

ATIVIDADES CITOTÓXICA E HEMOLÍTICA EM *ESCHERICHIA COLI* UROPATOGÊNICAS

JOÃO RAMOS COSTA ANDRADE & ÍTALO SUASSUNA

Serviço de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas, UERJ,
Rua Prof. Manuel de Abreu, 48, 20550 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Citotoxic and hemolytic activities of uropathogenic *Escherichia coli* – *Fifty nine Escherichia coli strains obtained from patients with upper or lower urinary tract infections (UTI) and 30 E. coli strains isolated from stools of healthy individuals were tested for hemolytic and cytotoxic activities. Forty four percent of uropathogenic E. coli (UPEC) and 3.3% of fecal E. coli were hemolytic. Among the hemolytic UPEC, 92% produced α -hemolysin. A cytotoxic activity was detected in culture filtrates of 71% of UPEC strains and 30% of fecal E. coli. No relationship was found between cytotoxic and hemolytic activities or between cytotoxic titers and UPEC origin (upper or lower UTI). E. coli cytotoxin has a cytocidal activity against some epithelioid cultured cell lines (Vero, HeLa and Hep-2) but was almost inactive for avian-fibroblast cells. Cytotoxin-affected cells appeared rounded, refractile and detached from the surface of the vessel. Some characteristics exhibited by the cytotoxin as the morphological response induced on cells, the increasing of cytopathic effect with time, its irreversible cytocidal activity and its heat-lability resemble the properties described for E. coli Verotoxin (VT). Adherence to uroepithelial cells is recognized as a virulence factor for UPEC. It is suggested that cell damage by cytotoxic and adhering UPEC might contribute to E. coli virulence to urinary tract.*

Key words: *Escherichia coli* – urinary infections – cytotoxins – hemolysins – uropathogenicity

As infecções urinárias (I.U.) são das mais comuns dentre as infecções bacterianas que acometem os seres humanos. Das meninas em idade escolar, 5 a 6% sofrem ao menos um episódio de I.U. entre os 5 e os 18 anos (Kunin, 1979; Rubin et al., 1986) enquanto 10 a 15% das mulheres com 60 anos apresentam bacteriúria (Rubin et al., 1986).

A *Escherichia coli* associa-se a cerca de 90% das I.U. que ocorrem na comunidade e a 50% daquelas adquiridas no hospital (Kunin, 1979; Rubin et al., 1986). Admite-se que certas estirpes de *E. coli* seriam dotadas de propriedades que as tornariam aptas a colonizar e agredir o trato urinário humano, sendo por isto denominadas *E. coli* uropatogênicas (ECUP) (Rubin et al., 1986; Karmali, 1987).

Dentre estas propriedades, têm sido valorizadas tanto a aderência ao uroepitélio (Svanborg-Edén et al., 1982) quanto a síntese de hemolisinas, em particular da hemolisina solúvel ou α -hemolisina (Linggood & Ingram, 1980; van den Bosch et al., 1981; Waalwijk et al.,

1983; Cavalieri et al., 1984; Welch & Falkow, 1984), cuja produção é estimulada em meios líquidos suplementados com infuso de carne. Outra hemolisina, denominada β -hemolisina, associa-se à célula bacteriana propriamente dita, não sendo liberada nos meios de cultivo.

É discutido o papel patogênico da α -hemolisina. Alguns admitem que facilitaria a obtenção de Fe^{+++} pelas bactérias às custas da lise de hemácias do hospedeiro (Linggood & Ingram, 1980; Wallwijk et al., 1983), enquanto outros referem ação antifagocitária (Gadberg et al., 1983; Cavalieri et al., 1984) ou ação citotóxica para fibroblastos de cultivo primário (Chatuverdi et al., 1969), linhagens estabelecidas de fibroblastos (Cavalieri et al., 1984) e granulócitos e linfócitos humanos e de animais (Gadberg et al., 1983; Cavalieri et al., 1984; Gadberg & Orskov, 1984).

Em estudos preliminares detectamos uma dissociação entre atividade citotóxica e produção de hemolisinas em *E. coli* (Andrade, J. R. C. & Carneiro da Silva, A. Q., 1983, dados não publicados). Na presente investigação estudamos algumas características das hemolisinas e citotoxinas produzidas por ECUP e por *E. coli* de origem fecal.

Trabalho realizado com o apoio da FINEP (4.3.85.0310.00) e do CNPq (40.2597/85 CL).

Recebido em 29 de setembro de 1987.

Aceito em 24 de março de 1988.

MATERIAL E MÉTODOS

Microorganismos – Estudamos 59 *E. coli* isoladas de urinoculturas ($> 10^5$ UFC/ml) de pacientes atendidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto (UERJ), cada amostra sendo obtida de um paciente diverso. As amostras foram identificadas por testes bioquímicos convencionais e congeladas a -25°C , em caldo GC (Difco) com glicerol a 20% (v/v). Também estudamos 30 *E. coli* provenientes das fezes de igual número de indivíduos sem história atual ou progressiva de I.U. e sem evidências de distúrbio intestinal na oportunidade do estudo.

Origem das amostras – Os diagnósticos de pielonifrite e cistite aguda foram feitos com base em critérios clínicos e laboratoriais. Sinais e sintomas como dor lombar, febre acima de 38°C , calafrios, punho-percussão lombar dolorosa, náusea e vômitos ou testes laboratoriais indicando envolvimento renal (redução da filtração renal, alterações radiológicas renais, cilindros granulosos no sedimento urinário, leucocitose e elevação das taxas de hemossedimentação) indicavam pielonefrite. Nas I.U. baixas, consideramos a ocorrência de frequência urinária, disúria e dor suprapúbica.

Cultivos celulares – Utilizamos as linhagens Vero (CCL 81) e em alguns testes, HeLa (CCL 2), Hep-2 (CCL 23) e cultivos primários de fibroblastos de embrião de galinha (FP), preparados de acordo com procedimentos padronizados (Departamento de Virologia da UFRJ, 1984). Utilizamos o meio mínimo essencial de Eagle (Eagle-MEM, GIBCO) com 10% de soro de vitelo inativado (Instituto Adolfo Lutz) e antibióticos (gentamicina, $50\mu\text{g/ml}$; anfotericina B, $2,5\mu\text{g/ml}$). As células foram cultivadas a 37°C em tubos de vidro incubados em posição inclinada, para obtermos tapetes recobrimo uma das paredes. Estes eram utilizados logo que atingiam a confluência.

Pesquisa de hemólise em meio sólido – Utilizamos o agar nutriente-cálcio (ANC) (Bamforth & Dudgeon, 1952), com 0,01% (p/v) de carbonato de cálcio (Mast) e 2,5% (v/v) de concentrado de hemácias humanas (grupo AB), lavadas três vezes em salina isotônica esterilizada (NaCl 0,85% p/v) para retirada de anticorpos anti-hemolíticos (Smith, 1963). As amostras foram semeadas em ANC e após 24h a 37°C observamos a ocorrência de hemólise. Amostras negativas

eram reincubadas por 24h sendo testadas pelo menos duas vezes.

Hemolisina solúvel (α -hemolisina) – Empregamos o caldo infuso alcalino-cálcio (CIAC) (Smith, 1963). As amostras foram semeadas e incubadas por 6h a 37°C , sem agitação. Após centrifugação (10.000 xg) a 4°C , os sobrenadantes límpidos eram recolhidos filtrados em membranas Millipore ($0,45\mu\text{m}$) e testados quanto à esterilidade e à presença de α -hemolisina.

Caracterização das hemolisinas – Adotamos os procedimentos descritos por Smith (1963), empregando hemácias humanas ajustadas a 0,5% (v/v) em salina-cálcio (NaCl 0,85%, CaCl_2 0,3%; p/v). Os filtrados esterilizados, aquecidos (56°C , 60 min) ou não aquecidos eram diluídos (razão dois) em salina isotônica, acrescentando-se volume idêntico da suspensão de hemácias em salina-cálcio. Após incubação por 2h a 37°C consideramos como título de α -hemolisina a recíproca da maior diluição do filtrado que causava hemólise total. O aquecimento determina a completa inativação da α -hemolisina e a negatização do teste (Smith, 1963; Cavalieri, et al., 1984).

Para identificarmos amostras produtoras de β -hemolisina (ou de ambas as hemolisinas) utilizamos o teste de imunoneutralização da α -hemolisina, em meio sólido, com anti-soro específico (Smith, 1963).

Produção de citotoxinas – Utilizamos "Trypticase Soy Broth" (TSB; BBL) distribuído em camada fina (2 mm) em garrafas tipo "milk-dilution" (Corning). Após 24h a 37°C os cultivos eram centrifugados e filtrados como descrito anteriormente. Em alguns ensaios empregamos filtrados das *E. coli* H30 (produtora de Verotoxina-VT) e *E. coli* H10407 (produtora de enterotoxina termolábil-LT). Estas amostras nos foram cedidas respectivamente por J. Konowalchuck (Bureau of Microbial Hazards, Ottawa) e A. F. Pestana de Castro (UNICAMP, São Paulo).

Teste de citotoxicidade – Os filtrados foram diluídos (1:4, 1:6 e 1:8) em salina tampão fosfato segundo Dulbecco, pH 7,2 (STF-D) e volumes de cada diluição (2 ml) foram colocados sobre tapetes celulares. Após 20 h a 37°C , os tapetes eram observados em microscópio invertido, sendo considerado como título citotóxico a recíproca da maior diluição do filtrado que cau-

sava alterações morfológicas em $\geq 50\%$ das células observadas. Como controles, utilizamos filtrados de ECUP previamente caracterizadas como positiva (UTI 4) e negativa (UTI 1) para citotoxina.

RESULTADOS

Atividade hemolítica em ECUP – ECUP e *E. coli* fecais apresentam freqüências de hemólise de respectivamente 44% e 3,3%. Não ocorreram diferenças significativas na atividade hemolítica entre ECUP originárias de infecções altas ou baixas (Tabela I). A α -hemolisina é a principal hemolisina de ECUP e seus títulos não se correlacionam com o sítio de origem da infecção.

Atividade citotóxica em ECUP – Verificamos que o meio empregado para a produção de α -hemolisina (CIAC) causava a degeneração inespecífica dos tapetes celulares. Contudo, o emprego do TSB foi satisfatório, permitindo vigoroso crescimento bacteriano e não induzindo degeneração celular. Resultados preliminares recomendaram a utilização de um único lote de meio (n^o 104) para todos os ensaios. Cultivos estacionários de 6h ou 24h não mostraram diferenças quanto aos títulos de citotoxina.

Ensaio preliminares com 30 *E. coli*, testadas com células Vero e FP mostraram que apenas 25% das amostras citotóxicas para células Vero mostravam efeitos em FP, sugerindo a inadequação destas últimas células para a detecção da citotoxina (dados não tabulados).

Na Tabela II, verificamos que as ECUP apresentam freqüência de atividade citotóxica significativamente maior ($p < 0,01$) do que *E. coli* de origem fecal. Não detectamos correlação significativa entre origem da ECUP e produção ou título de citotoxina.

Na Tabela III, mostramos não haver relação entre atividade citotóxica e produção de hemolisinas. Cerca de 52% de 42 ECUP citotóxicas não causam hemólise ao passo que 66% de 33 ECUP não hemolíticas produzem citotoxina.

Propriedades da citotoxina de ECUP – A exposição de células Vero a filtrados citotóxicos determina marcantes alterações na morfologia celular, com aumento da sua refringência, retração do citoplasma e afilamento da célula, que passa a apresentar aspecto estrelado. Posteriormente, ocorre arredondamento celular e desprendimento das paredes do tubo. As mesmas alterações foram verificadas, com menor intensidade, para as linhagens HeLa e Hep-2. Na Figura mostramos células Vero tratadas por citotoxina e coradas pelo Giemsa, verificando-se hipercromasia citoplasmática, condensação nuclear e intensa vacuolização.

O emprego de Eagle MEM com 1% de soro, em lugar de STF-D, permitiu estender por até cinco dias o prazo de observação dos tapetes celulares, evidenciando uma elevação progressiva nos títulos citotóxicos até 72h de incubação. A partir daí e até o quinto dia os títulos não mais se alteram.

TABELA I

Produção de hemolisinas por ECUP e por amostras de *Escherichia coli* de origem fecal

<i>E. coli</i>			Produção de hemolisinas*							
Origem	N ^o	(%)	α -hemolisina		α, β -hemolisinas		β -hemolisina		não hemolíticas	
			N ^o	(%)	N ^o	(%)	N ^o	(%)	N ^o	(%)
Infecções urinárias	altas	23	11	(47,8)	1	(4,3)	0		11	(47,8)
	baixas	36	11	(30,5)	1	(2,7)	2	(5,5)	22	(61,1)
	Totais	59	22	(37,2)	2	(3,3)	2	(3,3)	33	(55,9)
Fecal	30	(100,0)	0		0		1	(3,3)	29	(96,6)

* Definidas pela hemólise em meios sólidos e líquidos, termolabilidade e inibição por antisoro específico (ver Material e Métodos).

Significância estatística (χ^2): diferenças não significativas entre os grupos de infecções urinárias.

TABELA II

Atividade citotóxica para células Vero em ECUP e em amostras de *Escherichia coli* de origem fecal

	<i>E. coli</i>		Atividade Citotóxica				
	Origem	Nº	(%)	Nº	Presente (%)	Nº	Ausente (%)
Infecções urinárias	altas	23	(100,0)	18	(78,2)	5	(21,7)
	baixas	36	(100,0)	24	(66,6)	14	(33,3)
	Totais	59	(100,0)	42	(71,1)	17	(28,8)
Fecal		30	(100,0)	9	(30)	21	(70)

Significância estatística (χ^2): diferenças entre amostras urinárias e fecais significativas ao nível de $P < 0,01$; demais diferenças, não significativas.

TABELA III

Produção de citotoxina e hemolisinas em ECUP

Atividade citotóxica	ECUP		Produção de hemolisinas							
	Nº	(%)	α -hemolisina		α, β -hemolisinas		β -hemolisina		não hemolíticas	
			Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)
Positiva	42	(100,0)	17	(40,4)	2	(4,7)	1	(2,3)	22	(52,3)
Negativa	17	(100,0)	5	(29,4)	0		1	(5,8)	11	(64,7)
Totais	59	(100,0)	22	(37,2)	2	(3,3)	2	(3,3)	33	(55,9)

Significância estatística (χ^2): diferenças não significativas.

Verificamos que a atividade citotóxica é acentuadamente inibida pelo uso de meio com 10% de soro. Com base nesta propriedade, procuramos avaliar se as lesões celulares induzidas pela citotoxina de ECUP eram reversíveis, utilizando como controles as toxinas VT (citocida) e LT (citotônica). Constatamos que a citotoxina tem ação citocida, causando danos celulares irreversíveis que procedem o surgimento das alterações morfológicas. Tapetes tratados com citotoxina por até 15 min não apresentam alterações celulares.

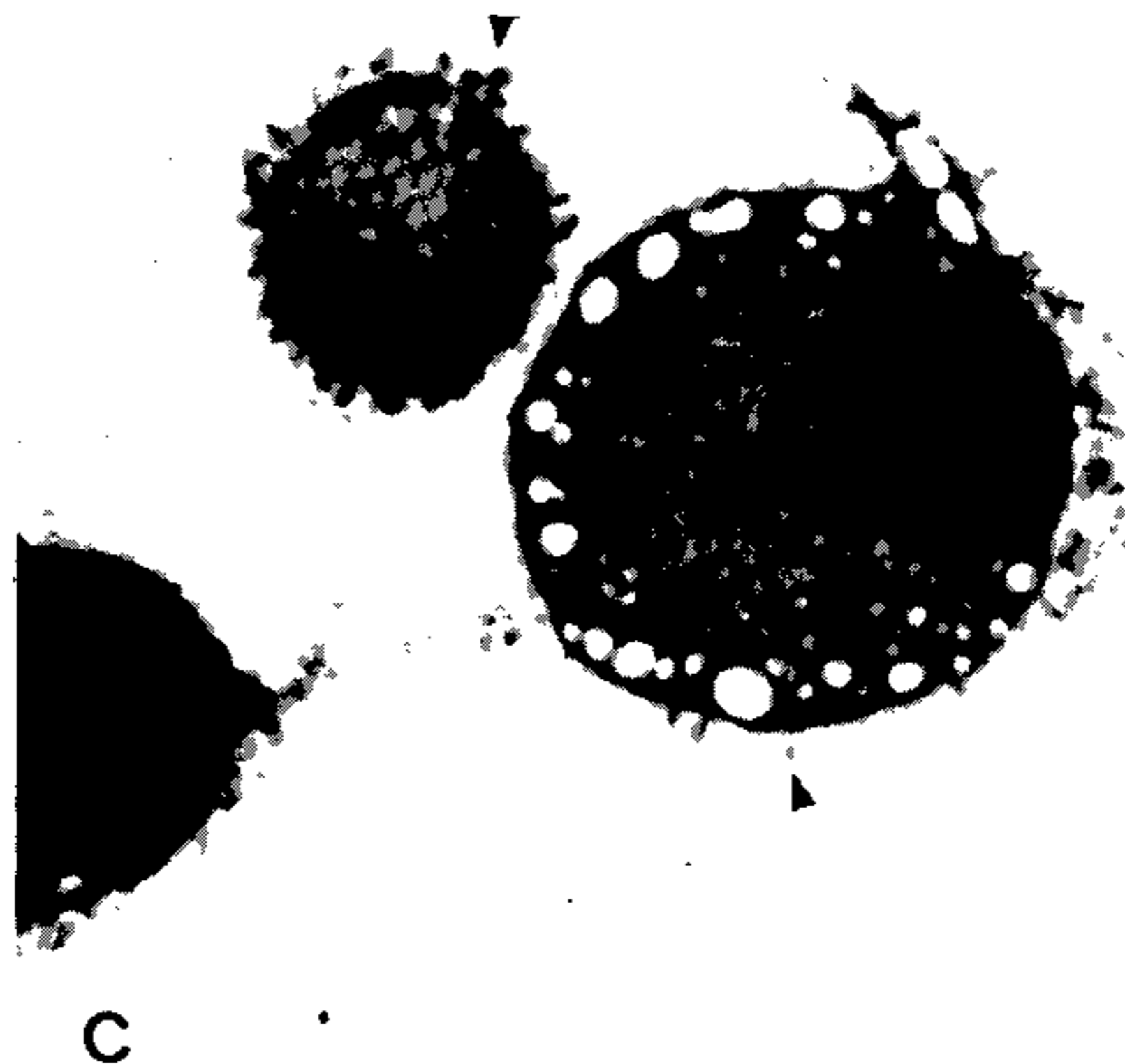
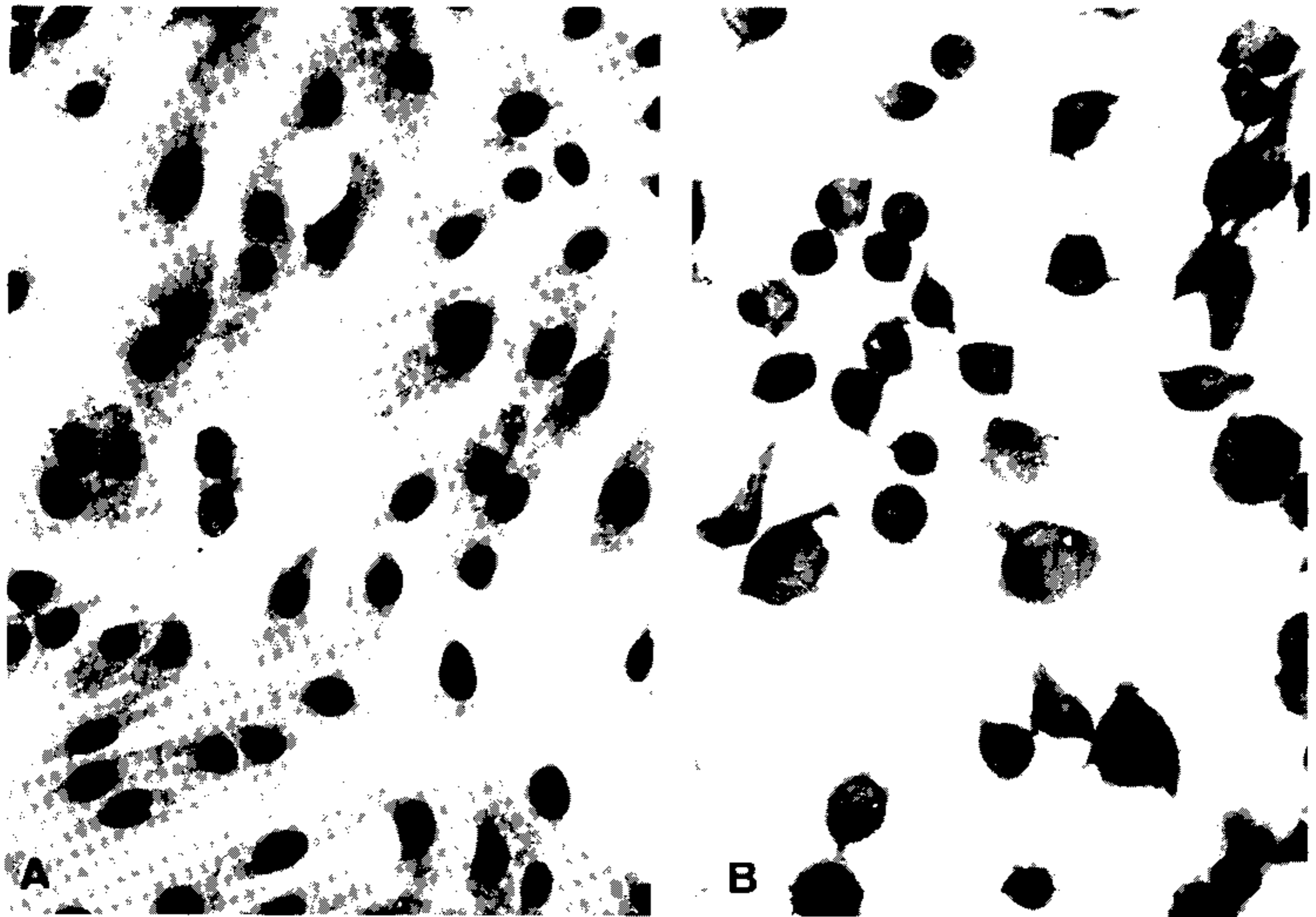
A termolabilidade da citotoxina foi testada pela exposição de filtrados de seis ECUP e da *E. coli* H30 às temperaturas de 56°C (60 min), 65°C (30 min) e 100°C (15 min). Verificamos inativação total da citotoxina e da VT nos filtrados aquecidos a 100°C e inativação parcial a 65°C (50% – 80%) e a 56°C (25% – 50%).

O efeito da endotoxina sobre células Vero foi testada com várias concentrações (2, 10, 20, 40 e 100 μ g/ml) de LPS purificado de *E. coli* 026:B6 (Difco). Não ocorreram alterações mor-

fológicas semelhantes às verificadas com filtrados de ECUP citotóxicas.

DISCUSSÃO

As freqüências de atividade hemolítica encontradas aproximam-se daquelas relatadas por outros autores, que variam de 30% a 56% para ECUP (Dudgeon et al., 1921; McGeachie, 1966; Cooke, 1968; Minshew et al., 1978; Brooks et al., 1980) e de 5% a 18% para *E. coli* fecais (Dudgeon et al., 1921; Cooke & Ewins, 1975; Minshew et al., 1978; Brooks et al., 1980). Brooks et al. (1980) referem-se a uma maior produção de α -hemolisina por ECUP originárias de infecções altas. Na presente investigação, não encontramos associação entre intensidade de produção da α -hemolisina e sítio de infecção. Por outro lado, quanto aos tipos de hemolisina produzidos por ECUP nossos achados aproximam-se dos obtidos por Cooke & Ewins (1975), que relatam a ocorrência de α -hemolisina, β -hemolisina e ambas as hemolisinas em respectivamente 44%, 4% e 8% de 50 ECUP testadas.



Micrografias de monocamadas de células Vero incubadas por 12h com o filtrado de cultivos em TSB de ECUP não citotóxica (A) e ECUP citotóxica (B, C). Nota-se retração do citoplasma e picnose nas células mostradas em B. Arredondamento celular, condensação e lateralização do núcleo, intensa vacuolização e projeções da membrana citoplasmática (setas) são vistos em C. Coloração pelo Giemsa. A, B = 200X; C = 500X.

Dentre as propriedades atribuídas a α -hemolisina, tem sido referida a ação citotóxica para fibroblastos e leucócitos (Chatuverdi et al., 1969; Gadberg et al., 1983; Cavalieri et al., 1984; Gadberg & Orskov, 1984). Filtrados de cultivos de ECUP, testados em célula Vero, linhagem epitelóide originária de rim de macaco, mostram atividade citotóxica claramente dissociada da α -hemolisina. A citotoxina freqüentemente ocorre em amostras não hemolíticas e apresenta características de produção, degradação e atividade biológica distintas da α -hemolisina. A citotoxina, diversamente desta, não é inativada pelo cultivo em agitação contínua por 20-24h e não demonstrou especial afinidade para FP, embora atue eficientemente sobre células Vero e outras linhagens epitelíoides testadas, como HeLa e Hep-2 (dados não tabulados).

Algumas das propriedades da citotoxina, como sua termolabilidade e inibição por soro de vitelo, as alterações morfológicas induzidas nas células e sua atividade citocida irreversível, lembram aquelas atribuídas as Verotoxinas de *E. coli* (Konowalchuck, et al., 1977, 1978; Konowalchuck & Speirs, 1979; Karmali, 1987).

Em recente trabalho de revisão O'Brien & Holmes (1987) salientam existirem evidências a favor da ocorrência de distintos tipos antigênicos de VT (por eles denominada de "Shiga-like toxin" ou SLT), produzidas por *E. coli* de diferentes origens. Quanto ao papel patogênico das VT, ressaltam que a despeito da inexistência de comprovação direta, associam-se com diarreia, colite hemorrágica e síndrome urêmica hemorrágica, sem ligação aparente com I.U.

Não podemos afastar a possibilidade de serem fortuitas as semelhanças identificadas entre a citotoxina de ECUP e VT, apenas expressando similaridade nos seus mecanismos determinantes de lesão celular.

Admite-se que a uropatogenicidade das *E. coli* tenha natureza multifatorial (Brooks et al., 1980; Svanborg-Edén et al., 1982; Rubin et al., 1986). Dentre tais determinantes da virulência, tem sido atribuída à aderência bacteriana papel relevante na colonização das mucosas do trato urinário humano por ECUP (Svanborg-Edén et al., 1982; Rubin et al., 1986). Através de microscopia eletrônica, Roberts et al. (1985) demonstraram que ECUP piliadas formam microcolônias firmemente aderidas aos epitélios do

rim e ureter de macacos, modelo experimental bastante próximo à infecção urinária humana.

Em investigação anterior Andrade (1987) verificou que a maioria das ECUP estudadas expressam pili manose-resistente, pili tipo 1 ou ambas as adesinas (respectivamente 10%, 13,5% e 59,3%). No presente trabalho, constatamos que 71% destas ECUP produzem citotoxina capaz de matar certas linhagens celulares epitelíoides de origem humana e de macacos. É possível que a sua produção *in vivo* determine ação lesiva para os epitélios do trato urinário, especialmente quando secretada por microorganismos aderidos à superfície das mucosas.

RESUMO

Atividades citotóxica e hemolítica em *Escherichia coli* uropatogênica — Estudamos 59 *Escherichia coli* uropatogênicas (ECUP) obtidas de pacientes com infecção urinária e 30 *E. coli* originárias das fezes de indivíduos normais. Cada amostra originou-se de um paciente ou controle. Verificamos que 44% e 3,3% respectivamente eram hemolíticas em meio sólido segundo a origem. Apenas 15% das ECUP hemolíticas produziram α -hemolisina, isoladamente ou em associação com β -hemolisina. A α -hemolisina correspondeu a 92% das amostras com atividade hemolítica. Não encontramos correlação entre títulos de α -hemolisina e o sítio de origem das ECUP (infecção alta ou baixa). Em 71% das ECUP e 30% das *E. coli* fecais detectamos a produção de citotoxina com ação citocida para linhagens celulares epitelíoides como Vero, HeLa e Hep-2 e pouco ativa para fibroblastos de embrião de galinha. A produção desta citotoxina não apresenta correlação com a síntese de hemolisinas. Não verificamos associação entre títulos citotóxicos e origem das ECUP. Certas características biológicas desta citotoxina como a resposta morfológica que determina nas células, o aumento dos títulos citotóxicos com o tempo, sua atividade citocida irreversível e sua termolabilidade sugerem analogia com a Verotoxina (VT) de *E. coli*. As células afetadas pela citotoxina inicialmente mostram aspecto estrelado, tornam-se arredondadas e finalmente desprendem-se do seu suporte. É sugerido que a produção de citotoxina por *E. coli* aderidas às mucosas do trato urinário possa contribuir para a agressão ao uroepitélio.

Palavras-chave: *Escherichia coli* — infecções urinárias — citotoxinas — hemolisinas — uropatogenicidade

AGRADECIMENTOS

A Srt^a Maria Angélica Pereira da Silva, do Laboratório de Cultura de Células do SMI-UERJ, pela inestimável colaboração na execução dos testes de citotoxicidade.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, J. R. C., 1987. *Significação dos mecanismos de aderência na virulência de Escherichia coli uropatogênicas e enteropatogênicas clássicas*. Tese de Doutorado, UFRJ, Rio de Janeiro.
- BAMFORTH, J. & DUDGEON, J. A., 1952. The haemolytic activity of *Bacterium coli*. *J. Path. Bact.*, 64: 751-761.
- BROOKS, H. J. L.; O'GRADY, F.; McSHERRY, M. A. & CATTELL, W. R., 1980. Uropathogenic properties of *Escherichia coli* in recurrent urinary-tract infections. *J. Med. Microbiol.*, 13: 57-68.
- CAVALIERI, S. J.; BOHACH, G. A. & SNYDER, I. S., 1984. *Escherichia coli*-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol. Rev.*, 48: 326-343.
- CHATUVERDI, U. C.; MATHUR, A.; KHAN, A. M. & MEHROTRA, R. M. L., 1969. Cytotoxicity of filtrates of haemolytic *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.*, 2: 211-218.
- COOKE, E. M., 1968. Properties of strains of *Escherichia coli* isolated from the faces of patients with ulcerative colitis, patients with acute diarrhoea and normal persons. *J. Path. Bact.*, 95: 101-113.
- COOKE, E. M. & EWINS, S. P., 1975. Properties of strains of *Escherichia coli* isolated from a variety of sources. *J. Med. Microbiol.*, 8: 107-111.
- DEPARTAMENTO DE VIROLOGIA, 1984. Preparo de fibroblasto de embrião de galinha. Instituto de Microbiologia, UFRJ, Rio de Janeiro.
- DUDGEON, L. S.; WORDLEY, E. & BAWTREE, F., 1921. On *Bacillus coli* infections of the urinary tract, especially in relation to haemolytic organisms. *J. Hyg. (Camb)*, 20: 137-164.
- GADBERG, O. V. & ORSKOV, I., 1984. In vitro cytotoxic effect of hemolytic *Escherichia coli* on human blood granulocytes. *Infect. Immun.*, 45: 255-260.
- GADBERG, O. V.† ORSKOV, I. & RHODES, J. M., 1983. Cytotoxic effect of an alpha-hemolytic *Escherichia coli* strain on human blood monocytes and granulocytes in vitro. *Infect. Immun.*, 41: 358-364.
- KARMALI, M. A., 1987. Laboratory diagnosis of Verotoxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Newsletter*, 9: 65-69.
- KONOWALCHUCK, J.; DICKIE, N.; STAVRIC, S. & SPEIRS, J. I., 1978. Properties of an *Escherichia coli* cytotoxin. *Infect. Immun.*, 20: 575-577.
- KONOWALCHUCK, J. & SPEIRS, J. I., 1979. Response of various cell lines to *Escherichia coli* toxic products. *Can. J. Microbiol.*, 25: 335-339.
- KONOWALCHUCK, J.; SPEIRS, J. I. & STAVRIC, S., 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 18: 775-779.
- KUNIN, C. M., 1979. Detection, prevention and management of urinary tract infections. 3rd. ed. Lea and Febiger, Philadelphia.
- LINGGOOD, M. A. & INGRAM, P. L., 1980. The role of alpha haemolysin in the virulence of *Escherichia coli* for mice. *J. Med. Microbiol.*, 15: 23-30.
- McGEACHIE, J., 1966. Hemolysis by urinary *Escherichia coli*. *Am. J. Clin. Path.*, 45: 222-224.
- MINSHEW, B. H.; JORGENSEN, J.; COUNTS, G. W. & FALKOW, S., 1978. Association of hemolysin production, hemagglutination of human erythrocytes, and virulence for chicken embryos of extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Infect. Immun.*, 20: 50-54.
- O'BRIEN, A. D. & HOLMES, R. K., 1987. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.*, 51: 206-220.
- ROBERTS, J. A.; SUAREZ, G. M.; KAACK, B.; KALLENIUS, G. & SVENSON, S. B., 1985. Experimental pyelonephritis in the monkey. VII. Ascending pyelonephritis in the absence of vesicoureteral reflux. *J. Urol.*, 133: 1068-1075.
- RUBIN, R. H.; TOLKOFF-RUBIN, N. E. & COTRAN, R. S., 1986. Urinary tract infection, pyelonephritis, and reflux nephropathy. In B. M. Brenner & F. B., Rector Jr. The Kidney, 3rd. ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia.
- SMITH, H. W., 1963. The haemolysins of *Escherichia coli*. *J. Path. Bact.*, 85: 197-211.
- SVANBORG-EDÉN, C.; FASTH, A.; HADBERG, L.; HANSON, L. A.; KORHONEN, T. & LEFFLER, H., 1982. Host interaction with *Escherichia coli* in the urinary tract. In J. B. Robbins, J. C. Hill & J. C. Sadoff., *Bacterial vaccines. Seminars in infectious diseases* vol. IV. Thieme-Stratton Inc., New York.
- van den BOSCH, J. F.; POSTMA, P.; de GRAAF, J. & MacLAREN, D. M., 1981. Haemolysis by urinary *Escherichia coli* and virulence in mice. *J. Med. Microbiol.*, 14: 321-331.
- WAALWIJK, C.; MacLAREN, D. M. & de GRAAF, J., 1983. In vivo function of hemolysin in the nephropathogenicity of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 42: 245-249.
- WELCH, R. A. & FALKOW, S., 1984. Characterization of *Escherichia coli* hemolysins conferring quantitative differences in virulence. *Infect. Immun.*, 43: 156-160.