* sejam classificados como mutantes constitutivos para o repressor codificado por p307, sendo portanto denominados *tra*  $O^C$ . Em estudo semelhante, empregando o plasmídio R386, que tem genótipo do tipo *Fin*  $O^+$  *tra*  $O^C$ , os resultados acima descritos se repetiram, confirmando-os.

O estudo comparativo entre as frequências de transferências do plasmídio F'Lac, a partir dos acasalamentos em separado dos doadores 711 F'Lac, 711 F'Lac pPM11, 711 F'Lac pPM12 e 711 F'Lac pPM13 com *E. coli* C600  $F^-$ , demonstrou não haver qualquer diferença desta frequência, quer o plasmídio F'Lac esteja sozinho ou coexistindo com os plasmídios pPM11, pPM12 ou pPM13. Tais resultados indicam que os plasmídios provenientes das amostras de *P. mirabilis* não codificam para a síntese de qualquer repressor que atue sobre os genes *tra*  $O$  de F'Lac, sendo portanto do tipo *Fin*  $O^-$ . Assim podemos concluir que os plasmídios pPM11, e pPM12 e pPM13, originalmente encontrados nas amostras PM-49/69,

PM-50/69 e PM-51/69, têm genótipos do tipo  $F^{in} O^{-} tra O^C$ .

### 3.7 - Análise dos plasmídios de PM-49/69, PM-50/69 e PM-51/69 com nucleases de restrição

Visando complementar o estudo sobre a identidade dos plasmídios das amostras acima, tais elementos extracromossômicos, após transferidos para *E. coli* 711  $F^{-}$  e extraídos por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cesio-brometo de etídio, foram submetidos a clivagem pelas seguintes enzimas de restrição do tipo II: Hind III, Eco RI e Hae III. No mesmo experimento foi acrescentado DNA de fago lambda, posicionado nas canaletas das extremidades e clivado apenas com a enzima Hind III, servindo como controle do experimento. Como pode ser depreendido pela Figura VIII cada enzima utilizada clivou os 3 plasmídios em segmentos de pesos moleculares semelhantes, denotando grande homologia entre as suas seqüências nucleotídicas e por extensão de suas estruturas como um todo.

### 3.8 - Mobilização de plasmídios R não conjugativo por plasmídios Ent e F'Lac conjugativos

Os transconjugantes 711 pPm1-SM e 711 pPm1-Km, resultantes do acasalamento PM-06/69 x *E. coli* 711  $F^{-}$  respectivamente selecionadas em Sm e Km, albergam um plasmídio não conjugativo e

são resistentes a Te, Su, Ap, Cm, Sm e Km. Como tais amostras exibem em comum incapacidade para retransferir seus plasmídios, a amostra 711 pPM1-Sm foi acasalada com as amostras *E. coli* 711 EP2, *E. coli* 711 EP2, *E. coli* 711 EP9, *E. coli* 711 EP16 e *E. coli* F'Lac (Tabela II), visando-se a mobilização do plasmídio não conjugativo. A recepção final dos plasmídios em questão se deu em uma amostra de *E. coli* J53 F<sup>-</sup>, quando houve participação dos 3 primeiros e em *E. coli* C600 F<sup>-</sup> quando com F'Lac. Todos os plasmídios conjugativos acima citados mobilizaram, com frequência variável, o plasmídio R não conjugativo. O plasmídio EP 16 exibiu, aparentemente, a maior capacidade de mobilização.

Na conjugação tripla envolvendo o plasmídio EP2 foram selecionados transconjugantes em placas com Te, Ap, Cm, Km e naquela envolvendo o plasmídio EP9 foram obtidos transconjugantes em presença de Te, Su, Ap e Sm. Por outro lado, no acasalamento com participação dos plasmídios EP16 e F'Lac foram isolados transconjugantes em todas as 6 drogas relativas ao plasmídio R não conjugativo.

Após a obtenção destes dados, as amostras de *E. coli* 711 EP16 e *E. coli* J53 F<sup>-</sup> foram empregadas da mesma maneira (conjugação tripla) com as 12 amostras de *P. mirabilis* isoladas em 1969 e com as 6 isoladas em 1980, as quais eram portadoras de plasmídios R não conjugativos. Ao final, após repetidas tentativas, em nenhuma delas foi obtido qualquer transconjugante.

### 3.8.1 - Teste em placa réplica dos transconjugantes obtidos por conjugação tripla.

Os transconjugantes obtidos através das conjugações triplas descritas anteriormente, foram investigadas separadamente em placa réplica e, de acordo com o plasmídeo mobilizador empregado, foram obtidos 2 grupos de transconjugantes. No primeiro deles, envolvendo os plasmídios EP2 e EP9, verificou-se que as 100 colônias transconjugantes de cada uma destas amostras cresceram em presença de todas as 6 drogas, isto é, Te, Su, Ap, Sm e Km. A propósito, este resultado chamou atenção de que, certamente, a não obtenção de transconjugantes com a participação de EP2 e EP9, respectivamente nas placas seletoras com Su ou Sm e Cm ou Km, se deveu a falha na seleção; de fato, isto foi mais tarde confirmado em uma outra conjugação, da qual foram isoladas transconjugantes em placas seletoras com quaisquer das 6 drogas.

No segundo grupo de amostras, correspondente aos transconjugantes obtidos com a mobilização pelos plasmídios EP16 e F'Lac, os resultados foram diferentes: de cada conjunto de 100 colônias analisadas, número variável delas cresceu em presença de todas as 6 drogas, deixou de crescer em apenas uma de quaisquer das 6 drogas, ou ainda, deixou de crescer em duas a 5 das 6 drogas. Nos transconjugantes obtidos com a participação de EP16 houve com maior frequência a perda de apenas uma das marcas. Já naqueles isolados com a mobilização por F'Lac, cerca de 50% das colônias investigadas perderam duas ou três marcas de resistência. Portanto, a mobilização e ou coexistência de

F'Lac com o plasmídio R não conjugativo de 711 pPM2-Sm leva a uma maior instabilidade de suas marcas do que com o plasmídio EP16.

### 3.8.2 - Análise eletroforética dos plasmídios dos transconjugantes obtidos por conjugação tripla.

Os transconjugantes provenientes dos acasalamentos triplos envolvendo os plasmídios mobilizadores EP2, EP9, EP16 e F'Lac foram investigados por eletroforese em gel de agarose.

A Figura IV, do gel onde foram corridas as amostras 711 pPM2-Sm, 711 EP2, 711 EP9 e seus transconjugantes obtidos em *E. coli* J53 F<sup>-</sup>, demonstra que os 2 grupos de 4 transconjugantes apresentam em comum tanto o plasmídio R de 711 pPM2-Sm como os respectivos plasmídios Ent de 711 Ep2 e 711 Ep9.

A Figura X corresponde à eletroforese em gel de agarose das amostras 711 pPM2-Sm, 711 EP16 e seus transconjugantes. Para tanto foram tomadas colônias de transconjugantes selecionadas respectivamente em Te, Su, Ap, Cm, Sm e Km que, quanto estudadas em placa réplica, não haviam perdido qualquer das 6 marcas. Como pode ser verificado na mesma figura o transconjugante selecionado em Sm apresenta um só plasmídio, cuja banda migra para posição semelhante à do plasmídio EP16. Com relação a esta amostra, vale salientar que uma verificação posterior sobre as suas marcas de resistência demonstrou que tal transconjugante perdera as marcas de Tc e Ap quando do crescimento do caldo para análise eletroforética. Por outro lado, os demais transconjugantes, selecionados com as outras 5 drogas, apresentam 2

plasmídios cujas bandas migram para as respectivas posições dos plasmídios de 711 pPM2-Sm e 711 EP16.

Diante destes resultados foi feito um novo estudo eletroforético, com maior número de amostras, no qual foram incluídos 711 EP16, 711 pPM1-Sm, J53 F<sup>-</sup> e 9 transconjugantes. Embora tais transconjugantes tenham sido tomados a partir de placa com Mac Conkey sem droga, já haviam demonstrado previamente em placa rēplica resistēncia para Tc, Su, Ap, Cm, Sm e Km ao mesmo tempo. Dentre os 9 transconjugantes 1 foi selecionado em Su, 1 em Ap, 1 em Km, 2 em Cm, 2 em Te e 2 em Sm. A Figura XI corresponde à foto do gel onde tais amostras foram corridas. Nela vê-se que 2 dos transconjugantes apresentam um sō plasmídio, enquanto os demais têm 2 plasmídios. Ao mesmo tempo em que estas amostras foram submetidas a eletroforese, foi também realizado um estudo em placa rēplica, o qual demonstrou que os transconjugantes com um sō plasmídio haviam perdido as marcas de Tc e Ap. Após esta reprodução do dado anterior, visando esclarecer com a perda de qual das marcas estava associada a perdas de uma das bandas plasmídicas, foi executado um terceiro estudo eletroforético com as seguintes amostras: 711 pPM1-Sm, 711 EP16, 2 transconjugantes com 5 marcas de resistēncia e sem a de Km, 2 com 5 marcas e sem a de Cm, 2 com 5 marcas e sem a de Ap, 2 com 5 marcas e sem a de Tc e os 2 últimos com 4 marcas e sem as de Tc e Ap. Os resultados obtidos constam da Figura XII, a qual demonstra que os transconjugantes que perderam quaisquer das marcas, exceptuando-se Ap, mantêm os 2 plasmídios, enquanto aqueles que perderam a marca de Ap perderam um plasmídio. Estudos repetidos confirmaram que a perda da marca de Ap está sempre associa-

da com a ausência do plasmídio de menor peso molecular, que por sua vez corresponde ao plasmídio R não conjugativo de 711 pPM-Sm.

Experimento similar foi conduzido com transconjugantes obtidos pela mobilização com F'Lac, cujos resultados estão na Figura XIII. Para tanto foram empregadas as amostras 711 pPM1-Sm, 711 F'Lac e 8 de seus transconjugantes constituídos em *E. coli* C600 F<sup>-</sup> com seleção em placas contendo meio mínimo, Te e lactose como única fonte de carbono. Os transconjugantes tinham as seguintes características: a) resistente apenas a Te; b) resistente a Te e Su; c) resistente a Te e Sm; d) resistente a Te, Cm e Sm; e) resistente a Te, Cm e Km; f) resistente a Te, Su, Ap e Km; g) resistente a Te, Su, Cm, Sm e Km; h) resistente a Te, Su, Ap, Cm, Sm e Km. Voltando a Figura XIII verifica-se que as duas amostras que têm 2 plasmídios correspondem exatamente aos 2 transconjugantes que mantêm entre outras marcas a de Ap. Os demais, sem a marca de Ap albergam apenas 1 plasmídio que migra para a mesma posição de F'Lac.

3.8.3 - Sensibilidade das amostras *E. coli* 711 pPM2a-Sm, *E. coli* 711 EP1b, *E. coli* 711 F'Lac e seus recombinantes, obtidos por conjugação tripla, aos fagos R17 e ØII.

As amostras 711 EP16 e 711 F'Lac, portadoras de plasmídios mobilizadores, a amostra 711 pPM2a-Sm e seus respectivos transconjugantes, obtidos por conjugações triplas, foram investigados quanto a sua sensibilidade aos fagos R17 e ØII.

No primeiro caso, correspondente ao conjunto de amostras 711 pPM2a-Sm, 711 EP16, seus transconjugantes (Figura XII) e amostras controle (*E. coli* CA77 sensível a R17 e resistente a  $\emptyset$ II, *E. coli* 711 F<sup>-</sup> resistente a R17 e sensível a  $\emptyset$ II), foram obtidos os seguintes resultados: a amostra 711 pPM2a-Sm mostrou-se resistente ao fago R17 e sensível a  $\emptyset$ II, a amostra 711 EP16 resistente a ambos os fagos e todos os transconjugantes resistentes a R17 e sensíveis a  $\emptyset$ II. Portanto, os recombinantes apresentaram comportamento semelhante a 711 pPM2a-Sm. As amostras controle confirmaram os resultados esperados. Estes dados constituem a Tabela XII.

No segundo caso, correspondente ao conjunto de amostras 711 pPM2a-Sm, 711 F'Lac, seus recombinantes (Figura XIII) e amostras controle (CA77 e 711 F<sup>-</sup>), foram obtidos os seguintes dados: a amostra 711 pPM2a-Sm confirmou o dado anterior exibindo resistência a R17 e sensibilidade a  $\emptyset$ II, 711 F'Lac mostrou sensibilidade a R17 e resistência a  $\emptyset$ II e todos os transconjugantes sensíveis a R17 e resistentes a  $\emptyset$ II. Assim, os transconjugantes tiveram comportamento similar ao de 711 F'Lac. As amostras controle deram os resultados esperados. Os dados acima descritos se encontram na Tabela XIII.

#### 3.8.4 - Produção de enterotoxina LT por transconjugantes obtidos por conjugação tripla.

Recombinantes obtidos em conjugações triplas, pela mobilização do plasmídeo R de 711 pPM2a-Sm com o plasmídeo de 711 EP16 (pTML6), foram investigados quanto a sua capacidade para

produzir a toxina LT. Assim, as amostras empregadas na eletroforese correspondente à Figura XII, apresentaram os seguintes resultados, quanto a produção de toxina: 711 pPM2a-Sm e os 4 recombinantes que apresentam 1 só plasmídeo não produzem a enterotoxina Lt, enquanto as amostras 711 EP16 e os 6 transconjugantes que apresentam os 2 plasmídios produzem a toxina em questão. Estes resultados estão na Tabela XIV.

3.8.5 - Retransferência dos plasmídios dos transconjugantes obtidos por conjugação tripla para *Escherichia coli* C600 F<sup>-</sup> ou J53 F<sup>-</sup>, por conjugação.

Todos os transconjugantes obtidos em conjugações triplas, quando acasalados com uma amostra de *E. coli* C600 F<sup>-</sup> ou J53 F<sup>-</sup> mostraram habilidade para retransferir seus respectivos plasmídios. Foram selecionados transconjugantes em placas com quaisquer das drogas para as quais a amostra doadora em questão exibiu resistência.

3.8.5.1 - Retransferência de plasmídeo de transconjugantes obtidos por conjugação tripla e defectivos para as marcas de Ap e Te, para *Escherichia coli* C600 F<sup>-</sup>, por conjugação.

Como já demonstrado, a mobilização do plasmídeo R não conjugativo de 711 pPM2a-Sm pelos plasmídios EP16 ou F'Lac, leva ao aparecimento de transconjugantes com perda de uma ou mais

marcas de resistência, e a perda da marca de Ap determina sempre o desaparecimento concomitante da banda correspondente ao elemento extracromossômico R. Devido a isso transconjugantes conseguidos com a mobilização pelo plasmídeo EP16, em *E. coli* J53, defectivos para as marcas de Ap e Te foram estudados com mais detalhe. Para tanto 2 destes transconjugantes, encontrados na Figura XI (canaletas G e J), foram transferidos por conjugação para a amostra de *E. coli* C600 F<sup>-</sup>. A seleção de transconjugantes se fez em placas com Su, Cm, Sm e Km e também Ap e Te. De ambas as conjugações foram selecionados transconjugantes em placas seletoras com quaisquer das 4 primeiras drogas. Como esperado, não foram obtidos transconjugantes em placas com Ap ou Te. Quando 100 colônias de cada conjugação foram estudadas em placa réplica, verificou-se que aquelas selecionadas em placas com Su, Cm ou Sm cresciam indistintamente em quaisquer das 4 drogas em questão (Su, Cm, Sm, Km). Por outro lado, cerca de 10% daquelas colônias selecionadas em placa com Km só cresciam em placa com Km e o restante se comportava como as selecionadas nas outras 3 drogas, crescendo indistintamente na presença de quaisquer delas (Su, Cm, Sm, Km).

#### 3.8.5.2 - Análise eletroforética dos transconjugantes obtidos por conjugação tripla e defectivos para as marcas de Ap e Te.

A Figura XIV corresponde a eletroforese onde foram corridas as seguintes amostras: 711 EP16, 711 pPM2a-Sm, os dois transconjugantes obtidos em conjugação tripla e defectivos para

as marcas de Ap e Te, e 5 transconjugantes provenientes de cada um destes, constituídos em *E. coli* C600, os quais foram selecionados respectivamente em placa com Su, Cm, Sm e Km. O quinto transconjugante de cada grupo correspondia a uma amostra selecionada em Km e que só crescia nesta droga. Na mesma figura observa-se que os 8 transconjugantes selecionados em placa com Su, Cm, Sm ou Km e resistentes a todas elas ao mesmo tempo têm apenas um plasmídio, cuja banda apresenta migração eletroforética semelhante a dos plasmídios das amostras que os originaram. Em um destes transconjugantes (canaleta 3 da Figura XIV) aparece uma segunda banda, acima do primeiro plasmídio, denotando maior peso molecular. Nos 2 transconjugantes selecionados em Km e resistentes apenas a esta droga, foi encontrado um só plasmídio; suas bandas migram para a mesma posição do segundo plasmídio da amostra da canaleta D, denotando maior peso molecular. Por outro lado, não foi encontrado nestas duas amostras a banda comum a todos os demais transconjugantes.

#### 3.8.5.3 - Produção de enterotoxina LT pelos transconjugantes obtidos em conjugação tripla, defectivos para as marcas de Ap e Te, e pelos seus transconjugantes.

As amostras empregadas na análise eletroforética correspondente à Figura XIII foram estudadas quanto a produção da enterotoxina LT. Foi demonstrado que apenas a amostra 711 EP16 produziu a toxina. A amostra 711 pPm1-Sm e os 12 transconjugantes, comprovando dados experimentais anteriores, não produziram

a enterotoxina LT.

3.8.5.4 - Estudo com nucleases de restrição dos plasmídios pPM2a-Sm, EP16 e de um plasmídio defectivo para as marcas de Ap e Te.

A mobilização do plasmídio pPM2a-Sm por EP16 leva ao aparecimento de um terceiro tipo de plasmídio (em *E. coli* J53), híbrido que é conjugativo e tem 4 marcas de resistência (Su, Cm, Sm e Km). Visando estabelecer este dado em bases físico-químicas, cada um destes 3 elementos extracromossômicos foi clivado com as enzimas de restrição Hind III, Eco RI e Pst I. No mesmo experimento foi incluído DNA do fago lâmbda, o qual foi submetido a tratamento enzimático apenas com Hind III. Os materiais assim tratados foram submetidos a eletroforese e o resultado consta da Figura XIV. Verifica-se aí que o plasmídio híbrido apresenta bandas correspondentes a fragmentos de DNA plasmidial que coincidem com bandas de pPM2a-Sm ou de EP16. Este achado comprova o caráter híbrido do plasmídio defectivo para as marcas e Ap e Te.

TABELA VI. Nível e modelo de resistência a drogas antimicrobianas das amostras de *Proteus mirabilis* isolados em 1969.

<i>Proteus mirabilis</i>	Nível de resistência a drogas ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	Tc	Su	Ap	Cm	Sm	Km
PM - 02/69	-	-	-	-	1.000	-
PM - 04/69	50	1.000	1.000	200	50	1.000
PM - 06/69	50	1.000	20	200	20	500
PM - 08/69	50	1.000	1.000	200	50	1.000
PM - 10/69	50	1.000	500	200	50	100
PM - 11/69	50	1.000	1.000	200	50	1.000
PM - 23/69	-	-	-	-	100	-
PM - 25/69	20	1.000	-	20	100	-
PM - 26/69	50	1.000	500	200	100	1.000
PM - 35/69	-	-	-	-	50	-
PM - 43/69	50	-	-	-	-	-
PM - 47/69	50	-	-	-	-	-
PM - 48/69	-	-	-	50	-	-
PM - 49/69	50	-	-	-	100	-
PM - 50/69	50	-	-	-	100	-
PM - 51/69	50	-	-	-	100	-
PM - 55/69	50	1.000	1.000	200	50	1.000
PM - 56/69	50	1.000	50	200	200	500
PM - 57/69	50	1.000	20	100	20	500
PM - 58/69	-	-	-	-	50	-

TABELA VII. Nível e modelo de resistência a drogas antimicrobianas das amostras de *Proteus mirabilis* isolados em 1980.

<i>Proteus mirabilis</i>	Nível de resistência a drogas ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	Tc	Su	Ap	Cm	Sm	Km
PM - 01/80	50	1.000	500	200	50	200
PM - 02/80	100	1.000	1.000	100	100	-
PM - 03/80	100	1.000	200	200	100	100
PM - 04/80	-	500	200	-	-	-
PM - 05/80	50	-	500	-	-	-
PM - 06/80	-	1.000	1.000	100	-	500
PM - 07/80	50	1.000	1.000	100	50	200
PM - 08/80	100	500	500	200	50	100
PM - 14/80	-	-	-	-	50	-
PM - 39/80	-	-	-	-	50	-
PM - 53/80	-	-	-	-	200	-
PM - 60/80	-	-	-	-	100	-

TABELA VIII. Características dos plasmídios das amostras de *Proteus mirabilis* isolados em 1969.

<i>Proteus mirabilis</i>	Características dos plasmídios		
	Designação	Peso (dáltons) molecular	Frequência de transferência
PM-04/69	pPM1	$46 \times 10^6$	Zero
PM-06/69	pPM2a	$56 \times 10^6$	$1,86 \times 10^7$
PM-06/69	pPM2b	$26 \times 10^6$	$1,24 \times 10^7$
PM-08/69	pPM3	$46 \times 10^6$	Zero
PM-10/69	pPM4	$40 \times 10^6$	"
PM-11-69	pPM5	$46 \times 10^6$	"
PM-25/69	pPM6	$38 \times 10^6$	"
PM-26/69	pPM7	$40 \times 10^6$	"
PM-43/69	pPM8	$25 \times 10^6$	"
PM-47/69	pPM9	$28 \times 10^6$	"
PM-48/69	pPM10	$34 \times 10^6$	"
PM-49/69	pPM11	$36 \times 10^6$	$7,40 \times 10^{-7}$
PM-50/69	pPM12	$36 \times 10^6$	$6,05 \times 10^{-7}$
PM-51/69	pPM13	$36 \times 10^6$	$7,33 \times 10^{-7}$
PM-55/69	pPM14	$48 \times 10^6$	Zero
PM-56/69	pPM15a	$48 \times 10^6$	"
PM-56/69	pPM15b	$48 \times 10^6$	"
PM-57/69	pPM16	$48 \times 10^6$	"

TABELA IX. Características dos plasmídios das amostras de *Proteus mirabilis* isolados em 1980.

<i>Proteus mirabilis</i>	Características dos plasmídios		
	Designação	Peso molecular (daltons)	Frequência de transferência
PM-01/80	pPM17	$20 \times 10^6$	Zero
PM-02/80	pPM18a	$29 \times 10^6$	"
PM-02/80	pPM18b	$20 \times 10^6$	"
PM-03/80	pPM19a	$29 \times 10^6$	"
PM-03/80	pPM19b	$23 \times 10^6$	"
PM-04/80	pPM20a	$90 \times 10^6$	$1,66 \times 10^{-6}$
PM-04/80	pPM20b	$48 \times 10^6$	Zero
PM-05/80	pPM21	$23 \times 10^6$	"
PM-06/80	pPM22a	$90 \times 10^6$	$1,08 \times 10^{-6}$
PM-06/80	pPM22b	$48 \times 10^6$	Zero
PM-06/80	pPM22e	$25 \times 10^6$	"
PM-07/80	pPM23	$23 \times 10^6$	"
PM-08/80	pPM24	$29 \times 10^6$	"

TABELA X. Pesos moleculares dos plasmídios de PM-06/69 e de seus recombinantes selecionados em diferentes drogas, segundo dados da Figura V.

Amostra	Plasmídio	Peso molecular
PM-06/69	pPM2a	56 x 10 <sup>6</sup>
PM-06/69	pPM2b	34 x 10 <sup>6</sup>
PM-06/69	pPM2c	23 x 10 <sup>6</sup>
<i>E. coli</i> 711 pPM2abc-Tc	pPM2a-Tc	85 x 10 <sup>6</sup>
<i>E. coli</i> 711 pPM2abc-Tc	pPM2b-Tc	56 x 10 <sup>6</sup>
<i>E. coli</i> 711 pPM2abc-Tc	pPM2c-Tc	23 x 10 <sup>6</sup>
<i>E. coli</i> 711 pPM2abc-Su	pPM2a-Su	85 x 10 <sup>6</sup>
<i>E. coli</i> 711 pPM2abc-Su	pPM2b-Su	56 x 10 <sup>6</sup>
<i>E. coli</i> 711 pPM2abc-Su	pPM2c-Su	34 x 10 <sup>6</sup>
<i>E. coli</i> 711 pPM2ab-Ap	pPM2a-Ap	56 x 10 <sup>6</sup>
<i>E. coli</i> 711 pPM2ab-Ap	pPM2b-Ap	34 x 10 <sup>6</sup>
<i>E. coli</i> 711 pPM2abc-Cm	pPM2a-Cm	85 x 10 <sup>6</sup>
<i>E. coli</i> 711 pPM2abc-Cm	pPM2b-Cm	56 x 10 <sup>6</sup>
<i>E. coli</i> 711 pPM2abc-Cm	pPM2c-Cm	34 x 10 <sup>6</sup>
<i>E. coli</i> 711 pPM2a-Sm	pPM2a-Sm	56 x 10 <sup>6</sup>
<i>E. coli</i> 711 pPM2a-Km	pPM2a-Km	56 x 10 <sup>6</sup>

TABELA XI. Pesos moleculares dos plasmídios de PM-04/80 e PM-06/80 e de seus respectivos transconjugantes, selecionados em diferentes drogas, conforme dados da Figura VII.

Amostra	Plasmídio	Peso molecular
PM-04/80	pPM20a	$90 \times 10^6$
PM-04/80	pPM20b	$48 \times 10^6$
<i>E. coli</i> 711 pPM20a-Su	pPM20a-Su	$90 \times 10^6$
<i>E. coli</i> 711 pPM20a-Ap	pPM20a-Ap	$110 \times 10^6$
PM-06/80	pPM22a	$90 \times 10^6$
PM-06/80	pPM22b	$48 \times 10^6$
PM-06/80	pPM22c	$25 \times 10^6$
<i>E. coli</i> 711 pPM22a-Su	pPM22a-Su	$90 \times 10^6$
<i>E. coli</i> 711 pPM22a-Ap	pPM22a-Ap	$110 \times 10^6$
<i>E. coli</i> 711 pPM22a-Cm	pPM22a-Cm	$90 \times 10^6$
<i>E. coli</i> 711 pPM22a-Km	pPM22a-Km	$90 \times 10^6$

TABELA XII. Comportamento das amostras de *E. coli* 711 pPM2a-Sm, *E. coli* EP16, seus respectivos transconjugantes (Figura XII) e amostras controle, frente aos fagos R17 e ØII.

Amostras	Marcas perdidas	Comportamento frente aos fagos	
		R17	ØII
<i>E. coli</i> 711 pPM2a-Sm	-	R	S
<i>E. coli</i> 711 Ep16	-	R	R
<i>E. coli</i> J53	Km	R	S
<i>E. coli</i> J53	Km	R	S
<i>E. coli</i> J53	Cm	R	S
<i>E. coli</i> J53	Cm	R	S
<i>E. coli</i> J53	Ap	R	S
<i>E. coli</i> J53	Ap	R	S
<i>E. coli</i> J53	Tc	R	S
<i>E. coli</i> J53	Tc	R	S
<i>E. coli</i> J53	Ap e Tc	R	S
<i>E. coli</i> J53	Ap e Tc	R	S
<i>E. coli</i> CA77	-	S	R
<i>E. coli</i> 711 F <sup>-</sup>	-	R	S

- sem perda de marcas genéticas

R resistente à infecção pelo fago

S sensível à infecção pelo fago

TABELA XIII. Comportamento das amostras de *E. coli* 711 pPM2a-Sm, *E. coli* 711 F'Lac, seus transconjugantes (Figura XIII) e amostras controle, frente aos fagos R17 e ØII.

Amostras	Marcas perdidas	Comportamento frente aos fagos	
		R17	ØII
<i>E. coli</i> 711 pPM2a-Sm	-	R	S
<i>E. coli</i> 711 F'Lac	-	S	R
<i>E. coli</i> C600	Su, Ap, Cm, Sm, Km	S	R
<i>E. coli</i> C600	Ap, Cm, Sm, Km	S	R
<i>E. coli</i> C600	Su, Ap, Cm, Km	S	R
<i>E. coli</i> C600	Su, Ap, Km	S	R
<i>E. coli</i> C600	Su, Ap, Sm	S	R
<i>E. coli</i> C600	Cm, Sm	S	R
<i>E. coli</i> C600	Ap	S	R
<i>E. coli</i> C600	-	S	R
<i>E. coli</i> CA77	-	S	R
<i>E. coli</i> 711 F <sup>-</sup>	-	R	S

- sem perda de marcas genéticas

R resistente à infecção pelo fago

S sensível à infecção pelo fago

TABELA XIV. Produção de enterotoxina LT pelas amostras de *E. coli* 711 pPM2a-Sm, *E. coli* 711 EP16 e seus recombinantes (Figura XII) obtidos por conjugações triplas.

Amostras	Nº de plasmídios	Produção de LT
<i>E. coli</i> 711 pPM2a-Sm	1	-
<i>E. coli</i> 711 EP16	1	+
<i>E. coli</i> J53 (Km <sup>-</sup> )	2	+
<i>E. coli</i> J53 (Km <sup>-</sup> )	2	+
<i>E. coli</i> J53 (Cm <sup>-</sup> )	2	+
<i>E. coli</i> J53 (Cm <sup>-</sup> )	2	+
<i>E. coli</i> J53 (Ap <sup>-</sup> )	1	-
<i>E. coli</i> J53 (Ap <sup>-</sup> )	1	-
<i>E. coli</i> J53 (Tc <sup>-</sup> )	2	+
<i>E. coli</i> J53 (Tc <sup>-</sup> )	2	+
<i>E. coli</i> J53 (Ap <sup>-</sup> , Tc <sup>-</sup> )	1	-
<i>E. coli</i> J53 (Ap <sup>-</sup> , Tc <sup>-</sup> )	1	-

- não produtor de toxina LT

+ produtor de toxina LT

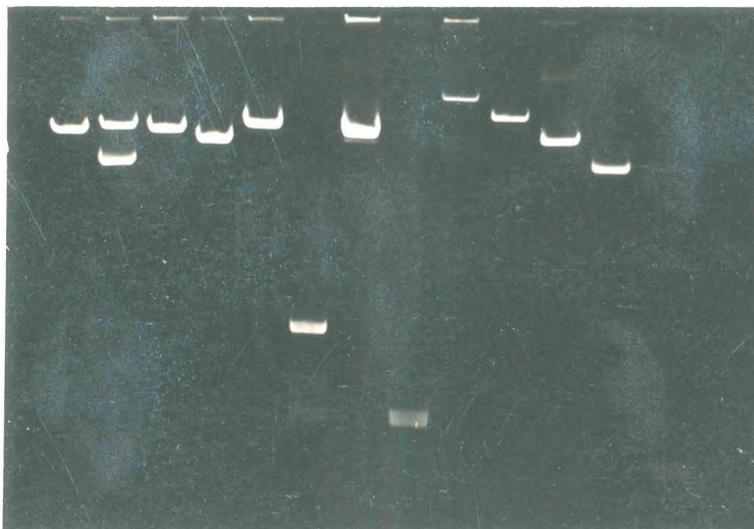


FIGURA I. Eletroforese em gel de agarose dos plasmídios de 8 amostras de *Proteus mirabilis* isoladas em 1969 e plasmídios com peso molecular referência.

Canaleta	Amostra	Plasmídio
A	PM-04/69	pPM1
B	PM-06/69	pPM2a e pPM2b
C	PM-08/69	pPM3
D	PM-10/69	pPM4
E	PM-11/69	pPM5
F	PM-25/69	pPM6
G	PM-26/69	pPM7
H	PM-43/69	pPM8
I	<i>E. coli</i> J53	pR27
J	<i>E. coli</i> 711	p307
K	<i>E. coli</i> J53	pRP4
L	<i>E. coli</i> J53	pS-a
M	<i>E. coli</i> HB101	pBR322

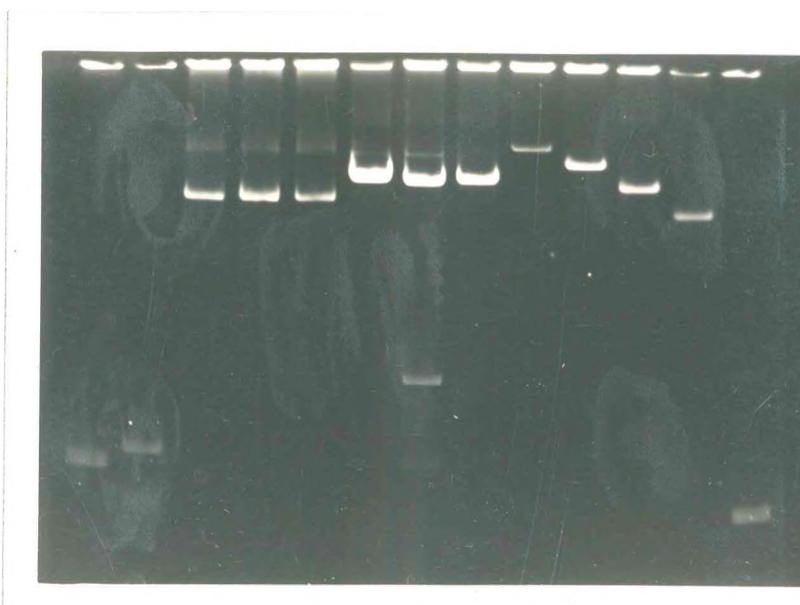


FIGURA II. Eletroforese em gel de agarose dos plasmídios de 8 a 13 amostras de *Proteus mirabilis* isoladas em 1969 e plasmídios com peso molecular referência.

Canaleta	Amostra	Plasmídio
A	PM-47/69	pPM9
B	PM-48/69	pPM10
C	PM-49/69	pPM11
D	PM-50/69	pPM12
E	PM-51/69	pPM13
F	PM-55/69	pPM14
G	PM-56/69	pPM15a e pPM15b
H	PM-57/69	pPM16
I	<i>E. coli</i> J53	pR27
J	<i>E. coli</i> 711	p307
K	<i>E. coli</i> J53	pRP4
L	<i>E. coli</i> J53	pS-a
M	<i>E. coli</i> Hb101	pPBR322

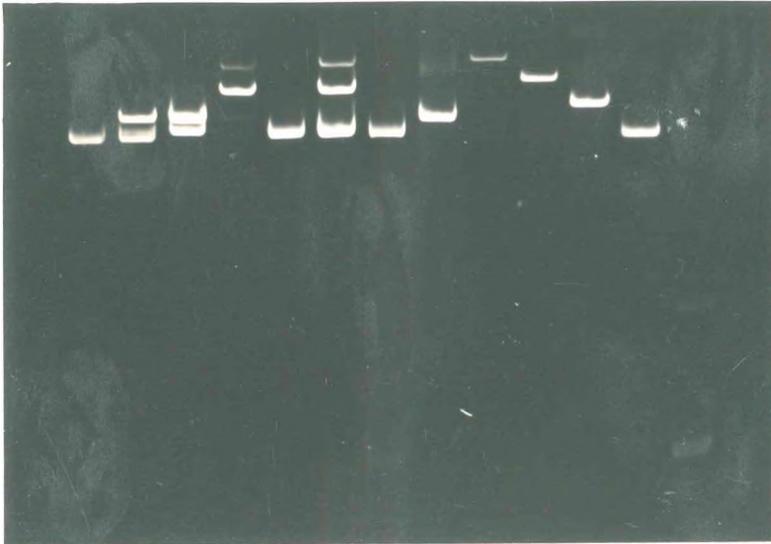


FIGURA III. Eletroforese em gel de agarose dos plasmídios das 8 amostras de *Proteus mirabilis* isoladas em 1980 e plasmídios com peso molecular referência.

Canaleta	Amostra	Plasmídio
A	PM-01/80	pPM17
B	PM-02/80	pPM18a e pPM18b
C	PM-03/69	pPM19a e pPM19b
D	PM-04/69	pPM20a e pPM20b
E	PM-05/69	pPM21
F	PM-06/69	pPM22a, pPM22b e pPM22c
G	PM-07/69	pPM23
H	PM-08/69	pPM24
I	<i>E. coli</i> J53	pR27
J	<i>E. coli</i> 711	p307
K	<i>E. coli</i> J53	pRP4
L	<i>E. coli</i> J53	pS-a

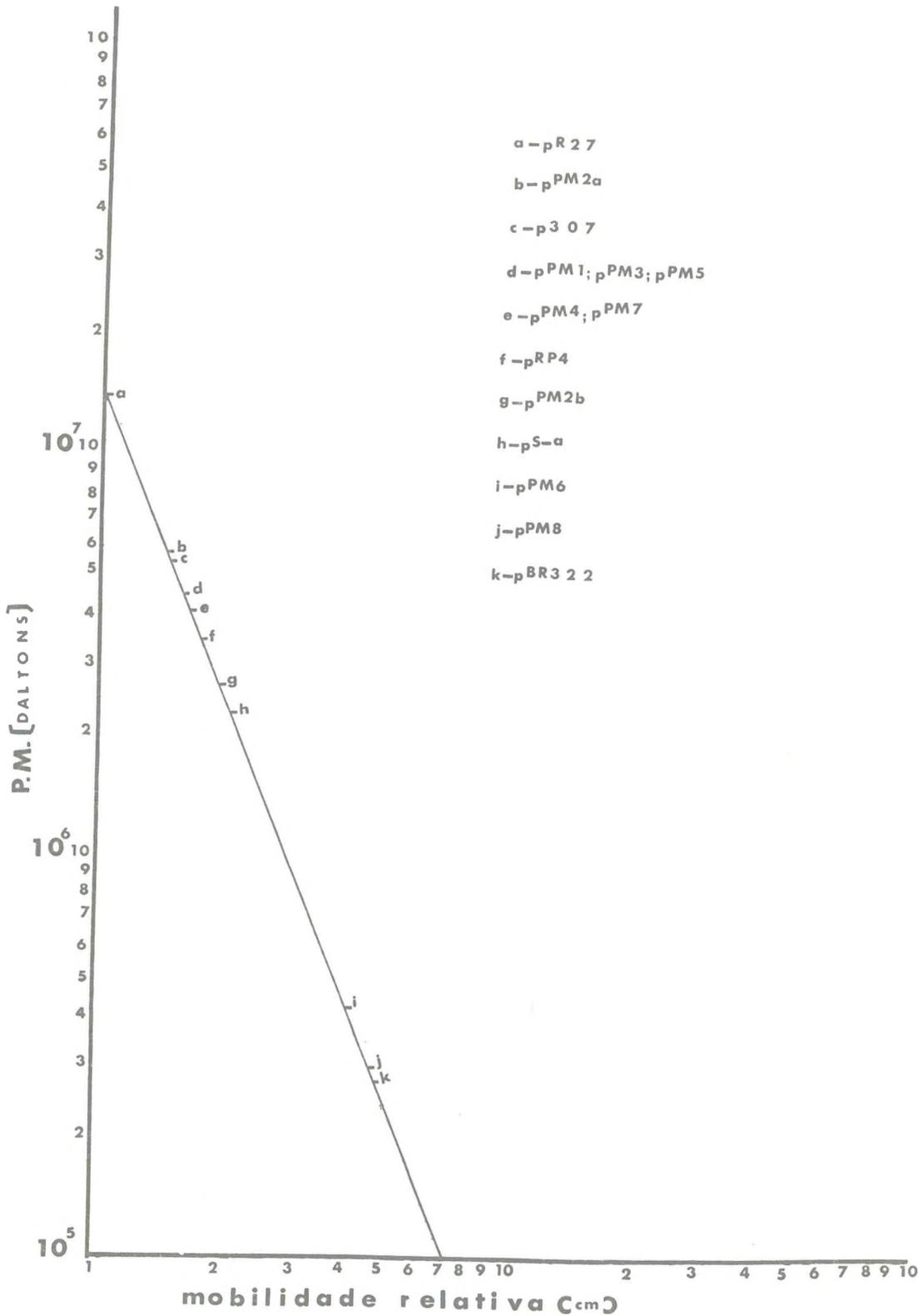


FIGURA IV. Curva em papel log x log, obtida com base em plasmídios com peso molecular referência. Através dela, ilustrativamente, foram calculados os pesos moleculares aproximados dos plasmídios de 8 amostras de *P. mirabilis* isolados em 1969, constantes da Figura I (100).

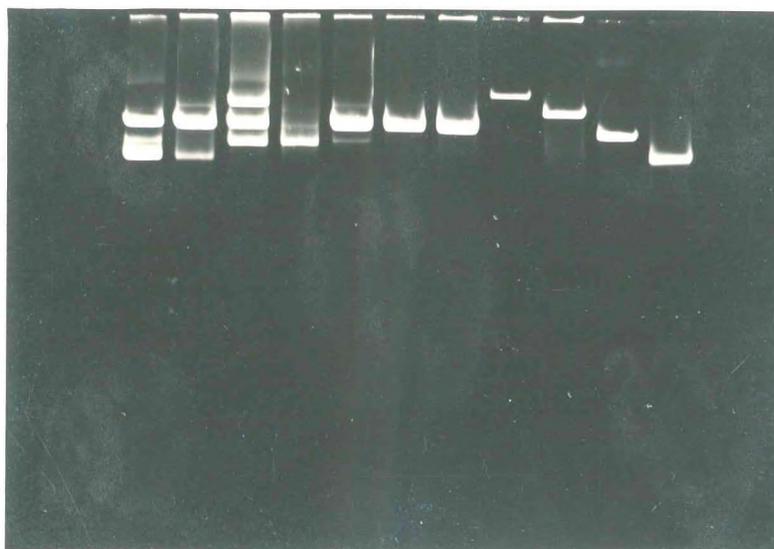


FIGURA V. Eletroforese em gel de agarose dos plasmídios da amostra PM-06/69, de seus transconjugantes e de plasmídios com peso molecular referência.

Canaleta	Amostras	Plasmídios
A	PM-06/69	pPM2a, pPM2b e pPM2c
B	<i>E. coli</i> 711 pPMabc-Tc	pPM2a-Tc, pPM2b-Tc e pPM2c-Tc
C	<i>E. coli</i> 711 pPMabc-Su	pPM2a-Su, pPM2b-Su e pPM2c-Su
D	<i>E. coli</i> 711 pPMab-Ap	pPM2a-Ap e pPM2b-Ap
E	<i>E. coli</i> 711 pPMabc-Cm	pPM2a-Cm, pPM2b-Cm e pPM2c-Cm
F	<i>E. coli</i> 711 pPMa-Sm	pPM2a-Sm
G	<i>E. coli</i> 711 pPMa-Km	pPM2a-Km
H	<i>E. coli</i> J53 R27	pR27
I	<i>E. coli</i> 711 P307	p307
J	<i>E. coli</i> J53 RP4	pRP4
K	<i>E. coli</i> J53 S-a	pS-a

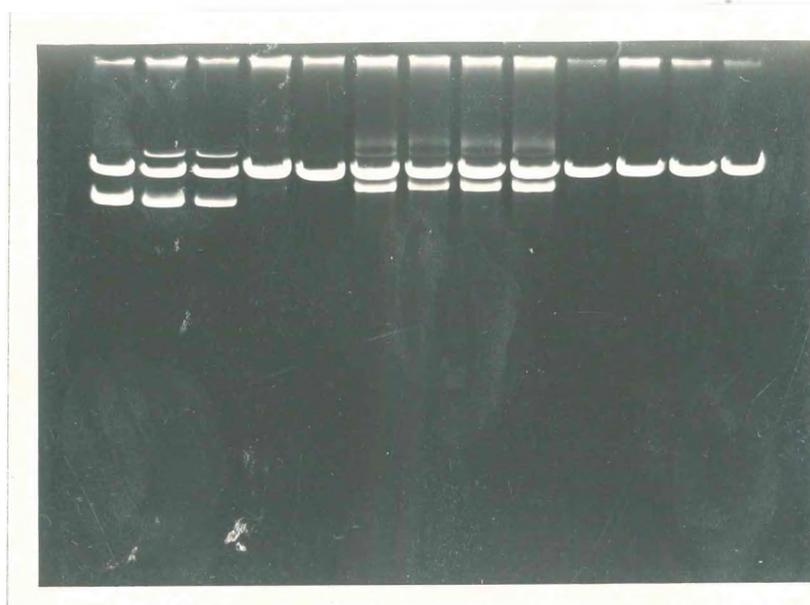


FIGURA VI. Eletroforese em gel de agarose dos plasmídios de PM-06/69 e dos plasmídios dos seus transconjugantes cultivados com e sem droga antimicrobiana.

Canaleta	Amostras	Droga	Nº de plasmídios
A	PM-06/69	-	2
B	<i>E. coli</i> 711 pPM2abc-Tc	Tc	3
C	<i>E. coli</i> 711 pPM2abc-Tc	-	3
D	<i>E. coli</i> 711 pPM2a-Su	Su	1
E	<i>E. coli</i> 711 pPM2a-Su	-	1
F	<i>E. coli</i> 711 pPM2ab-Ap	Ap	2
G	<i>E. coli</i> 711 pPM2ab-Ap	-	2
H	<i>E. coli</i> 711 pPM2ab-Cm	Cm	2
I	<i>E. coli</i> 711 pPM2ab-Cm	-	2
J	<i>E. coli</i> 711 pPM2a-Sm	Sm	1
K	<i>E. coli</i> 711 pPM2a-Sm	-	1
L	<i>E. coli</i> 711 pPM2a-Km	Km	1
M	<i>E. coli</i> 711 pPM2a-Km	-	1

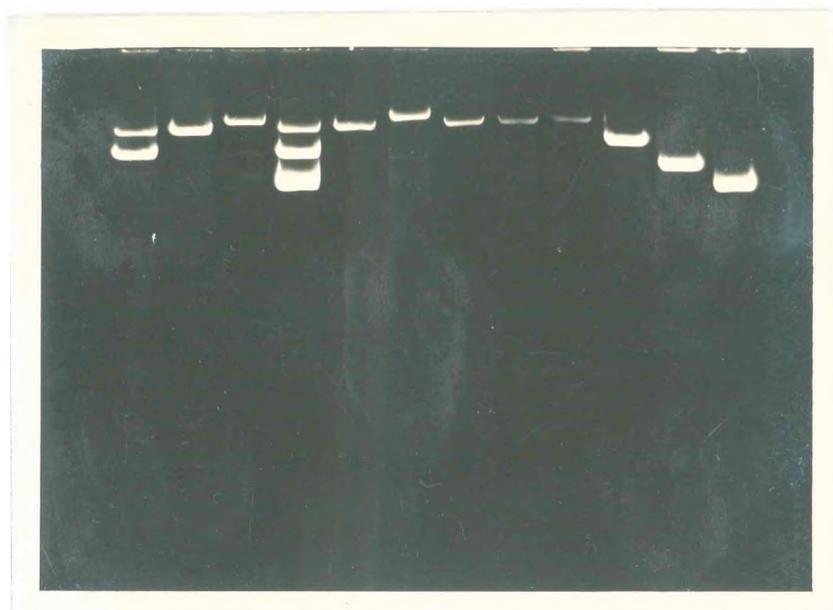


FIGURA VII. Eletroforese em gel de agarose dos plasmídios das amostras PM-04/80 e PM-06/80 e de seus transconjugantes, selecionados em diferentes drogas, bem como de plasmídios com peso molecular referência.

Canaleta	Amostras	Plasmídios
A	PM-04/80	PPM20a e pPM20b
B	<i>E. coli</i> 711 pPM20a-Su	pPM20a-Su
C	<i>E. coli</i> 711 pPM20a-Ap	pPM20a-Ap
D	PM-06/80	pPM22a, pPM22b e pPM22c
E	<i>E. coli</i> 711 pPM22a-Su	pPM22a-Su
F	<i>E. coli</i> 711 pPM22a-Ap	pPM22a-Sm
G	<i>E. coli</i> 711 pPM22a-Cm	pPM22a-Cm
H	<i>E. coli</i> 711 pPM22a-Km	pPM22a-Km
I	<i>E. coli</i> J53 R27	pR 27
J	<i>E. coli</i> 711 p207	p307
K	<i>E. coli</i> J53 RP4	pRP4
L	<i>E. coli</i> J53 S-a	pS-a

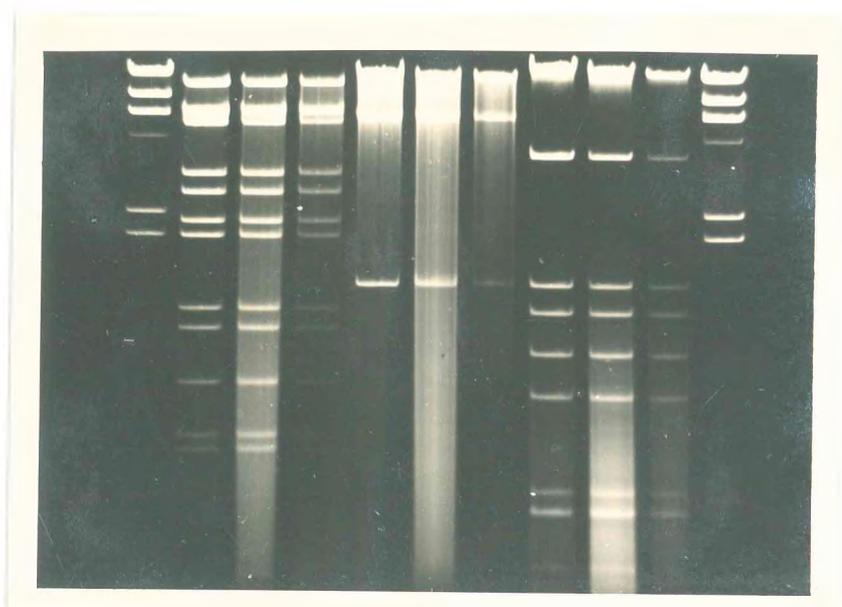


FIGURA VIII. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de clivagem dos plasmídios pPM11, pPM12 e pPM13 com as enzimas Hind III, Eco RI e Hae III. Nas canaletas das extremidades foi empregado DNA do fago lâmbda, em ambos os casos tratados só com a enzima Hind III.

Canaleta	DNA	Enzima
A	lâmbda	Hind III
B	pPM11	Hind III
C	pPM12	Hind III
D	pPM13	Hind III
E	pPM11	Eco RI
F	pPM12	Eco RI
G	pPM13	Eco RI
H	pPM11	Hae III
I	pPM12	Hae III
J	pPM13	Hae III
K	lâmbda	Hind III

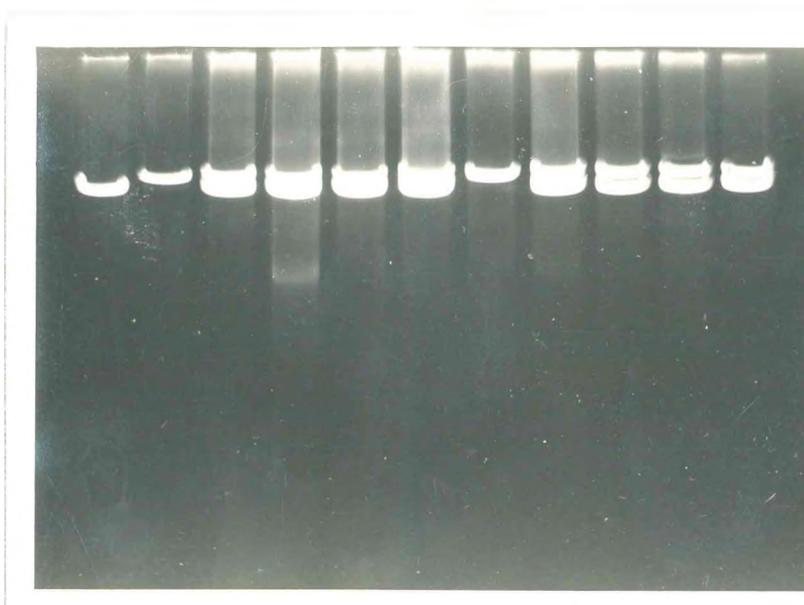


FIGURA IX. Eletroforese em geral de agarose dos plasmídios das amostras de *E. coli* 711 pPM2a-Sm, *E. coli* 711 EP2, *E. coli* 711 EP9 e seus respectivos transconjugantes selecionados em diferentes drogas.

Canaleta	Amostras	Droga	Plasmídios
A	<i>E. coli</i> 711 pPM2a-Sm	Sm	pPM2a-Sm
B	<i>E. coli</i> 711 EP2	-	pTM2
C	<i>E. coli</i> J53	Tc	pPM2a-Sm/Tc e pTM2
D	<i>E. coli</i> J53	Ap	pPM2a-Sm/Ap e pTM2
E	<i>E. coli</i> J53	Cm	pPM2a-Sm/Cm e pTM2
F	<i>E. coli</i> J53	Km	pPM2a-Sm/Km e pTM2
G	<i>E. coli</i> 711 Ep9	-	pTM9
H	<i>E. coli</i> J53	Tc	pPM2a-Sm/Tc e pTM9
I	<i>E. coli</i> J53	Su	pPM2a-Sm/Su e pTM9
J	<i>E. coli</i> J53	Ap	pPM2a-Sm/Ap e pTM9
K	<i>E. coli</i> J53	Sm	pPM2a-Sm/Sm e pTM9

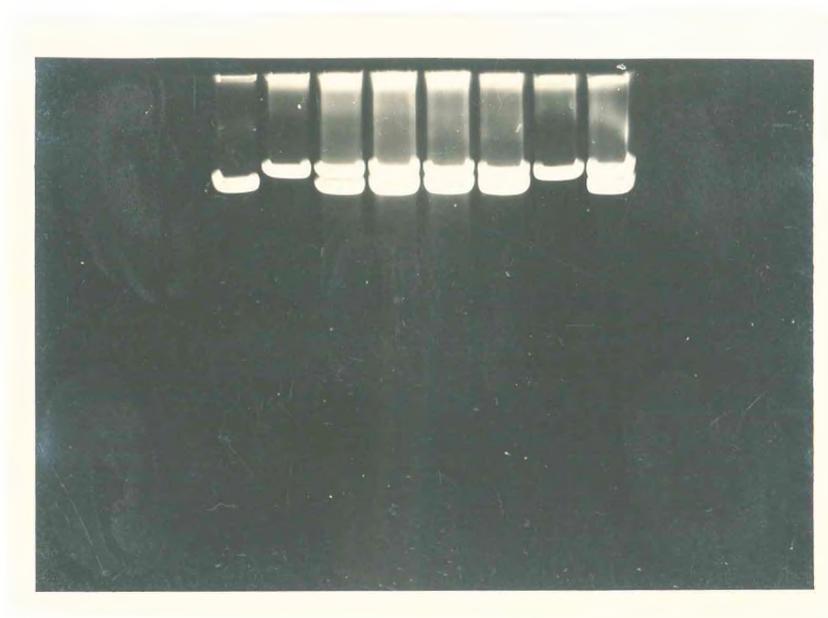


FIGURA X. Eletroforese em gel de agarose dos plasmídios das amostras *E. coli* 711 pPM2a-Sm, *E. coli* 711 EP16 e seus respectivos recombinantes selecionados em distintas drogas.

Canaleta	Amostras	Droga	Plasmídio
A	<i>E. coli</i> 711 pPM2a-Sm	Sm	pPM2a-Sm
B	<i>E. coli</i> 711 EP16	-	pEM16
C	<i>E. coli</i> J53	Tc	pPM2a-Sm/Tc e pTM16
D	<i>E. coli</i> J53	Su	pPM2a-Sm/Su e pTM16
E	<i>E. coli</i> J53	Ap	pPM2a-Sm/Ap e pTM16
F	<i>E. coli</i> J53	Cm	pPM2a-Sm/Cm e pTM16
G	<i>E. coli</i> J53	Sm	?
H	<i>E. coli</i> J53	Km	pPM2a-Sm/Km e pTM16

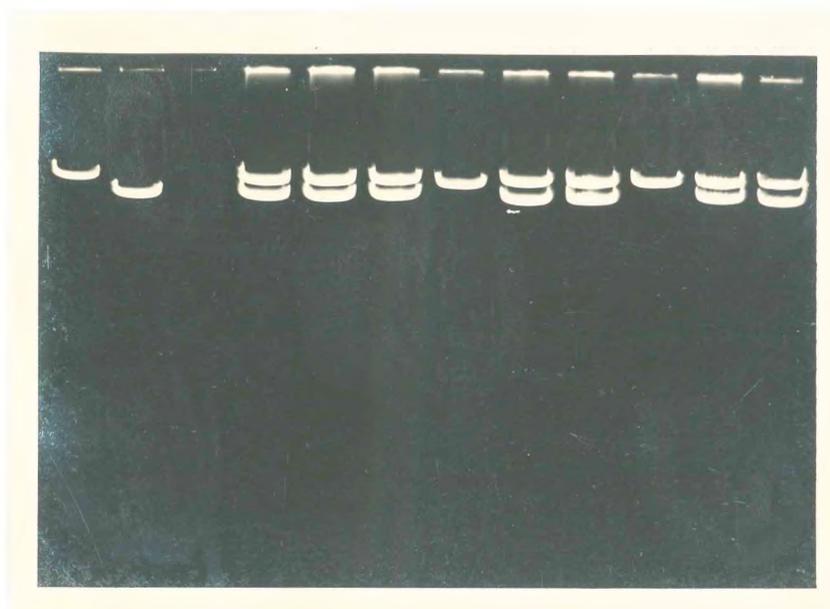


FIGURA XI. Eletroforese em gel de agarose dos plasmídios das amostras de *E. coli* 711 EP16, *E. coli* 711 pPM2a-Sm e seus respectivos transconjugantes selecionados em distintas drogas.

Canaleta	Amostras	Droga	Plasmídios
A	<i>E. coli</i> 711 EP16	-	pTM16
B	<i>E. coli</i> 711 pPM2a-Sm	Sm	pPM2a-Sm
C	<i>E. coli</i> J53 F <sup>-</sup>	-	-
D	<i>E. coli</i> J53	Su	pTM16 e pPM2a-Sm/Su
E	<i>E. coli</i> J53	Ap	pTM16 e pPM2a-Sm/Ap
F	<i>E. coli</i> J53	Km	pTM1- e pPM2a-Sm/km
G	<i>E. coli</i> J53	Cm	?
H	<i>E. coli</i> J53	Cm	pTM16 e pPM2a-Sm/Cm
I	<i>E. coli</i> J53	Tc	pTM16 e pPM2a-Sm/Tc
J	<i>E. coli</i> J53	Tc	?
K	<i>E. coli</i> J53	Sm	pTM16 e pPM2a-Sm/Sm
L	<i>E. coli</i> J53	Sm	pTM16 e pPM2a-Sm/Sm

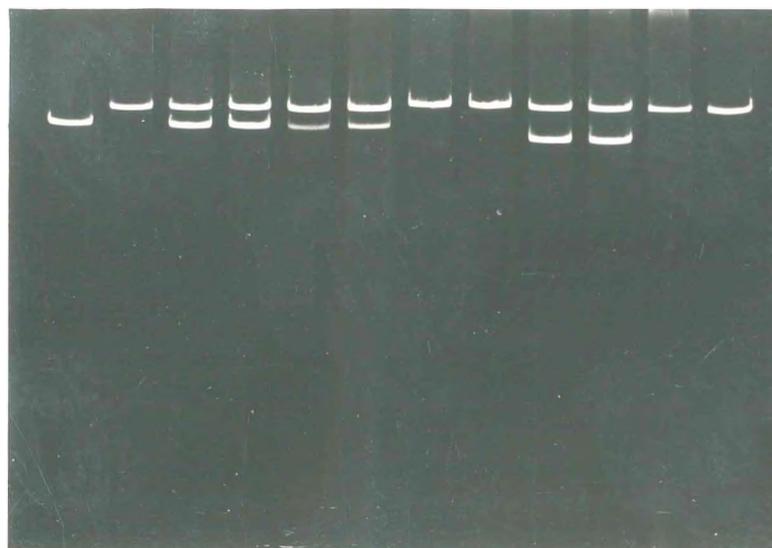


FIGURA XII. Eletroforese em gel de agarose dos plasmídios das a mostras *E. coli* 711 pPM2a-Sm, *E. coli* 711 EP16 e seus recombinantes selecionados em Sm, com as características abaixo discriminadas.

Canaleta	Amostras	Marca perdida	Plasmídios
A	<i>E. coli</i> 711 pPM2a-Sm	-	pPM2a-Sm
B	<i>E. coli</i> 711 EP16	-	pTM16
C	<i>E. coli</i> J53	Km	pTM16 e pPM2a-Sm
D	<i>E. coli</i> J53	Km	pTM16 e pPM2a-Sm
E	<i>E. coli</i> J53	Cm	pTM16 e PPM2a-Sm
F	<i>E. coli</i> J53	Cm	pTM16 e PPM2a-Sm
G	<i>E. coli</i> J53	Ap	?
H	<i>E. coli</i> J53	Ap	?
I	<i>E. coli</i> J53	Tc	pTM16 e pPM2a-Sm
J	<i>E. coli</i> J53	Tc	pTM16 e pPM2a-Sm
K	<i>E. coli</i> J53	Tc e Ap	?
L	<i>E. coli</i> J53	Tc e Ap	?

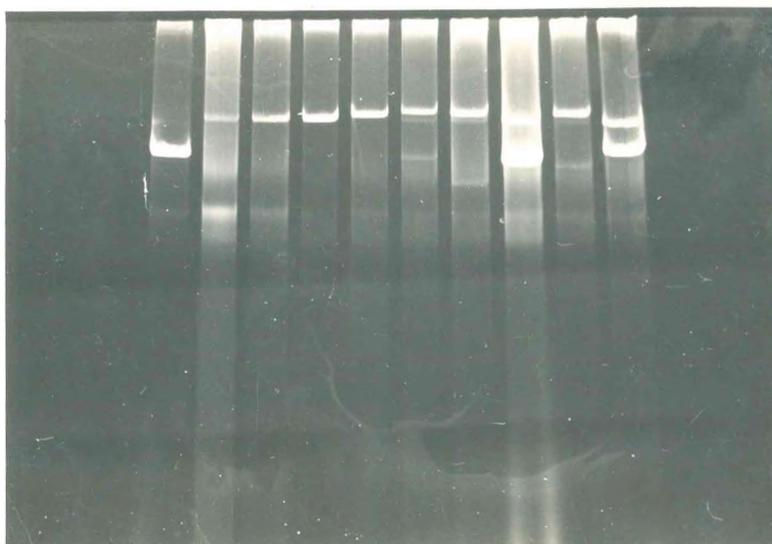


FIGURA XIII. Eletroforese em gel de agarose dos plasmídios das amostras de *E. coli* 711 pPM2a-Sm, *E. coli* 711 F'Lac e de seus transconjugantes selecionados em Tc e com as características abaixo discriminadas.

Canaleta	Amostras	marcas perdidas	Plasmídios
A	<i>E. coli</i> 711 pPM2a-Sm	-	pPM2a-Sm
B	<i>E. coli</i> 711 F'Lac	-	F'Lac
C	<i>E. coli</i> C600	Su, Ap, Cm, Sm, Km	?
D	<i>E. coli</i> C600	Ap, Cm, Sm, Km	?
E	<i>E. coli</i> C600	Au, Ap, Cm, Km	?
F	<i>E. coli</i> C600	Su, Ap, Km	?
G	<i>E. coli</i> C600	Su, Ap, Sm	?
H	<i>E. coli</i> C600	Cm, Sm	F'Lac e pPM2a-Sm
I	<i>E. coli</i> C600	Ap	?
J	<i>E. coli</i> C600	-	F'Lac e pPM2a-Sm

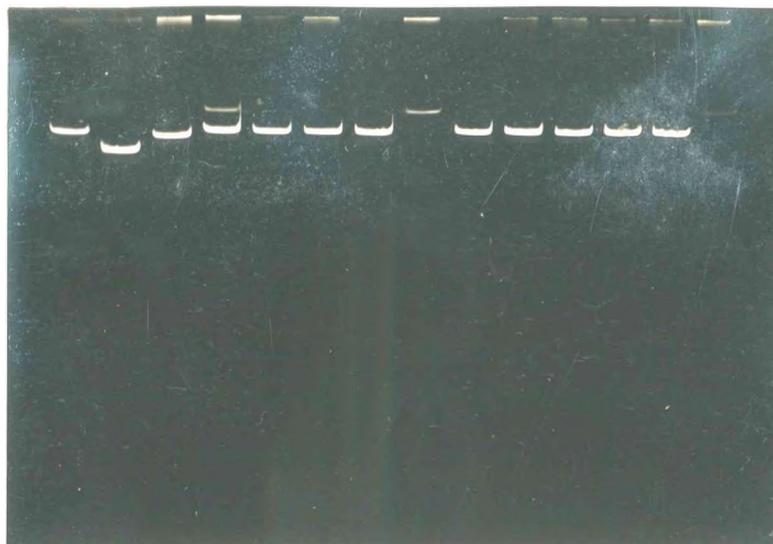


FIGURA XIV. Eletroforese em gel de agarose dos plasmídios de *E. coli* 711 EP16 e *E. coli* 711 pPM2a-Sm, dos plasmídios de seus transconjugantes obtidos por conjugação tripla (em *E. coli* J53) e defectivos para as marcas de Ap e Tc (canaletas G e J da Figura XI), e dos plasmídios de seus recombinantes obtidos por retransferência dos plasmídios acima (em *E. coli* J53) para *E. coli* C600, tendo sido os últimos selecionados em Su, Cm, Sm e Km.

Canaleta	Amostras	Droga Seletora	Modelo de resistência	Porcentagem de colônias
A	<i>E. coli</i> 711 Ep16	-	-	100
B	<i>E. coli</i> 711 pPM2a-Sm	Sm	TcSuApCmSmKm	100
C	<i>E. coli</i> J53	Sm	SuCmSmKm	15
D*	<i>E. coli</i> C600	Su	SuCmSmKm	100
E	<i>E. coli</i> C600	Cm	SuCmSmKm	100
F	<i>E. coli</i> C600	Sm	SuCmSmKm	100
G	<i>E. coli</i> C600	Km	SuCmSmKm	90
H	<i>E. coli</i> C600	Km	Km	10
I	<i>E. coli</i> C600	Sm	SuCmSmKm	15
J	<i>E. coli</i> C600	Su	SuCmSmKm	100
K	<i>E. coli</i> C600	Cm	SuCmSmKm	100
L	<i>E. coli</i> C600	Sm	SuCmSmKm	100
M	<i>E. coli</i> C600	Km	SuCmSmKm	90
N	<i>E. coli</i> C600	Km	Km	10

\* A amostra plotada na canaleta D apresenta duas bandas plasmídiais. Notar que a banda superior migra para posição semelhante à das bandas encontradas nas amostras plotadas nas canaletas H e N.

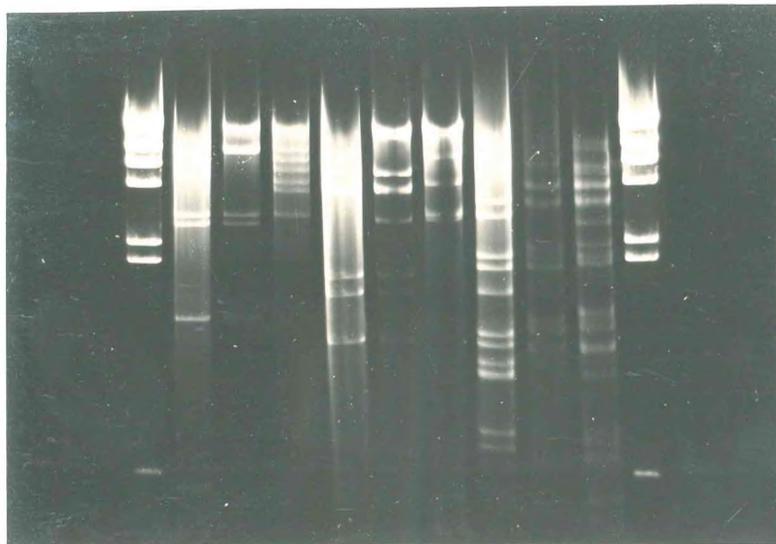


FIGURA XV. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de clivagem dos plasmídios pPM2a-Sm, de um plasmídio híbrido e defeutivo para as marcas de Ap e Tc, e do plasmídio pTM16, com as enzimas Hind III, Eco RI e Pst I. Nas canaletas das extremidades foi empregado DNA do fago lâmbda, em ambos os casos tratados apenas com a enzima Hind III.

Canaleta	DNA	Enzima	Nº de fragmento
A	lâmbda	Hind III	7
B	pPM2a-Sm	Hind III	6
C	p híbrido	Hind III	5
D	pTM16	Hind III	6
E	pPM2a-Sm	Eco RI	5
F	p híbrido	Eco RI	8
G	pTMS16	Eco RI	6
H	pPM2a-Sm	Pst I	12
I	p híbrido	Pst I	> 10
J	pTM16	Pst I	> 16
K	lâmbda	Hind III	7

#### 4 - D I S C U S S Ã O

A análise das Tabelas VI e VII, em correlação com a das Figuras I, II e III, chama a atenção para alguns aspectos relativos à resistência a drogas e respectivos plasmídios R das amostras de *P. mirabilis*. Inicialmente pode-se verificar que todas as amostras resistentes a pelo menos duas drogas são portadoras de plasmídios R. Além disso, tais plasmídios codificam para resistência a duas, quatro, cinco ou seis drogas antimicrobianas.

Com relação à capacidade de autotransferência destes plasmídios pode-se notar que nenhum daqueles com cinco ou seis marcas de resistência é conjugativo. Portanto, os plasmídios conjugativos correspondem a elementos extracromossômicos portadores de duas ou quatro marcas de resistência (Tabelas VIII e IX).

A presença de marca de resistência única para Tc, Cm ou Sm, em amostras que são isentas de plasmídios, fala inicialmente em favor de resistência cromossômica. Embora esta interpretação encontre respaldo em várias publicações (19, 37, 72, 107, 138), acreditamos que os elementos translocáveis (transposons e unidades IS) possam estar relacionados com este tipo de resistência. Esta suposição se baseia nos seguintes da

dos: desde há muito é sabido que as bactérias podem sofrer mutações cromossômicas que conferem alto ou baixo nível de resistência a drogas antimicrobianas ( 11, 12, 49, 50, 51, 144 ). O alto ou baixo nível de resistência adquirido está diretamente relacionado com a droga, para a qual o germe sofre mutação, e não com a espécie bacteriana mutante ( 12, 49, 50, 122, 144 ). Isto significa dizer que, de modo geral, qualquer bactéria pode sofrer mutação e exibir alto nível de resistência para drogas como a estreptomicina ( 51 ), rifamicinas ( 137 ), ácido paraminosalicílico ( 147 ), hidrazida ( 43 ) âcido nalidíxico ( 137 ); pode também mutar e adquirir baixo nível de resistência para as demais drogas ( 12, 50, 122 ), entre as quais estão a tetraciclina ( 51 ) e o cloranfenicol ( 51, 144 ). Portanto, no caso destas duas últimas drogas serão necessárias várias mutações, seguidas de seleção com droga, para que sejam obtidos mutantes com altos níveis de resistência ( 144 ). Entretanto, este evento não acontece "in vivo" em condições normais ( 12, 46 ).

A partir de tais princípios, consagrados experimentalmente ( 137 ), fica difícil de acreditar que a marca de resistência única, para Tc ou Cm, exibida por algumas amostras de *P. mirabilis*, seja simplesmente devido a mutação cromossômica. Por outro lado, embora não tenha sido feita uma abordagem experimental específica visando este aspecto, supomos que os elementos translocáveis estejam envolvidos com este tipo de resistência.

Vale notar também que as amostras resistentes apenas a Tc ou Cm só foram encontradas no grupo de amostras isoladas em 1969. Entendemos que este achado se deve à pressão seletiva e-

xercida pelas drogas em questão, as quais foram muito empregadas durante a década de 60 e início dos anos 70, época em que tais amostras foram isoladas.

A falta de dados sobre os critérios empregados no isolamento e estocagem das amostras não permite um estudo comparativo, em bases epidemiológicas, entre os 2 grupos.

Uma apreciação das Figuras I, II e III, referentes aos plasmídios de ambos os grupos de *P. mirabilis*, detecta diferenças importantes entre os mesmos. Enquanto em 4 das amostras isoladas em 1980 são encontrados pelo menos 2 plasmídios em cada uma, apenas duas daquelas isoladas em 1969 apresentam esta característica. Em contrapartida, plasmídios de baixo peso molecular, entre  $2,5$  e  $4,8 \times 10^6$  dältons, sã foram encontrados nas amostras de 1969 (Tabelas VIII e IX).

Os plasmídios das amostras isoladas em 1980 apresentam-se com peso molecular a partir de  $20 \times 10^6$  dältons (Tabela IX), sendo também encontrado neste grupo de *Proteus* os elementos extracromossômicos de maior peso molecular ( $90 \times 10^6$  dältons). Isto pressupõe uma freqüência de plasmídios conjugativos proporcionalmente maior neste grupo. A propósito, o achado de apenas 2 plasmídios conjugativos nas amostras em questão não afasta esta possibilidade, pois, nesta investigação o interesse esteve voltado apenas para os plasmídios R. Além disso, estes plasmídios R podem ter genótipo do tipo  $\phi_n O^+$ , o que inibiria a transferência de outros plasmídios conjugativos.

As conjugações entre *P. mirabilis* e amostras derivadas de *E. coli* K12 demonstram a existência de 2 tipos de plasmídios: conjugativos e não conjugativos. Os elementos não conjugativos

são predominantes nos 2 grupos de amostras e, de modo particular, a maioria deles apresenta 6 marcas de resistência (Tabelas VI, VII, VIII e IX). Tanto plasmídios conjugativos como não conjugativos são encontrados isolados ou em coexistência com outros elementos extracromossômicos na mesma célula hospedeira (Figuras I, II e III).

Dentro do grupo predominante de plasmídios não conjugativos, um deles, o plasmídio pPM2a da amostra PM-06/69 (canaleta B da Figura I), é facilmente mobilizado pelo plasmídio pPM2b que coexiste com ele na mesma célula. Esta conclusão pôde ser tirada com base nos resultados das conjugações entre a amostra PM-06/69, hospedeira de tais plasmídios, e amostras derivadas de *E. coli* K12. A Figura V ilustra os resultados obtidos em tais conjugações. Nela pode-se verificar que os transconjugantes selecionados em Tc (canaleta B), Su (canaleta C), Ap (canaleta D) e Cm (canaleta E) exibem sempre duas bandas correspondentes a plasmídios e não raro 3 delas. Estes recombinantes são capazes de retransferir seus plasmídios, por conjugações sucessivas, desde que a seleção dos mesmos seja feita em qualquer destas 4 drogas.

Os transconjugantes selecionados em Sm (canaleta F) e Km (canaleta G) apresentam sempre uma só banda, isto é, apenas 1 plasmídio. O plasmídio presente nestes transconjugantes permanece com as 6 marcas de resistência, mas mostra-se incapaz de autotransferir-se, por conjugação, para amostras de *E. coli* C600 F<sup>-</sup> e J53 F<sup>-</sup>. Estes dados permitem concluir que o plasmídiopPM2a de PM-06/69 possui os determinantes de resistência para as 6 drogas e é não conjugativo. Diferentemente deste, o plasmídio pPM2b

de PM-06/69 é conjugativo, mobiliza o plasmídio pPM2a em alta frequência e certamente não possui determinantes de resistência, pelo menos estáveis.

A conclusão de que o plasmídio pPM2b não alberga, pelo menos estavelmente, marcas de resistência, reside no fato de que não foi possível isolar qualquer transconjugante, contendo apenas este elemento extracromossômico, sob seleção com e sem droga. Diferentemente das tentativas de seleção com droga, a impossibilidade de obtenção de recombinantes sem qualquer marca seletora é reconhecidamente difícil e por isso só raramente conseguida. Já a seleção com droga se faz na maioria das vezes com grande facilidade. Inicialmente foram investigados recombinantes selecionados com cada uma das 6 drogas e os resultados foram semelhantes aos já descritos; quando a seleção foi feita com Tc, Su, Ap ou Cm os transconjugantes sempre apresentavam os 2 plasmídios e quando feita com Cm ou Km apenas 1. Posteriormente a exaustiva análise eletroforética de cerca de 600 colônias parcialmente selecionadas, sem droga, e por isso supostamente recombinantes, também não permitiu a obtenção de transconjugantes que fossem hospedeiros apenas do plasmídio conjugativo pPM2b.

A ocorrência de transconjugantes albergando 1 ou 2 plasmídios, na dependência da droga empregada na seleção, merece alguns comentários. Contudo, achamos conveniente evidenciar mais uma vez os aspectos importantes deste achado: a) independente da droga seletora, e por conseguinte do número de plasmídios encontrados nos respectivos transconjugantes, todos os recombinantes exibem resistência frente às 6 drogas. Ou, de outra forma, sempre albergam o plasmídio pPM2a; b) a perda do plasmídio

pPM2b, isento de marca de resistência a drogas, só se faz nos transconjugantes selecionados com Sm ou Km. Portanto, as outras drogas (Tc, Su, Ap e Cm), quando empregadas na seleção não interferem com a replicação do plasmídeo pPM2b.

Dentre as 6 drogas em questão apenas a Sm e Km são, sem qualquer margem de dúvida, bactericidas que atuam a nível ribossômico inibindo a síntese proteica. De fato não só a Sm e Km mas todas as drogas antimicrobianas do grupo dos aminoglicosídeo-aminociclitois ( 38 ) têm este mecanismo de ação (8, 46).

As bactérias naturalmente sensíveis aos aminoglicosídeo-aminociclitois podem adquirir resistência frente a tais drogas por 2 mecanismos básicos: mutação cromossômica e/ou aquisição de plasmídeo R ( 57 ). Geralmente as mutações determinam a biossíntese de enzimas com estrutura química alterada, que entretanto permanecem com função biológica aparentemente normal no ribossomo bacteriano. Todavia, como resultado desta alteração da estrutura química das enzimas ribossômicas, deixa de existir nas mesmas o sítio de ligação para as drogas em questão, o que leva ao aparecimento da resistência ( 22, 45, 46 ).

A presença de plasmídios R leva à biossíntese de enzimas que inativam os aminoglicosídeo-aminociclitois e/ou impedem a sua entrada na célula (44, 45, 46, 67 ). A presença de enzimas que alteram a estrutura química das drogas antimicrobianas, inativando-as, é o principal mecanismo de resistência bacteriana aos aminoglicosídeo-aminociclitois ( 44, 46 ). Estas enzimas estão lotadas em 3 grupos: acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotidiltransferases. Até o momento já foram descritos pelo menos 4 diferentes tipos em cada grupo, sen-

do que cada um desses 12 tipos tem ação inativadora sobre uma ou várias das drogas em discussão ( 44, 45, 46 ). Assim, por exemplo, a espectinomicina e a estreptomicina podem ser inativadas pela mesma nucleotidiltransferase. Embora estes 2 antibióticos sejam estruturalmente distintos, a enzima reconhece o grupo hidroxil comum (3'-hidroxil da estreptomicina, 9-hidroxil da espectinomicina), o qual é estruturalmente semelhante nas duas moléculas ( 46 ). Outros exemplos similares estão descritos na literatura e para revisão sugerimos a publicação de J. Davies ( 46 ).

Em vista das peculiaridades dos mecanismos da resistência mediada por plasmídios R, frente aos antibióticos do grupo dos aminoglicosídeo-aminociclitois, casos da estreptomicina e canamicina, acreditamos que tais drogas estejam envolvidas com a seleção de transconjugantes albergando apenas o plasmídio R pPM2a (canaletas F e G da Figura V). Esta suposição se baseia nos seguintes dados: na amostra PM-06/69 o plasmídio R pPM2a deve codificar tanto para a biossíntese de enzimas inativadoras de Sm e Km como para a biossíntese de enzimas que impedem significativamente a absorção de tais drogas por aquela bactéria. Desta forma a amostra PM-06/69 cresce bem em presença de altas concentrações de Sm e Km (respectivamente 200 e 500 µg/ml - Tabela VI). Entretanto, nos transconjugantes obtidos em *E. coli* 711 esta resistência se reveste de características especiais, não permitindo a replicação do plasmídio pPM2b. Uma explicação para este evento seria a seguinte: apesar de em *E. coli* 711 os 2 mecanismos de resistência encontrados em PM-06/69 (enzimas inativadoras e impermeabilizantes) também existirem, um deles,

aquele relacionado com a diminuição da penetração das drogas se ria menos efetivo do que em PM-06/69. E isto seria possível pe las diferenças importantes existentes entre o envoltório (membrana plasmática, conteúdo do espaço periplásmico e parede) de *Proteus* e *E. coli*, afinal de contas, a par de outras peculiaridades, os *Proteus* são tidos como os mais Gram positivos dentre os germes Gram negativos ( 27 ). Assim, certas quantidades de Sm e Km seriam absorvidas por *E. coli* 711 e, após modificadas na sua estrutura química pelas enzimas inativadoras, exerceriam uma inibição seletiva da biossíntese de proteínas envolvidas com a duplicação plasmídio pPM2b. Neste caso seria de se esperar que a modificação da estrutura química e conseqüente inativação de Sm e Km seria funcionalmente parcial, isto é, esta inativação estaria ligada com a impossibilidade de tais drogas se combinarem com os ribossomos envolvidos com a biossíntese de proteínas com funções vitais para a célula bacteriana. Em decorrência disso a célula se duplicaria normalmente e de modo semelhante o plasmídio pPM2a. Por outro lado, mesmo modificadas, mas neste caso não inativadas, tais drogas se ligariam especificamente às enzimas daqueles ribossomos responsáveis pela biossíntese das enzimas necessárias à duplicação do plasmídio pPM2b, impedindo a sua replicação. A partir daí, em poucas gerações o plasmídio pPM2b seria perdido, restando apenas o elemento extra cromossômico não conjugativo e detentor das marcas de resistência pPM2a. Como tais drogas são bactericidas, ou seja, têm um efeito irreversível, um posterior cultivo de tais recombinantes, mesmo em ausência de tais drogas só permitiria o crescimento de células apenas com o plasmídio R pPM2a. O plasmídio conjugati-

vo pPM2b já teria sido perdido ao longo das divisões celulares anteriores, realizadas em presença de Sm e Km.

Seguindo a linha de raciocínio acima descrita, acreditamos ainda que quando a seleção de recombinantes se faz com as outras drogas (Tc, Su, Ap e Cm) a evolução dos acontecimentos é diferente. A ampicilina exerce a sua ação inibindo a síntese de parede (10, 57, 127), não tendo portanto qualquer relação com a replicação de DNA plasmidial. A sulfa compete com o ácido paraaminobenzóico (PABA), prevenindo a biossíntese de ácido fólico (10, 57); como este evento acontece a nível da síntese de precursores de ácidos nucleicos, sua ação não poderia ser, tão cedo, discriminatória para o DNA do plasmídeo pPM2b. A Tc e o Cm, apesar de serem bacteriostáticos que também agem inibindo a síntese proteica, a nível da unidade 50 S do ribossomo bacteriano (44, 45), certamente não desenvolvem uma ação seletiva sobre proteínas ribossômicas como o fazem a Sm e Km. Melhor dizendo, as enzimas inativadoras da Tc e Cm teriam atividade uniformemente eficaz. Além disso, mesmo que este não fosse o caso, como tais drogas são bacteriostáticas o crescimento de recombinantes na ausência das mesmas deveria permitir a retomada da replicação do plasmídeo pPM2b. Por conseguinte, seria observado que o cultivo em presença de Tc e Cm levaria ao aparecimento de recombinantes albergando apenas o plasmídeo R não conjugativo (pPM2a), enquanto o cultivo em ausência das mesmas permitiria a obtenção de recombinantes com os 2 plasmídios (pPM2a e pPM2b). Entretanto, conforme pode ser verificado na Figura VI, isto não se verifica. E a partir de tais dados podemos concluir que o evento é inerente à seleção de transconjugantes com Sm e Km.

Outro resultado importante encontrado nos transconjugantes obtidos pelo acasalamento entre PM-06/69 e *E. coli* 711F<sup>-</sup> foi a ocorrência de plasmídios extras, detectáveis por eletroforese em gel de agarose (Figuras V e VI). Este achado pode ser resumido da seguinte maneira: a) os recombinantes selecionados em Tc sempre apresentam duas bandas cujo padrão de migração eletroforética é semelhante ao daquelas encontradas na amostra PM-06/69. Podem ainda exibir uma terceira banda, a qual tem peso molecular maior que o das duas já citadas. b) os transconjugantes selecionados com Su, Ap e Cm apresentam sempre duas ou três bandas, sendo que uma delas invariavelmente migra para a mesma posição do plasmídio pPM2a, a segunda para posição um pouco acima de pPM2b e a terceira, quando presente, acima destas duas. Entendemos que estas bandas extras, geralmente tênues e por isso mesmo de difícil visualização e registro fotográfico, sejam decorrentes de dissociação e reassociação de plasmídios, tema já abordado na introdução deste trabalho (130, 131, 132).

Uma observação cuidadosa das Figuras I, II e III permite verificar que estas bandas extras estão presentes em algumas amostras de *Proteus*, quer tais linhagens tenham apenas um ou mais de um plasmídio. Este achado em amostras de *Proteus* portadoras de um só plasmídio, como por exemplo em PM-08/69 e PM-10/69 (Figura I), nos leva a três possíveis interpretações: o evento está intimamente relacionado com amostras de *P. mirabilis*, apenas com cada plasmídio R em questão ou com ambas as possibilidades. Com relação à primeira situação encontramos vários trabalhos na literatura, praticamente os primeiros sobre dissociação de plasmídios R, os quais são concordantes com ela (111,

128, 129, 130 ). Portanto, para os autores destes primeiros estudos, a dissociação e reassociação de plasmídios R era um evento que ocorria particularmente em *P. mirabilis*. Para verificarmos as outras duas possibilidades precisaríamos estudar o comportamento destes plasmídios em outras amostras, por exemplo *E. coli* e mesmo diferentes linhagens de *Proteus*. Contudo, como tais plasmídios são não conjugativos, isto não pôde ser realizado.

O estudo dos recombinantes resultantes do acasalamento entre PM-06/69 x *E. coli* 711 F<sup>-</sup> permitiu dar mais alguns passos na interpretação da dissociação e reassociação do plasmídio R pPM2a. A ocorrência do fenômeno em PM-06/69 não requer a priori maiores comentários, sendo aceitável pressupor que seja dependente da linhagem hospedeira. Todavia, quando verificamos que isto se repete nos recombinantes constituídos em *E. coli* 711, sob seleção com Tc, Su, Ap e Cm (Figuras V e VI), podemos concluir que a dissociação e reassociação de pPM2a não depende unicamente da amostra de *Proteus*. Além disso, a invariável ausência de bandas extras nos recombinantes selecionados com Sm e Km, os quais albergam só o plasmídio R pPM2a, fala em favor de que o outro plasmídio (pPM2b), que é conjugativo e mobilizador de pPM2a, está relacionado com o aparecimento de bandas extras.

Em vista do que foi até aqui exposto, entendemos que a dissociação e reassociação de plasmídios R não é um evento com dependência exclusiva de uma espécie bacteriana pois acontece em *P. mirabilis*, *E. coli* e certamente em outras espécies bacterianas. De modo similar não parece ser dependente unicamente de plasmídios do tipo R, já que não ocorre nos transconjugantes selecionados com Sm e Km.

Em estudo genético-molecular realizado com o plasmídeo R6-5, Ptashne & Cohen ( 124 ) demonstraram a existência de 2 diferentes tipos de seqüências de inserção, as quais foram designadas IS3 e IS1. A IS3 controla a expressão dos gens de resistência a Tc e a IS1 está envolvida com a dissociação e reassociação do plasmídeo R6-5. Estes autores propõem o seguinte modelo para explicar a participação da IS1 na dissociação reversível do plasmídeo em questão: o plasmídeo R6-5 é do tipo cointegrado ( 136 ), sendo composto pelos gens dos determinantes de resistência e do seu respectivo fator de transferência (RTF). Estes 2 replicons estão flanqueados por duas IS1, as quais podem promover a separação (dissociação) e ligação (reassociação) dos mesmos. Algumas vezes, quando tais replicons se dissociam, cada um deles fica com uma IS1. Outras vezes a unidade contendo os determinantes de resistência pode ser replicada várias vezes, permanecendo, contudo, tais unidades ligadas entre si e ao próprio RTF, através de correspondente número de unidades IS1. Devido a isso formam-se plasmídios com maior pêsso molecular.

As proposições acima descritas, que foram baseadas nos estudos de hibridização de Ptashne & Cohen ( 124 ), se prestam para explicar os dados obtidos com os nossos recombinantes, os quais albergam plasmídios que têm peso molecular distinto daqueles encontrados nas amostras de *Proteus*. Isto se verifica nos transconjugantes de PM-06/69 (Figuras V e VI), PM-04/80 e PM-06/80 (Figura VII).

A mobilização do plasmídeo pPM2a por plasmídios Ent adicionou dados interessantes a esta investigação. A mobilização de pPM2a com os plasmídios pTM2 e pTM9 permitiu a seleção de

transconjugantes que sempre albergavam o plasmídeo R e o respectivo plasmídeo Ent mobilizador (Figura IX). Todavia, quando a mobilização foi feita com pTM16, observou-se que alguns transconjugantes haviam perdido um dos plasmídios (Figuras X e XI). A banda que desaparece é aquela correspondente ao plasmídeo R pPM2a mobilizado, permanecendo uma banda que migra para posição semelhante àquela de pTM16. Verificou-se que os recombinantes hospedeiros deste plasmídeo único permanecem resistentes a número variável daquelas drogas (Tc, Su, Cm, Sm, Km), exceptuando-se Ap. Portanto, o desaparecimento da banda correspondente ao plasmídeo pPM2a está diretamente relacionada com a perda da marca de Ap (Figura XII). Em nenhum caso a perda isolada ou concomitante de quaisquer outras marcas pôde ser relacionada com a perda da banda correspondente a pPM2a.

A permanência de um plasmídeo que em eletroforese se comporta como pTM16 e a expressão fenotípica de resistência a várias drogas nos levaram a supor que tais recombinantes albergassem um plasmídeo híbrido. E a comprovação desta hipótese foi feita progressivamente, com a demonstração de que o plasmídeo presente já não mais codificava para a síntese de enterotoxina LT (Tabela XIV) e difere de pTM16 na sua sensibilidade a fagos, mostrando-se à infecção por R17 e sensível a ØII (Tabela XII). Além disso, aquele plasmídeo permanece conjugativo e transferindo consigo marcas de resistência a drogas (Figura XIV). A transferência de tais marcas por conjugação fala em favor de que façam parte daquele plasmídeo, pois, se estivessem integradas ao cromossomo bacteriano não deveriam ser transferidas com a mesma frequência do plasmídeo.

As indicações acima, relativa à constituição híbrida do plasmídeo dos recombinantes isentos da marca de Ap, foram inquestionavelmente comprovadas quando este plasmídeo e aqueles que o originaram (pTM16 e pPM2a) foram submetidos a tratamento enzimático com nucleases de restrição. A Figura XV ilustra os padrões de clivagem diferentes, obtidos de cada um destes plasmídios, quando os mesmos foram tratados com as enzimas Hind III, Eco RI e Pst I.

A mobilização de plasmídios R não conjugativos por plasmídios conjugativos, inclusive Ent, foi descrita por vários autores (66, 114, 160). Guerry e colaboradores (66) chamaram a atenção de que a eventual combinação entre plasmídios conjugativos e não conjugativos (mobilizados) pode determinar o aparecimento de um só elemento extracromossômico, o qual passará a ser visto doravante como um plasmídeo R conjugativo.

Os mecanismos envolvidos com a mobilização de plasmídios não estão devidamente esclarecidos até o momento. Olsen (114) relata um caso em que a mobilização de plasmídeo não conjugativo é significativamente aumentada quando um deles possui um transposon e ambos apresentam homologia de seqüência nucleotídica.

Quanto à hibridização "in vivo" dos plasmídios conjugativos e mobilizadores pTM16 e F'Lac com pPM2a (Figuras XII e XIII), acreditamos que seja um fenômeno complexo e por isso mesmo de difícil explicação. Com base em dados da literatura supomos que fatores como incompatibilidade plasmidial (21), ação seletiva de nucleases de restrição (23) e participação de elementos translocáveis (88) sejam importantes para o esclare

cimento deste dado. A propósito, dado ao grande número de marcas de resistência codificadas por pPM2a, não foi possível determinar o seu grupo de incompatibilidade. Contudo, como F'Lac é do grupo FI (20, 42, 134) e pTM 16 do grupo L (145), é de se esperar que este fator não tenha influência marcante neste caso.

Os plasmídios híbridos obtidos e com marca de resistência para Su, Cm, Sm e Km são conjugativos e demonstraram boa estabilidade de suas marcas. Tais replicons exibem inclusive a capacidade de dissociação reversível (Figura XIV). Esta verificação vem de encontro às idéias de Guerry e colaboradores ( ), os quais propuseram que plasmídios híbridos como os obtidos neste trabalho, uma vez sendo isolados na natureza, sejam tidos simplesmente como plasmídios R conjugativos.

Todos os plasmídios conjugativos detectado nas amostras investigadas, isto é, pPM11 de PM-49/69, pPM12 de PM-50/69, pPM13 de PM-51/69 (Figura I, Tabela VIII), pPM20a de PM-04/80 e pPM22a de PM-06/80 (Figura III, Tabela IX), apresentam grande estabilidade do seu caráter conjugativo e respectivas marcas de resistência; isto se verifica tanto em *P. mirabilis* como em amostras de *E. coli* para as quais foram transferidas. Exceptuando-se estas duas características, os 5 plasmídios conjugativos não exibem qualquer outra propriedade que seja comum a todos eles.

Em virtude das semelhanças iniciais encontradas nos plasmídios pPM11, pPM12 e pPM13 com relação ao peso molecular (Figura II), marcas de resistência e caráter conjugativo (Tabela VI), foram realizados outros estudos visando estabelecer se

se tratava do mesmo plasmídeo ou se a identidade entre os mesmos era apenas parcial. Assim, os plasmídios em questão foram lotados dentro do grupo I gama de incompatibilidade. Em seguida, quando investigados quanto aos seus genes *tra* apresentaram-se com genótipo  $\text{fin } O^- \text{ tra } O^C$ . Isto implica em que tais plasmídios sendo  $\text{fin } O^-$  não codificam para a síntese de repressores citoplasmáticos que atuam sobre os genes *tra*, impedindo a sua própria transferência ou a de outros plasmídios. Além disso o caráter  $\text{tra } O^C$  significa que eles são mutantes constitutivos, portanto, resistentes a estes mesmos repressores. O genótipo  $\text{fin } O^- \text{ tra } O^C$  justifica a alta frequência com que estes plasmídios são transferidos por conjugação (Tabela VIII), inclusive quando coexiste na mesma célula hospedeira com o plasmídeo p307, que é do tipo  $\text{fin } O^+$ , bem como sua incapacidade de reprimir a função dos genes *tra* do plasmídeo F'Lac. Tais resultados são similares aos descritos por Meynell & Cooke com o plasmídeo R100 (104).

Os plasmídios pPM11, pPM12 e pPM13, quando clivados com as nucleases de restrição Hind III, Eco RI e Hae III mostraram grande homologia entre as suas estruturas de DNA (Figura VIII). Esta conclusão se baseia nos fragmentos resultantes, mostrados por eletroforese, os quais se apresentam com padrão de clivagem semelhante frente a cada enzima.

A ocorrência de tantos dados comuns entre os plasmídios pPM11, pPM12 e pPM13, como nível e modelo de resistência, (Tabela VI), padrão de migração eletroforética (Figura II), peso molecular e frequência de transferência por conjugação (Tabela VIII), genótipo  $\text{fin } O^- \text{ tra } O^C$ , grupo I gama de incompatibili

dade e padrão de clivagem enzimática (Figura VIII), permite concluir que tais elementos correspondem a um único tipo de replicon encontrado em 3 amostras diferentes.

Uma observação curiosa foi feita com as amostras PM-49/69, PM-50/69 e PM-51/69, que albergam os plasmídios pPM11, pPM12 e pPM13; estes *Proteus* rotineiramente apresentam crescimento pobre quando cultivados em TSB sob agitação. Este comportamento exerce influência negativa sobre o nível de resistência das amostras frente a Tc e Sm, drogas para as quais são resistentes (Tabela VI). Contudo não foi verificada qualquer influência neste sentido, dos plasmídios pPM11, pPM12 e pPM13, sobre as amostras transconjugantes que os albergavam.

Os dois plasmídios conjugativos restantes, pPM20a e pPM22a, respectivamente das amostras PM-04/80 e PM-06/80 (Figura III, Tabela IX), apesar de exibirem modelos de resistência diferentes (Tabela VII) apresentam algumas propriedades comuns entre si, podendo ser citadas as seguintes: frequência de transferência em valores muito próximos (Tabela IX), fácil retransferência a partir de transconjugantes, seleção de recombinantes com quaisquer das drogas para as quais tais plasmídios conferem resistência e coexistência estável com outros plasmídios nas respectivas amostras de *Proteus* (Figura III).

Outras características comuns, relativas aos transconjugantes hospedeiros de tais plasmídios, podem ser observadas na Figura VII; uniformemente os recombinantes só albergam o plasmídio R e isto permite pressupor que os outros plasmídios, encontrados nas amostras selvagens de *Proteus*, são não conjugativos ou, caso sejam conjugativos, têm sua transferência inibida pe-

los plasmídios R. Neste último caso, os plasmídios R seriam  $\phi_{in} O^+$ . Além disso, conforme pode ser verificado na mesma Figura VII, os recombinantes elecionados em Su (canaletas B e E), Cm (canaleta G) e Km (canaleta H) albergam plasmídios que exibem padrão eletroforético semelhante ao dos plasmídios originais, respectivamente pPM20a (canaleta A) e pPM22a (canaleta D). As bandas correspondentes a todos estes plasmídios mostram o mesmo padrão de migração eletroforética, denotando que seus pesos moleculares não sofreram variação significativa (Tabela XI). Por outro lado os recombinantes selecionados em Ap demonstram, em ambos os casos, um padrão de migração eletroforética diferente, com bandas posicionadas em plano superior às demais. A explicação mais provável para este achado está baseada na possibilidade de que a marca de Ap destes plasmídios corresponda a um transposon, o que justificaria a dissociação e reassociação dos mesmos. É interessante notar que tais plasmídios, que nos transconjugantes exibem maior peso molecular, mantiveram-se aparentemente estáveis ao longo dos experimentos com eles realizados.

Finalizando, entendemos que os dados obtidos ao longo deste trabalho não configuram um estudo genético-molecular conclusivo em seu todo. Entretanto, como pode acontecer na investigação científica, embora os objetivos iniciais tenham sido alcançados, os próprios dados conquistados pedem uma interpretação que quase sempre requer novos experimentos e assim sucessivamente. Dentro desta linha de pensamento esperamos ter dado alguma contribuição ao tema abordado, a qual pelo menos chame a atenção de quão dinâmica são as interrelações moleculares dos elementos genéticos responsáveis pela resistência bacteriana a

drogas.

## 5 - R E S U M O

Cento e vinte amostras de *Proteus mirabilis*, obtidas de materiais clínicos diversos, das quais metade foi isolada em 1969 e o restante em 1980, foram inicialmente investigadas quanto aos seus modelos e níveis de resistência a drogas, bem como presença de plasmídios R.

Dentro do grupo de amostras, 32 delas exibem resistência para uma ou mais drogas; 8 destas, isentas de plasmídios, apresentam resistência cromossômica para Sm e as 24 restantes, albergando plasmídios R, demonstram resistência para uma ou 6 drogas.

Quanto aos plasmídios R detectados, 5 deles são conjugativos e o restante não conjugativos. Os plasmídios conjugativos pPM11, pPM12 e pPM13 codificam para resistência a Tc e Sm, são do grupo de incompatibilidade I gama, têm genótipo  $\phi$ in O<sup>-</sup> tra O<sup>C</sup> e peso molecular de  $36 \times 10^6$  daltons. Além disso, quando tratados com as nucleases de restrição Hind III, Eco RI e Hae III resultam em fragmentos de peso molecular similar em relação a cada enzima. Estes dados permitem concluir que os plasmídios em questão correspondem a um só tipo de elemento extracromossômico, o qual é encontrado em 3 amostras distintas de *P. mirabilis*.

Os 2 plasmídios conjugativos restantes, respectivamente pPM20a e pPM22a, apesar de coexistirem estavelmente com outros plasmídios nas suas hospedeiras selvagens, transferem-se sozinhos para *E. coli* K12. Em ambos os casos os recombinantes selecionados com Ap albergam, de modo estável, plasmídios de maior peso molecular que daqueles selecionados com outras drogas. É provável que isso seja explicado pela dissociação e reassociação de tais plasmídios, o que por sua vez seria dependente de elementos translocáveis.

Os plasmídios R não conjugativos constituem a maioria e apenas um deles (pPM2a) é naturalmente mobilizado pelo plasmídio coexistente (pPM2b) na amostra hospedeira selvagem. A partir da mobilização de pPM2a para *E. coli* K12 são selecionados 2 tipos de recombinantes: a) quando a seleção é realizada com Tc, Su, Ap e Cm, os transconjugantes albergam o plasmídio pPM2a, um plasmídio correspondente a pPM2b mas geralmente com peso molecular maior que o deste e, com grande frequência, um terceiro plasmídio. É bastante provável que estes 2 últimos tipos de plasmídios, que se apresentam com pesos moleculares alterados, sejam decorrentes de dissociação reversível. E aqui também o evento seria explicado pela presença de transposons; b) os transconjugantes selecionados em Sm e Km albergam apenas o plasmídio R pPM2a; a presença deste plasmídio único nos recombinantes confere resistência frente às 6 drogas para as quais a amostra PM-06/69, que é a hospedeira natural dos plasmídios pPM2a e pPM2b, também exhibe. Estando sozinho em *E. coli* K12 o plasmídio pPM2a mostrou-se não conjugativo, não sendo verificada também dissociação reversível em tais recombinantes.

O plasmídio pPM2a pode ser mobilizado pelos plasmídios Ent conjugativos pTM2, pTM9 e pTM16, e também por F'Lac. A mobilização por pTM2 e pTM9 levou a obtenção de transconjugantes, sob seleção com quaisquer das 6 drogas. Estes recombinantes apresentam sempre os 2 plasmídios, isto é, um destes plasmídios Ent e pPM2a. Por outro lado, a mobilização com pTM16 ou F'Lac permitiu o isolamento de recombinantes instáveis, os quais apresentaram em sua maioria comportamento semelhante aos primeiros. Alguns transconjugantes, entretanto, albergam um só plasmídio que continua sendo conjugativo. No caso particular da mobilização com pTM16, verificou-se que o plasmídio em questão, apesar de apresentar peso molecular semelhante ao de pTM16, não mais codificava para a biossíntese de enterotoxina LT e nem para resistência a Ap. Este plasmídio correspondia, portanto, a uma molécula híbrida, constituída por genes dos replicons pTM16 e pPM2a, o que foi confirmado por estudo comparativo com nucleases de restrição.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ACHTMAN, M.; SKURRAY, S.A.; THOMPSON, R.; HELMUTH, R.; HALL, S.; BEUTIN, L. & CLARK, A.J. Assignment of *tra* cistrons to Eco RI fragments of F sex factor DNA. *J. Bacteriol.*, 133:1382-1392, 1978.
- 2 - ADELBERG, E.A. & BURNS, S.N. Genetic variation in the sex factor of *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 79:321-330, 1960.
- 3 - ANDERSON, E.S. The ecology of transferable drug resistance in the enterobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 22:131-180, 1968.
- 4 - ANDERSON, E.S. & THRELFALL, E.J. The characterization of plasmids in the enterobacteria. *J. Hyg. (Camb.)*, 72: 471-487, 1974.
- 5 - AKIBA, T.; KOYAMA, K.; ISHIKE, Y.; KIMURA, S. & FUKU SHIMA, T. On the mechanism of the development of multiple-drug resistant clones of *Shigella*. *Japan. J. Microbiol.*, 4: 219-223, 1960.
- 6 - AVERY, O.T.; MacLEOD, C.M. & McCARTY, M. Studies on the chemical nature of the substances inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction from *Pneumococcus* type III. *J. Exp. Med.*, 79: 137-158, 1944.
- 7 - BARON, L.S.; GEMSKI, P.; JONHSON, E.M. & WOHLHIETER, E.M. Intergeneric bacterial matings. *Bact. Rev.*, 32: 362-369, 1968.
- 8 - BENEVISTE, R. & DAVIES, J. R-factor mediated gentamicin resistance. A new enzyme which modifies aminoglycoside antibiotics. *Febs Letters*, 14:293-296, 1971.
- 9 - BRINTON Jr., C.C. The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in Gram negative bacteria. *Transact. N.Y. Acad. Sci.*, 27: 1003-1054, 1965.

- 10 - BRODA, P. *Plasmids*. W.H. Freeman and Company. Oxford and San Francisco, 1979.
- 11 - BRYSON, V. & DEMEREC, M. Bacterial resistance. *Am. J. Med.*, 18: 723-737, 1955.
- 12 - BRYSON, V. & DEMEREC, M. Patterns of resistance to antimicrobial agents. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 53: 283-289, 1959.
- 13 - BUKARI, A.I.; SHAPIRO, J.A. & ADHYA, S. *DNA insertion elements, episomes and plasmids*. Cold Spring Harbor, New York, 1977.
- 14 - CAIRNS, J. An estimate of the length of the DNA molecule of T2 bacteriophage by autoradiography. *J. Mol. Biol.*, 3: 756-761, 1961.
- 15 - CAIRNS, J. A minimum estimate for the length of the DNA of *Escherichia coli* obtained by autoradiography. *J. Mol. Biol.*, 4: 407-409, 1962.
- 16 - CALOS, M.P. & MILLER, J.H. Transposable elements. *Cell*, 20: 579-595, 1980.
- 17 - CANTACUZENE, J. & BONCIU, O. Modifications subes par des streptocoques d'origine non scarlatineuse au contact de produits scarlatineux filtrés. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 182: 1185-1187, 1926.
- 18 - CAVALLI-SFORZA, L.L. La sessualità nei batteri. *Bol. Inst. Sieroter. Milan.*, 12: 281-289, 1950.
- 19 - CHABBERT, Y.A.; BAUDENS, J.G. & BOUNCHAUD, D.H. Medical aspects of transferable drug resistance. In: *Bacterial episomes and plasmids*. G.E.W. Wolstenholme & M. O'Connor J. & A. Churchill Ltd., pp.227-229, 1969.
- 20 - CHABBERT, Y.A.; SCAVIZZI, M.R.; WITCHITZ, J.L.; GERBAUD, G.R. & BOUANCHAUD, D.H. Incompatibility groups and the classification of  $f_i^-$  resistance factors. *J. Bacteriol.*, 112: 666-675, 1972.
- 21 - CHAKRABARTY, A.M. Genetic fusion of incompatible plasmids in *Pseudomonas*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 70: 1641-1644, 1973.
- 22 - CHANG, F.N. & FLAKS, J.G. Binding of Dihydrostreptomycin to *Escherichia coli* ribosomes: characteristics and equilibrium of the reaction. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2: 294-307, 1972.

- 23 - CHANG, S. & COHEN, S.N. *In vivo* site-specific genetic recombination promoted by the Eco RI restriction endonuclease. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74: 4811-4815, 1977.
- 24 - CLOWES, R.C. Molecular structure of bacterial plasmids. *Bact. Rev.*, 36: 361-404, 1972.
- 25 - COETZEE, J.N. & SACKS, T.G. Intrastrain transduction in *Proteus mirabilis*. *J. Gen. Microbiol.*, 23: 445-455, 1960.
- 26 - COETZEE, J.N. Transduction of Swarming in *Proteus mirabilis*. *J. Gen. Microbiol.*, 33: 1-7, 1963.
- 27 - COETZEE, J.N. Genetics of the *Proteus* group. *Ann. Rev. Microbiol.*, 26: 23-54, 1972.
- 28 - COETZEE, J.N.; DATTA, N.; HEDGES, R.W. & APPELBAUM, P. Transduction of R factors in *Proteus mirabilis* and *Proteus rettgeri*. *J. Gen. Microbiol.*, 76: 355-368, 1973.
- 29 - COETZEE, J.N. High frequency transduction of kanamycin resistance in *Proteus mirabilis*. *J. Gen. Microbiol.*, 84: 285-296, 1974.
- 30 - COETZEE, J.N. High frequency transduction of resistance to ampicilin and kanamicyn in *Proteus mirabilis*, *J. Gen. Microbiol.*, 87: 173-176, 1975.
- 31 - COHEN, S.N. & MILLER, C.A. Multiple molecular species of circular R-factor DNA isolated from *Escherichia coli*. *Nature*, 224: 1273-1277, 1969.
- 32 - COHEN, S.N. & MILLER, C.A. Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria. III. Isolation of the discrete transfer unit of the R-factor R1. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 67: 510-516, 1970.
- 33 - COHEN, S.N.; SILVER, R.P.; SHARP, P.A. & McCoubrey, A.E. Studies on the molecular nature of R factors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 182: 173-187, 1971.
- 34 - COHEN, S.N. Transposable genetic elements and plasmid evolution. *Nature*, 263: 731-738, 1976.
- 35 - COHEN, S.N. & KOPECKO, D.J. Structural evolution of bacterial plasmids: role of translocating genetic elements and DNA sequence insertions. *Federation Proceedings*, 35: 2031-2036, 1976.
- 36 - COHEN, S.N. & SHAPIRO, J.A. Transposable genetic elements. *Scient. Amer.*, 242: 36-45, 1980.

- 37 - COSTA, S.O.P. *Instabilidade genética da excreção de protease (gelatinase) em Proteus mirabilis*. Tese de Livre Docência. Universidade de São Paulo - São Paulo, 1978.
- 38 - COX, D.A.; RICHARDSON, K. & ROSS, B.C. The aminoglycosides. In: *Topics in antibiotic chemistry*. P. Sommes. Halted Press, New York, pp.1-90, 1977.
- 39 - CUZIN, F. Multiplication autonome de l'episome sexuel d'*Escherichia coli* K12 dans une souche Hfr. *Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris)*, 254: 4511-4520, 1962.
- 40 - DATTA, N. Transmissible drug resistance in an epidemic strain of *Salmonella typhimurium*. *J. Hyg. Camb.*, 60: 301-310, 1962.
- 41 - DATTA, N. & HEDGES, W. Host ranges of R factors. *J. Gen. Microbiol.*, 70: 453-460, 1972.
- 42 - DATTA, N. Epidemiology and classification of Plasmids. In: *Microbiology*. D. Schlessinger. American Society for Microbiology, Washington - DC, pp.9-15, 1974.
- 43 - DAVID, H.L. & NEWMAN, C.M. Some observations in genetics of isoniazid resistance in the tubercle bacilli. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 104: 508-515, 1971.
- 44 - DAVIES, J. & KAGAN, S.A. What is the mechanism of plasmid-determined resistance to aminoglycoside antibiotics? In: *R. Factors. Their properties and possible control*. J. Drews & G. Hogenauer. Springer Verlag, New York, pp.207-215, 1977.
- 45 - DAVIES, J. & SMITH, D.I. Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Ann. Rev. Microbiol.*, 32: 469-490, 1978.
- 46 - DAVIES, J. Aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics and their modifying enzymes. In: *Antibiotics in Laboratory Medicine*. V. Lorian (ed.). The William & Wilkins Company, Baltimore, MD., pp.474-489, 1980.
- 47 - DAVIS, B.D. & MINGIOLI, E.S. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or Vitamin B<sub>12</sub>. *J. Bacteriol.*, 60: 17-28, 1950.
- 48 - DENNISON, S. Naturally occurring R factor, derepressed for pilus synthesis, belonging to the same compatibility group as the sex factor F of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 109: 416-422, 1972.
- 49 - DEMEREC, M. Productions of *Staphylococcus aureus* strains resistant to various concentrations of penicillin. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 31: 16-24, 1945.

- 50 - DEMEREC, M. Origin of bacterial resistance of antibiotics. *J. Bacteriol.*, 56: 63-74, 1948.
- 51 - DEMEREC, M. Patterns of bacterial resistance to penicillin, aureomycin, and streptomycin. *J. Clin. Invest.*, 28: 891-893, 1949.
- 52 - DOBOZY, A. & HAMMER, H. Incidence of transmissible drug resistance in *Proteus mirabilis*. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 15: 181-185, 1968.
- 53 - EDWARDS, P.R. & EWING, W.H. *Identification of Enterobacteriaceae*. Third Edition, Burgess Publishing Company, Mineapolis, 1972.
- 54 - EGAWA, R. & HIROTA, Y. Inhibition of fertility by multiple drug resistance factor (R) in *Escherichia coli* K12. *Japan. J. Genet.*, 37: 66-71, 1962.
- 55 - FALKOW, S.; WOHLHIETER, J.A.; CITARELLA, R.V. & BARON, L.S. Transfer of episomic elements to *Proteus*. I-Transfer of F-linked chromosomal determinants. *J. Bacteriol.*, 87: 209-219, 1964.
- 56 - FALKOW, S.; WOHLHIETER, J.A.; CITARELLA, R.V. & BARON, L.S. Transfer of episomic elements to *Proteus*. II - Nature of Lac<sup>+</sup> *Proteus* strains isolated from clinical specimens. *Bacteriol.*, 88: 1598-1601, 1964.
- 57 - FALKOW, S. *Infection multiple drug resistance*. Pion Limited, London, 1975.
- 58 - FINNEGAN, D.J. & WILLETTS, N.S. The site of action of the F transfer inhibition. *Molec. Gen. Genet.*, 127: 307-316, 1973.
- 59 - FINNEGAN, D.J. & WILLETTS, N.S. The nature of the transfer inhibitor of several F-like plasmids. *Molec. Gen. Genet.*, 119: 57-66, 1972.
- 60 - GEMSKI, P.; WOHLHIETER, J.A. & BARON, L.S. Chromosome transfer between *Escherichia coli* Hfr strains and *Proteus mirabilis*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 58: 1461-1467, 1967.
- 61 - GIBSON, M.I. & GIBSON, F. Development of resistance to dihydrostreptomycin by *Bacterium coli*. *Nature*, 167: 113-114, 1951.
- 62 - GILL, F.A. & HOOK, E.W. Salmonella strains with transferable antimicrobial resistance. *JAMA*, 198: 129-131, 1966.

- 63 - GRIFFITH, F. Significance of pneumococcal types. *J. Hyg. (Camb.)*, 27: 113-159, 1928.
- 64 - GRINDLEY, N.D.F.; GRINDLEY, J.N. & ANDERSON, E.F. R Factor compatibility groups. *Molec. Gen. Genet.*, 119: 287-297, 1972.
- 65 - GRINDLEY, N.D.F.; HUMPHREYS, G.O. & ANDERSON, E.S. Molecular studies of R factor compatibility groups. *J. Bacteriol.*, 63: 399-406, 1973.
- 66 - GUERRY, P.; van EMBDEN, J. & FALKOW, S. Molecular nature of two non-conjugative plasmids carrying drug resistance genes. *J. Bacteriol.*, 117: 691-698, 1974.
- 67 - HAAS, M. & DOWDING, J.E. Aminoglycoside-modifying enzymes. *Methods Enzymol.*, 43: 611-628, 1974.
- 68 - HASHIMOTO, H. & ROWND, R.H. Transition of the factor NR1 in *Proteus mirabilis*: level of drug resistance of nontransitioned and transitioned cells. *J. Bacteriol.*, 19: 56-68, 1975.
- 69 - HAYES, W. Observations on a transmissible agent determining sexual differentiation in *Bacterium coli*. *J. Gen. Microbiol.*, 8: 72-88, 1953.
- 70 - HAYES, W. The mechanism of genetic recombination in *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 18: 75-83, 1953.
- 71 - HAYES, W. *The genetics of bacteria and their viruses*. Second Edition. Blackell Scientific Publications, Oxford and Edimburg, 1968.
- 72 - HEDGES, R.W. R factors from *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.*, 87: 301-311, 1975.
- 73 - HEDGES, R.W. & JACOB, A.E. Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons. *Molec. Gen. Genet.*, 132: 31-40, 1974.
- 74 - HELINSKI, D.R. & CLEWELL, D.B. Circular DNA. *Ann. Rev. Biochem.*, 40: 899-942, 1971.
- 75 - HELINSKI, D.R.; LOVETT, M.A.; WILLIAMS, P.H.; KATZ, L.; KUPERSZTOCH-PORTNOY, Y.M.; GUINEY, D.G. & BLAIR, D.G. Plasmid deoxyribonucleic acid replication. In: *Microbiology*. David Schlessinger, American Society for Microbiology, Washington - DC, pp.104-114, 1974.

- 76 - HIROTA, Y.; NISHIMURA, Y.; ØRSKOV, F. & ØRSKOV, I. Effect of drug-resistance factor R on the F properties of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 87: 341-351, 1964.
- 77 - HUTCHISON, W.G. & MEDILL, M.A. The isolation of *Proteus* mutants and their use in recombination experiments. *Bact. Proc.*, G-51: 40-41, 1954.
- 78 - INSELBURG, J. Studies of colicin E1 plasmid functions by analysis of deletions and TnA insertion of the plasmid. *J. Bacteriol.*, 132: 332-340, 1977.
- 79 - JACOB, F. & WOLLMAN, E.L. Genetic and physical determination of chromosomal segments in *Escherichia coli*. *Symp. Soc. Exptl. Biol.*, 12: 75-89, 1958.
- 80 - JACOB, F. & ADELBERG, E.A. Transfer de caractères par incorporation au facteur sexuel d'*Escherichia coli*. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 249: 189-195, 1959.
- 81 - JACOB, F. & MONOD, J. Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.*, 3: 318-356, 1961.
- 82 - JACOB, F. & WOLLMAN, E.L. *Sexuality and genetics of bacteria*. Academic Press, New York & London, 1961.
- 83 - JACOB, F.; BRENNER, S. & CUZIN, F. On the regulation of DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 28: 329-348, 1963.
- 84 - JACOB, F. & BRENNER, S. Sur la regulation de la synthèse du DNA chez les bactéries: l'Hypothèse du réplicon. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 256: 298-307, 1963.
- 85 - KAGIWADA, S.; KATO, S.; ROKYGO, M.; HASHIMOTO, J. & NISHIYAMA, K. Studies on the mechanism of development of resistant *Shigella* in intestinal tracts with special reference to the possibility of converting sensitive *Shigella* to resistance by multiple-drug resistant *Escherichia coli* in intertinal tracts. *Nihon Iji Shimpo*, 1885: 5-11, 1960.
- 86 - KÉTYI, Y. & VERTÉNYI, A. Episomic antibiotic resistance among *Shigella* strains isolated in Hungary. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 12: 305-317, 1965.
- 87 - KLECKNER, N. Translocatable elements in procaryotes. *Cell.*, 11: 11-23, 1977.
- 88 - KLECKNER, N. Transposable elements in procaryotes. *Ann. Rev. Genet.*, 15: 341-404, 1981.

- 89 - KITAMOTO, O.; KASAI, N.; FUKAIA, K. & KAWASHIMA, A. Drug sensitivity of the Shigella strains isolated in 1955. *J. Japan. Assoc. Infect. Dis.*, 30: 403-409, 1956.
- 90 - KOPECKO, D.J. & PUNCH, J.D. Regulation of R-factor replication in *Proteus mirabilis*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 182: 207-216, 1971.
- 91 - KOPECKO, D.J. & COHEN, S.N. Site-specific rec A<sup>-</sup> independent recombination between bacterial plasmids: involvement of palindromes at the recombinational loci. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72: 1373-1377, 1975.
- 92 - LAWN, A.M.; MEYNELL, E. & COOKE, M. Mixed infection with bacterial sex factors: sex pili of pure and mixed phenotype. *Ann. Inst. Pasteur*, 120: 1-8, 1971.
- 93 - LAVALLÉ, R. & JACOB, F. Sur la sensibilité des episomes sexuels et colicinogènes d'*E. coli* K12 à la désintégration du radiosphère. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 252: 1687-1680, 1961.
- 94 - LEDERBERG, J. & TATUM, E.L. Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 11: 113-114, 1946.
- 95 - LEDERBERG, J.; CAVALLI-SFORZA, L.L. & LEDERBERG, E.M. Sex compatibility in *Escherichia coli*. *Genetics*, 37: 720-728, 1951.
- 96 - LEDERBERG, J. Cell genetics and hereditary symbiosis. *Physiol. Rev.*, 32: 403-430, 1952.
- 97 - MAAS, R. & MAAS, W.K. Introduction of a gene from *Escherichia coli* B into Hfr and F<sup>-</sup> strains of *Escherichia coli* K12. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 48: 1887-1893, 1962.
- 98 - MARMUR, J.; ROWND, R.; FALKOW, S.; BARON, L.S.; SCHILDKRAUT, C. & DOTY, P. The nature of intergeneric episomal infection. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 47: 972-979, 1961.
- 99 - MARTINEZ, T. Estudo genético e físico em plasmídios de amostras humanas enterotoxigênicas de *Escherichia coli*. Tese de Mestrado. Escola Paulista de Medicina, 1979.
- 100 - MEYERS, J.A.; SANCHEZ, D.; ELWELL, L.P. & FALKOW, S. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, 127: 1529-1537, 1976.

- 101 - MEYNELL, E. & DATTA, N. Functional homology of the sex factor and resistance transfer factors. *Nature*, 207: 884-885, 1965.
- 102 - MEYNELL, E. & DATTA, N. The relationship of resistance transfer factors to the F factor of *Escherichia coli* K12. *Genetic Res.*, 7: 134-139, 1966.
- 103 - MEYNELL, E. & DATTA, N. Mutant drug resistant factors of high transmissibility. *Nature*, 214: 882-887, 1967.
- 104 - MEYNELL, E. & COOKE, M. Repressor minus and operator constitutive derepressed mutants of F-like R factors: their effect on chromosomal transfer by Hfr Cell. *Genetic Res.*, 14: 309-313, 1969.
- 105 - MIKI, T.; HORIUCHI, T. & WILLETTS, N.S. Identification and characterization of four new tracistrons on the *Escherichia coli* K12 sex factor F. *Plasmid*, 1: 316-323, 1978.
- 106 - MITSUHASHI, S.; HARADA, K. & HASHIMOTO, H. Multiple resistance of enteric bacteria and transmission of drug-resistance to other strain by mixed cultivation. *Japan. J. Exp. Med.*, 30: 179-184, 1960.
- 107 - MITSUHASHI, S. *Drug action and drug resistance in bacteria*. Vol.II, Tokyo, University Press, 1975.
- 108 - NAIDE, Y.; KAWAMURA, T.; MAKINO, K.; TAMURA, H. & WATANABE, T. Prevalence of transferable drug resistance in drug resistant bacteria isolated from urinary tract infection in Japan. *Japan. J. Microbiol.*, 11: 87-94, 1967.
- 109 - NAKAYA, R.; NAKAMURA, A. & MURATA, Y. Resistance transfer agents in *Shigella*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 3: 654-663, 1960.
- 110 - NISHIMURA, Y.; ISHIBASHI, M.; MEYNELL, E. & HIROTA, Y. Specific piliation directed by a fertility factor and a resistance factor of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, 49: 89-98, 1967.
- 111 - NISIOKA, T.; MITANI, M. & CLOWES, R.C. Composite circular forms of R-factor deoxyribonucleic acid molecules. *J. Bacteriol.*, 98: 376-385, 1969.
- 112 - NOVICK, R.P.; CLOWES, R.C.; COHEN, S.N.; CURTISS III, R.; DATTA, N. & FALKOW, S. Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol. Rev.*, 40: 168-189, 1976.

- 113 - ODAMURA, Y.; TANAKA, T. & MITSUHASHI, S. Drug resistance and distribution of R factors among *Proteus* strains. *Japan. J. Microbiol.*, 15: 367-372, 1971.
- 114 - OLSEN, R.H. Evolution of pseudomonas R-plasmids: consequence of Tn1 insertion and resultant partial diploidy to chromosome and Tra<sup>-</sup> R-plasmid mobilization. *J. Bacteriol.*, 133: 210-216, 1978.
- 115 - OHTSUBO, E. Transfer defective mutants of sex factors in *Escherichia coli*. II - Deletion mutants of an F-prime and deletion mapping of cistrons involved in genetic transfer. *Genetics*, 64: 189-197, 1970.
- 116 - OSHIAI, K.; YAMANAKA, T.; KIMURA, K. & SAWADA, O. Inheritance of drug resistance (and its transfer) between *Shigella* strains and between *Shigella* and *Escherichia coli* strains. *Nihon Iji Shimpo*, 1861: 34-41, 1959.
- 117 - OZAKI, M.S.; MIZUSHIMA, S. & NOMURA, M. Identification and functional characterization of the protein controlled by the streptomycin resistant locus in *Escherichia coli*. *Nature*, 222: 333-336, 1969.
- 118 - PERLMAN, D. & ROWND, R.H. Transition of R factor NR1 in *Proteus mirabilis*: molecular structure and replication of NR1 deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, 123: 1013-1034, 1975.
- 119 - PERLMAN, D. & ROWND, R.H. Two origins of replication in composite R plasmid DNA. *Nature*, 259: 281-284, 1976.
- 120 - PERLMAN, D. & STICKGOLD, R. Selective amplification of genes on the R plasmid NR1 in *Proteus mirabilis*: an example of the induction of selective gene amplification. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74: 2518-2522, 1977.
- 121 - PERLMAN, D. Frequency of replication from alternative origins in the composite R plasmid NR1. *J. Bacteriol.*, 129: 729-736, 1978.
- 122 - POLLOCK, M.R. Drug resistance and mechanism for its development. *Brit. Med. Bull.*, 16: 16-22, 1960.
- 123 - PRITCHARD, R.H.; BARTH, P.T. & COLLINS, J. Control of DNA synthesis in bacteria. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, 19: 263-297, 1969.
- 124 - PTASHNE, K. & COHEN, S.N. Occurrence of insertion sequence (IS) regions on plasmid deoxyribonucleic acid as direct and inverted nucleotide sequence duplication. *J. Bacteriol.*, 122: 776-781, 1975.

- 125 - RENSBURGER, A.J. Genetic transformation in *Proteus mirabilis*. *J. Gen. Microbiol.*, 66: 215-229, 1971.
- 126 - RENSBURGER, A.J. Infection of spheroplasts with deoxyribonucleic acid from a *Proteus* bacteriophage. *J. Gen. Microbiol.*, 5: 437-441, 1969.
- 127 - RICHMOND, M.H. & SYKES, R.B. The chromosomal integration of a beta-lactamase gene derived from the P-type R-factor RPl in *Escherichia coli*. *Genet. Res. (Camb.)*, 20: 231-237, 1972.
- 128 - ROWND, R.; NAKAYA, R. & NAKAMURA, A. Molecular nature of the drug-resistance factors of the enterobacteriaceae. *J. Mol. Biol.*, 17: 376-392, 1966.
- 129 - ROWND, R. Replication of bacterial episome under relaxed control. *J. Mol. Biol.*, 44: 387-402, 1969.
- 130 - ROWND, R. & MICKEL, S. Dissociation and reassociation of RTF and r-determinants of the R-factor in *Proteus mirabilis*. *Nature New Biol.*, 234: 40-43, 1971.
- 131 - ROWND, R.; PERLMAN, D. & GOTO, N. Structure and replication of R-factor deoxyribonucleic acid in *Proteus mirabilis*. In: *Microbiology*. D. Schlessinger, American Society for Microbiology, Washington - D.C., pp.76-94, 1974.
- 132 - ROWND, R.H.; MIKI, T.; APPELBAUM, E.R.; MILLER, J. R.; FINKELSTEIN, M. & BARTON, C.R. Dissociation, amplification, and reassociation of composite R-plasmid DNA. In: *Microbiology*. D. Schlessinger, American Society for Microbiology, Washington - D.C., pp.33-37, 1978.
- 133 - SANTOS, D.S. Bases genético-moleculares do controle extracromossômico para produção de enterotoxina em *Escherichia coli*. Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1976.
- 134 - SANTOS, D.S.; PALCHADHURI, S. & MAAS, W.K. Genetic and physical characteristics of an enterotoxin plasmid. *J. Bacteriol.*, 124: 1240-1247, 1975.
- 135 - SCAIFE, J. & GROSS, J.D. Inhibition of multiplication of an FLac factor in Hfr cells of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 7: 403-407, 1962.
- 136 - SHARP, P.A.; COHEN, S.N. & DAVIDSON, N. Electron microscope heteroduplex studies of sequence relations among plasmids of *Escherichia coli*. II - Structure of drug resistance (R) factors and F factors. *J. Mol. Biol.*, 75: 235-255, 1973.

- 137 - SHERRIS, J.C. & MINSHEW, B.H. Mutational antibiotic resistance. In: *Antibiotics in Laboratore Medicine*. V. Lorian, Williams & Wilkins, Baltimore/London, pp.418-432, 1980.
- 138 - SMITH, D.H. & ARMOUR, S.E. Transferable R factors in enteric bacteria causing infection of the genito urinary tract. *Lancet*, II: 15-18, 1966.
- 139 - SMITH, H.R.; GRINDLEY, N.D.F.; HUMPHREYS, G.O. & ANDERSON, E.S. Interaction of group H resistance factors with the F factor. *J. Bacteriol.*, 115: 623-628, 1973.
- 140 - SMITH, H.R.; HUMPHREYS, G.O. & ANDERSON, E.S. Genetic and molecular characterization of some non transferring plasmids. *Molec. Gen. Genet.*, 129: 229-242, 1974.
- 141 - STARLINGER, P. & SAEDLER, H. Insertion mutations in microrganisms. *Biochemie*, 54: 177-185, 1972.
- 142 - STARLINGER, P. & SAEDLER, H. IS-elements in microrganisms. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.*, 75: 111-152, 1976.
- 143 - STEERS, E.; FOLTZ, E.L. & GRAVES, B.S. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot. Chemother.*, 9: 307-311, 1959.
- 144 - SZYBALSKI, W. & BRYSON, V. Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. I - Cross resistance to fifteen antibiotics. *J. Bacteriol.*, 64: 489-499, 1952.
- 145 - TANAKA, I.I. Características genético-moleculares de plasmídios enterotoxigênicos de amostras humanas de *Escherichia coli*. Tese de Mestrado, Escola Paulista de Medicina, 1981.
- 146 - TIMMIS, K.N. Mechanism of plasmid incompatibility. In: *Plasmids of Medical, environemntal and comercial importance*. K.N. Timmis & A. Pühler, Elsevier/North/Holland Biomedical Press, pp.13-21, 1979.
- 147 - TSUTAMURA, M. Further mutational studies on the PAS resistance of *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*. *J. Gen. Microbiol.*, 23: 203-208, 1960.
- 148 - VINOGRAD, J.; LEBOWITZ, J.; RADLOF, R.; WATSON, R. & LAPIS, P. The twisted circular form of polyoma viral DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 53: 1104-1111, 1965.
- 149 - WANG, J.C.; BAUNGARTEN, D. & OLIVERA, B. On the origin of the tertiary turns in covalently closed double-stranded cyclic DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 58: 1852-1858, 1967.

- 150 - WANG, J.C. Degree of superhelicity of covalently closed cyclic DNA's from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 43: 263-272, 1969.
- 151 - WARING, M.J. Structural requirements for the binding of ethidium bromide to nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta*, 114: 234-244, 1966.
- 152 - WARING, M.J. Drugs which affect the structure and function of DNA. *Nature* (London), 219: 1320-1325, 1968.
- 153 - WATANABE, T. & FUKASAWA, T. Episome-mediated transfer of drug resistance in enterobacteriaceae. I - Transfer of resistance factors by conjugation. *J. Bacteriol.*, 81: 669-683, 1961.
- 154 - WATANABE, T. & TAKANO, T. Conversion of male bacteria of *Escherichia coli* K12 to resistance to F phages by infection with an episome "resistance transfer factors". *Virology*, 17: 217-219, 1962.
- 155 - WATANABE, T. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 27: 87-112, 1963.
- 156 - WATANABE, T.; NISHIDA, H.; OGATA, C.; ARAI, T. & SATA, S. Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. VII - Two types of naturally occurring R factors. *J. Bacteriol.*, 88: 716-726, 1964.
- 157 - WATANABE, T. & OGATA, Y. Genetic stability of various resistance factors in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 102: 363-368, 1970.
- 158 - WILLETTS, N.S.; MAULE, J. & McINTIRE, S. The genetic location of *tra* O, *fin* P and *tra*-4 on the *E. coli* K12 sex factor F. *Genet. Res.* (Camb.), 26:255-263, 1976.
- 159 - WILLETTS, N.S. & FINNEGAN, D.J. Characterization of *Escherichia coli* K12 strains carrying both an F-prime and an R factor. *Genet. Res.*, 16: 113-122, 1970.
- 160 - WILLETTS, N.S. The plasmid-specificity of two proteins required for conjugation in *Escherichia coli*. *Nature New Biology*, 230: 183-185, 1971.
- 161 - WILLETTS, N.S. & McINTIRE, S. Isolation and characterization of  $\lambda$  *tra* transducing phages from EDLF223 (Flac *tra*B:: ed  $\lambda$  4). *J. Mol. Biol.*, 126: 525-549, 1978.

- 162 - WILLISHAW, G.A.; SMITH, H.R. & ANDERSON, E.S.  
Molecular studies of F<sub>1</sub>me resistance plasmids,  
particularly in epidemic *Salmonella typhimurium*.  
*Molec. Gen. Genet.*, 159: 111-116, 1978.
- 163 - WOHLHIETER, J.A.; GEMSKI, P. & BARON, L.S. Transfer  
of extensive portions of the *Escherichia coli* genome  
to *Proteus mirabilis*. *Bact. Proc.*, 15: 67-69, 1968.
- 164 - ZINDER, N.D. & LEDERBERG, J. Genetic exchange in  
*Salmonella*. *J. Bacteriol.*, 64: 679-699, 1952.