Claudia de Oliveira Ayala

Sorologia de antígenos flagelares de amostras
de *Escherichia coli* Enteropatogênicas (EPEC) e *E. coli*
produtoras da Toxina de Shiga (STEC) isoladas
de diferentes animais e análise comparativa
do gene *fliC* por PCR-RFLP

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências Biológicas.

São Paulo

2009

Claudia de Oliveira Ayala

Sorologia de antígenos flagelares de amostras de *Escherichia coli* Enteropatogênicas (EPEC) e *E. coli* produtoras da Toxina de Shiga (STEC) isoladas de diferentes animais e análise comparativa do gene *fliC* por PCR-RFLP

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de atuação: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro

São Paulo

2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Ayala, Claudia de Oliveira.

Sorologia de antígenos flagelares de amostras de *Escherichia coli* Enteropatogênicas (EPEC) e *E. coli* produtoras da toxina de Shiga (STEC) isoladas de diferentes animais e análise comparativa do gene *fliC* por PCR-RFLP / Claudia de Oliveira Ayala. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Antonio Fernando Pestana de Castro.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Bacteriologia médica e veterinária.

Versão do título para o inglês: Serology of flagellar antigens from strains of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) isolated from different animals and comparative analysis of the *fliC* gene by PCR-RFLP.

Descritores: 1. *Escherichia coli* 2. Reação em Cadeia por Polimerase (PCR) 3. Flagelina 4. *FliC* 5. RFLP I. Pestana de Castro, Antonio Fernando II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0146/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Claudia de Oliveira Ayala.

Título da Tese: Sorologia de antígenos flagelares de amostras de *Escherichia coli* Enteropatogênicas (EPEC) e *E. coli* produtoras da toxina de Shiga (STEC) isoladas de diferentes animais e análise comparativa do gene *fliC* por PCR-RFLP.

Orientador(a): Antonio Fernando Pestana de Castro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a)

( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Dedico essa Tese à minha mãe Luci, meu pai Vicente, e meus irmãos Euclides e
Leonardo: obrigada por me ajudarem a chegar até aqui.
Dedico também ao meu marido Fernando: seu amor e apoio incondicionais durante
esta caminhada me ensinaram a acreditar em meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar vida, oportunidades e me prover dos recursos necessários para viver todos os dias;

Agradeço ao Professor Pestana, por ter me aceito como sua orientada no programa de Pós-Graduação e pelos ensinamentos transmitidos;

Aos Professores Rita de Cássia, Waldir Elias, Aloysio Cerqueira, Antonio Carlos Pignatari e Beatriz Guth por suas sugestões e correções em minha qualificação;

À Ylanna Kelner Burgos, minha “amiga-irmã”, por todas as horas de aprendizado e diversão dentro e fora do laboratório. Obrigada por acreditar em mim e fazer parte de minha vida;

À minha amiga Lika, por todos os momentos divertidos e as dificuldades que enfrentamos juntas no laboratório;

Aos meus amigos Priscilla, Monika e Haroldo, que estão sempre ao meu lado, independente da distância;

Às meninas que já passaram pelo laboratório: Eliana e Luciana, pela boa companhia durante muitas horas de pesquisa;

À FAPESP, pelo apoio financeiro concedido durante os cinco anos de pesquisa;

À Alice, por toda a sua ajuda acadêmica e sábios conselhos durante os 5 anos: muito obrigada;

Às meninas da secretaria do ICB II, Aninha e Naíde, por terem me auxiliado em todos os momentos que precisei;

À equipe da Biblioteca: Maria José e Eva, pela ajuda na fase de conclusão da tese;

A todos que de uma forma ou outra contribuíram para que eu concluísse meu trabalho: muito obrigada!

RESUMO

AYALA, C.O. **Sorologia de antígenos flagelares de amostras de *Escherichia coli* Enteropatogênicas (EPEC) e *E. coli* produtoras da Toxina de Shiga (STEC) isoladas de diferentes animais e análise comparativa do gene *fliC* por PCR-RFLP.** 2009. 62 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A espécie *Escherichia coli* constitui um grupo de bactérias tipicamente não patogênicas e que fazem parte do trato intestinal de humanos e animais. As amostras são sorotipadas com base em seus antígenos de superfície O (somático), H (flagelar) e K (capsular). O antígeno flagelar correspondente ao filamento é formado pela polimerização da flagelina, codificada pelo gene *fliC*. O presente trabalho empregou a técnica de PCR-RFLP para analisar os padrões de antígenos flagelares de 112 amostras de EPEC e STEC. Quatorze amostras não amplificaram o gene *fliC*, 17 tiveram seu antígeno flagelar determinado apenas por PCR-RFLP e 75 amostras tiveram seus antígenos flagelares confirmados por esta técnica. Três antígenos H com padrões irregulares foram clonados e sequenciados. Após o sequenciamento, inserções e remoções de nucleotídeos foram encontradas. Até o momento, poucos estudos utilizam um número abrangente de amostras de STEC e EPEC provenientes de diferentes animais para a determinação do antígeno H empregando a técnica de PCR-RFLP do gene *fliC*. De acordo com os resultados encontrados neste estudo, podemos concluir que a técnica de PCR-RFLP do gene *fliC* é mais rápida, menos trabalhosa e mais eficiente que a metodologia de sorotipagem clássica.

Palavras-Chave: *Escherichia coli*. Amostras animais. Antígeno flagelar. Gene *fliC*. Técnica de PCR-RFLP.

ABSTRACT

AYALA, C.O. **Serology of flagellar antigens from strains of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) isolated from different animals and comparative analysis of the *fliC* gene by PCR-RFLP.** 2009. 62 P. Thesis (Ph. D. Thesis in Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The *Escherichia coli* species consists of a group of typically non-pathogenic bacteria present in the intestinal tract of humans and animals. Strains are serotyped according to their O (somatic), H (flagellar) and K (capsular) surface antigens, in order to distinguish these microorganisms from the non-pathogenic members of the intestinal microbiota. The flagellar antigen corresponding to the filament is formed by the polymerization of the flagellin, codified by the *fliC* gene. This study employed the PCR-RFLP technique to analyze flagellar antigen patterns from 112 EPEC and STEC strains. Fourteen strains have not amplified the *fliC* gene, 17 had their flagellar antigen determined only by the PCR-RFLP and 75 strains had their flagellar antigen confirmed by this technique. Three H antigens with irregular patterns were cloned and sequenced. After sequencing, insertions and deletions of nucleotides were discovered. So far, few studies used a significant number of STEC and EPEC strains originated from different animals to determine H antigens employing the PCR-RFLP technique of the *fliC* gene. According to the findings of this study, we assumed that PCR-RFLP of the *fliC* gene is faster, less laborious and more efficient than classic serotyping methodology.

Keywords: *Escherichia coli*. Animal strains. Flagellar antigen. *fliC* gene. PCR-RFLP technique.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Reação de PCR para o gene <i>fliC</i> das amostras isoladas de ovinos	30
Figura 2- PCR do gene <i>fliC</i> de amostras isoladas de diferentes animais com antígeno flagelar imóvel	31
Figura 3- RFLP das amostras isoladas de ovinos	37
Figura 4- RFLP das amostras de cães, bovinos e coelhos	38
Figura 5- RFLP de amostras isoladas de diferentes animais que amplificaram o gene <i>fliC</i> , mas que apresentaram perfil anômalo após digestão com a enzima <i>Rsa</i> I	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Amostras padrão utilizadas	21
Tabela 2- Iniciadores, temperatura de anelamento da PCR e tamanho dos amplicons para os genes que codificam fatores de virulência	23
Tabela 3- Iniciadores utilizados para amplificar o gene <i>fliC</i> , temperatura de anelamento e tamanho do amplicon	24
Tabela 4- Amostras utilizadas no presente estudo, sorologia, resultados de PCR para os genes <i>eae</i> e <i>stx</i> e determinação do antígeno H por PCR-RFLP	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Material	20
3.1.1 Amostras estudadas	20
3.1.2 Amostras padrão para os fatores de virulência	20
3.2 Métodos	21
3.2.1 Obtenção do DNA genômico	21
3.2.2 Sorotipagem	22
3.2.3 Confirmação dos fatores de virulência	22
3.2.4 Amplificação do gene <i>fliC</i>	23
3.2.5 Testes de PCR-RFLP	24
3.2.6 Purificações dos produtos de PCR	25
3.2.7 Clonagem do gene <i>fliC</i>	25
3.2.8 Sequenciamento do gene <i>fliC</i>	26
4 RESULTADOS	28
4.1 Confirmação da presença dos genes <i>eae</i> e <i>stx</i>	28
4.2 Sorotipagem	29
4.3 PCR para <i>fliC</i>	29
4.4 Testes de RFLP	32
4.5 Clonagem e sequenciamento das amostras	40
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Escherichia coli* constitui um grupo heterogêneo de bactérias tipicamente não patogênicas e que fazem parte da microbiota do trato intestinal de humanos e animais (KAPER *et al.*, 2004). O processo de colonização intestinal inicia-se ao nascimento, quando bactérias presentes na microbiota materna e provenientes de fontes ambientais são adquiridas pelo recém-nascido. Uma vez estabelecido o processo de colonização, estes microrganismos convivem com seu hospedeiro provavelmente durante toda a vida, sendo a principal bactéria anaeróbia facultativa presente no intestino (GYLES, 1993).

Normalmente, a bactéria *E. coli* permanece confinada ao lúmen intestinal do hospedeiro. Entretanto, quando este se encontra debilitado ou imunossuprimido ou ainda quando as barreiras gastrointestinais são violadas, até mesmo cepas de *E. coli* não patogênicas podem causar infecção. Infecções no trato geniturinário, septicemias, meningites e diarréias são as síndromes clínicas mais comuns causadas por determinados clones de *E. coli* patogênicos (NATARO e KAPER, 1998).

As cepas de *E. coli* que provocam doenças são divididas em patotipos, baseados em seus fatores de virulência e mecanismos pelos quais podem ocasionar doença (KAPER *et al.*, 2004). Os patógenos intestinais são também conhecidos como *E. coli* Diarreiogênicas (DEC), divididas em seis categorias: *E. coli* Enteropatogênica (EPEC); *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* Enteroinvasora (EIEC); *E. coli* produtoras da Toxina de Shiga (STEC), das quais a *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC) constituem um subtipo; *E. coli* Enteroagregativa (EAEC); e *E. coli* que adere difusamente (DAEC) (NATARO e KAPER, 1998). Atualmente, as EPEC podem ser divididas em EPEC típicas (t-EPEC) e EPEC atípicas (a-EPEC) (TRABULSI *et al.*, 2002). Os patógenos extra-intestinais (EXPEC) incluem freqüentemente amostras associadas com infecções do trato urinário (UPEC), meningite neonatal (MAEC) e bacteremia (CAMPOS *et al.*, 2004).

A identificação dos fatores de virulência associados às doenças e a aplicação de métodos moleculares têm sido utilizados para determinar a relação genética e a estrutura clonal das amostras de DEC (MARTINEZ *et al.*, 1999). A análise clonal de amostras de DEC tem revelado que isolados clínicos e

epidemiológicos são compostos por grupos genéticos relacionados, compreendendo clones ou complexos clonais que possuem combinações específicas de fatores de virulência os quais correspondem a específicos mecanismos de patogenicidade (REGUA-MANGIA *et al.*, 2004).

EPEC são normalmente associadas com diarreia em crianças com até um ano de idade, mas tais bactérias não são comumente encontradas em pessoas saudáveis (NATARO e KAPER, 1998). As EPEC compreendem uma causa significativa de diarreia infantil em países em desenvolvimento, e têm sido associadas a uma alta taxa de mortalidade que varia de 10% a 40% (CHEN e FRANKEL, 2005). Surtos de EPEC em crianças ocorrem normalmente em enfermarias, e o homem é considerado o hospedeiro primário. Entretanto, animais como cães e bovinos também são portadores de amostras EPEC (NAKAZATO *et al.*, 2004; KRAUSE *et al.*, 2005; LEOMIL *et al.*, 2005; AIDAR-UGRINOVICH *et al.*, 2007).

O mecanismo central da sua patogenicidade está baseado na lesão chamada de “Attaching and Effacing” (A/E). Esta é caracterizada pela íntima aderência da bactéria ao epitélio intestinal, destruição das microvilosidades, polimerização da actina e outros elementos do citoesqueleto, tendo como consequência a formação de estruturas em formato de pedestal abaixo dos sítios de ligação bacteriana (TRABULSI *et al.*, 2002).

Clinicamente a doença provocada por EPEC é caracterizada por diarreia aguda, febre, mal-estar e vômito (LEVINE, 1987). Em infecções severas há uma destruição completa da superfície absorptiva do intestino, com atrofia das vilosidades e redução da mucosa. A observação da formação dessas lesões foi crucial para identificar a aderência bacteriana como um importante fator para a patogenia de EPEC (CHEN e FRANKEL, 2005).

Em 1979, Cravioto *et al.* descreveram que 80% das amostras de EPEC aderiam às células HEp-2 (carcinoma de laringe humana) com um tipo de adesão típica, enquanto outras *E. coli* não tinham uma adesão definida. Em 1984, Scaletsky *et al.* denominaram esta adesão típica que ocorria apenas em amostras de EPEC, de Adesão Localizada (AL). Baldini *et al.* (1983) descreveram a presença de um plasmídeo com 60 MDa, chamado de “EPEC Adherence Factor” (EAF), que seria o responsável pelo fenótipo da Adesão Localizada.

A aderência da bactéria à célula hospedeira é mediada por uma proteína externa à membrana bacteriana de 94Kda que recebe o nome de intimina. Jerse *et*

al. (1990) detectaram pela primeira vez o gene “*E. coli* attaching-and-effacing” (*eae*), que codifica a intimina. Estudos têm sido desenvolvidos para testar o papel da intimina na infecção. Em um estudo desenvolvido por Donnenberg *et al.* (1993), todos os voluntários que ingeriram amostras selvagens de EPEC apresentaram diarreia quando comparados a apenas quatro de 11 voluntários que ingeriram amostras mutantes sem o gene *eae*. Isto demonstrou que a intimina foi essencial para a virulência de EPEC. O receptor epitelial do hospedeiro para a intimina recebe o nome de Tir (translocated intimin receptor) e também é codificado por uma Ilha de Patogenicidade (PAI) denominada de Locus of Enterocyte Effacement (LEE) (ROSENSHINE *et al.*, 1996).

As t-EPEC também produzem um pilus tipo IV, conhecido como BFP (GIRON *et al.*, 1991) expresso por 14 genes de um plasmídeo associado à virulência: “EPEC Adherence Factor” (EAF). O BFP é responsável pela aderência localizada em células epiteliais. O BFP seria importante por promover a ligação inicial à célula hospedeira e a interação entre as bactérias, levando à formação de microcolônias tridimensionais de bactérias aderidas (TOBE e SASAKAWA, 2001). Como o BFP não é expresso nas a-EPEC, não há a formação de agregados densos nas lesões A/E, mostrando agrupamentos frouxos de células bacterianas, ocasionando a Adesão Localizada “Like” (LAL) (RODRIGUES *et al.*, 1996).

As STEC constituem um grande grupo e são caracterizadas pela produção de duas potentes citotoxinas semelhantes à toxina de *Shigella dysenteriae*: as toxinas de Shiga 1 e 2 (Stx1 e Stx2), codificadas através de profagos integrados em seu cromossomo (MELTON-CELSA e O'BRIEN 1998). Além destas, alguns sorotipos expressam uma enterohemolisina (Ehly) e uma protease (EspP/PssA) de codificação plasmidial, que desempenham um importante papel como fatores de virulência. A Stx é citotóxica para uma variedade de células endoteliais e epiteliais, incluindo células epiteliais do íleo. Ela inibe a síntese de proteínas dentro das células hospedeiras (MOYER *et al.*, 1987; O'BRIEN e HOLMES, 1987). As EHEC, como subgrupo das STEC, apresentam as características de virulência citadas acima, associadas à capacidade de ocasionar a lesão A/E (O'BRIEN e KAPER, 1998; GOOSNEY *et al.*, 1999).

O mecanismo pelo qual amostras de EHEC causam a lesão A/E é similar ao de amostras EPEC. Entretanto, amostras de EHEC não possuem o plasmídeo

responsável pelo padrão de aderência localizada, codificado pelo gene *bfp* contido no plasmídeo EAF (WIELER *et al.*, 1996)

Em seres humanos, as EHEC podem provocar principalmente Colite Hemorrágica (CH), Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), púrpura trombocitopênica, e infecções assintomáticas. A forma mais comum é a CH, caracterizada por um quadro severo de dor abdominal e diarreia sanguinolenta. Diferencia-se da disenteria clássica por normalmente ocorrer sem febre e produzir graves complicações, uma vez que 10% dos pacientes terminam desenvolvendo SHU. Esta síndrome afeta fundamentalmente crianças e se caracteriza por anemia hemolítica, trombocitopenia e falha renal aguda, que requer hemodiálise. A taxa de mortalidade de SHU oscila entre 5 e 10% (BANATVALA *et al.*, 2001). Um número significativo das pessoas afetadas pela SHU (cerca de 30%) sofre danos permanentes, que incluem insuficiência renal crônica, hipertensão e deficiências neurológicas (KARMALI, 1989).

As STEC e as EHEC altamente virulentas do sorotipo O157:H7, por exemplo, são importantes patógenos emergentes que causam patologias muito severas em humanos (BLANCO *et al.*, 2003). Embora sorogrupos não-O157 também causem doenças e sejam mais comuns que o sorogrupo O157 em determinados países, amostras STEC não-O157 são mais comuns em animais e como contaminantes de alimentos e água (KARMALI, 1989).

Os ruminantes são considerados os principais reservatórios de amostras STEC, e mais de 435 sorotipos têm sido descritos como isolados destes animais (BEUTIN *et al.*, 1993; BLANCO *et al.*, 2004). Mais de 470 sorotipos já foram isolados de humanos (BEUTIN *et al.*, 2004; BLANCO *et al.*, 2004), sendo que a fonte da maioria destes casos já foi identificada em bovinos, em carne ou ambos (GYLES, 2006).

A identificação de cepas de *E. coli* diarreiogênicas requer uma diferenciação destes microrganismos dos membros não-patogênicos da microbiota intestinal. A combinação dos antígenos O e H define o sorotipo dos membros da família *Enterobacteriaceae*. Estes servem como uma marca cromossomal facilmente identificável que está relacionada com clones específicos de virulência (NATARO e KAPER, 1998). De acordo com o esquema de Kauffmann modificado, as *E. coli* são sorotipadas com base em seus antígenos de superfície O (somático), H (flagelar) e K (capsular) (EWING, 1986; LIOR, 1996). Atualmente, existem 183 O, 53 H e 100

antígenos K descritos (ØRSKOV e ØRSKOV, 1992; EWING, 1986). Os 53 tipos de H em *E.coli* são numerados de 1 a 56, sendo que os números 13, 22 e 50 não são usados (EWING, 1986).

A maioria das amostras de *E. coli* são móveis e possuem flagelo. Em grande parte das bactérias, a estrutura básica do flagelo pode ser dividida em três partes morfolologicamente distintas: (1) o corpo basal (fornece o motor giratório para o aparato quimiotático), que consiste de uma série de anéis e uma haste central e é ancorado nas membranas interna e externa da célula; (2) o gancho, que está localizado externamente à célula e proporciona a ligação entre o corpo basal e o filamento e (3) o filamento flagelar, a maior porção do flagelo, com arranjo helicoidal e comprimento que compreende várias vezes o tamanho da própria célula (KHAN, 1993). A motilidade de cepas bacterianas flageladas provém da rotação do filamento flagelar externo. A atividade flagelar é acoplada a um aparato sensorial em um sistema de controle que permite o movimento da célula na direção de ambientes favoráveis e o movimento contrário caso o ambiente seja desfavorável (MACNAB, 1992).

Mais de 40 genes são necessários para a montagem do flagelo, estrutura, função e recepção sensorial associada, além da transdução da informação usada para influenciar a operação do flagelo. Em *E. coli* e *Salmonella enterica* estes genes dividem-se em quatro grupos (MACNAB, 1996). Os genes são chamados de *flg*, *flh*, *fli* ou *fliJ*, de acordo com a região do cromossomo onde se encontram. A designação “*fl*” deve-se ao seu envolvimento na montagem e na função do flagelo. O antígeno flagelar de *E. coli* correspondente ao filamento é formado pela polimerização de uma única subunidade protéica, a flagelina, codificada pelo gene *fliC* (MACNAB, 1992). Este gene foi inicialmente designado como *hag* e apenas recentemente renomeado como *fliC*. Os diferentes sorotipos de antígenos flagelares correspondem a diferentes alelos de *fliC* (IINO *et al.*, 1988). O produto do gene *fliD* é responsável pela polimerização do filamento (HUGHES *et al.*, 1993).

A variabilidade do antígeno H é encontrada dentro do filamento flagelar (IINO *et al.*, 1988). As porções N-terminal e C-terminal da flagelina são essenciais para a polimerização e secreção das moléculas de flagelina e são altamente conservadas (HYMAN e TRACHTENBERG, 1991). A região central codifica porções antigenicamente variáveis da proteína, variabilidade esta que pode ser considerável. Em *E. coli*, filamentos flagelares têm sido subdivididos em seis morfotipos (A, B, C,

D, E e F), baseados na estrutura de superfície dos filamentos flagelares intactos observada por microscopia eletrônica (LAWN, 1997).

A partir do desenvolvimento de técnicas moleculares, o uso de ácidos nucléicos como biomarcadores para a detecção e identificação de bactérias tem se tornado universal. Foi demonstrado que as proteínas de superfície da parede bacteriana possuem maior diversidade na sequência de aminoácidos do que aquelas localizadas internamente. Desta forma, os genes que codificam estas proteínas são importantes candidatos a potenciais biomarcadores para se conhecer variações genéticas entre espécies. Cada vez mais, os genes da flagelina estão sendo utilizados para esta finalidade (WHITTAM, 1995).

A análise da restrição do gene *fliC* foi utilizada para caracterizar cepas móveis ou imóveis de O157:H7. Utilizando o método de PCR-RFLP, Fields *et al.* (1997) mostraram que cepas STEC do sorotipo O157:H- possuíam o mesmo perfil de restrição do gene *fliC* de cepas STEC O157:H7. Além disso, demonstraram que a maioria das amostras investigadas possuía perfis diferentes após a digestão com a enzima *RsaI*.

Botelho *et al.* (2003) demonstraram que o PCR-RFLP é um bom método para pesquisa e tipagem dos antígenos H de cepas imóveis de *E. coli* que possuem o gene para a flagelina, mas não podem ser identificadas por sorotipagem.

La Ragione *et al.* (2000) demonstraram em seu estudo que a motilidade mediada por flagelo em amostras de *E coli* patogênicas para galinhas está envolvida na virulência da bactéria, influenciando na sua aderência, invasão e resposta inflamatória. Já em estudo realizado por Best *et al.* (2005), estes descobriram que o flagelo promovia a colonização do intestino de galinhas por amostras EHEC O157. O flagelo contribui também na adesão e invasão de amostras EPEC a células epiteliais, um pré-requisito para a resposta inflamatória e diarreia (BARNICH *et al.*, 2003).

Reid *et al.* (1999) e Wang *et al.* (2003) relataram que a mutação e a recombinação no gene *fliC* participam da evolução dos antígenos H em *E. coli*, possivelmente desencadeadas devido à pressão seletiva ocasionada pela resposta imune do hospedeiro. A quantidade de dados disponíveis faz da variação flagelar um marcador de uso potencial para a detecção ou identificação de bactérias móveis e para estudos da epidemiologia ou genética populacional de muitos organismos (WINSTANLEY e MORGAN, 1997).

Atualmente existem poucos estudos com um número abrangente de amostras de STEC e EPEC de origem animal, comparando a técnica de soroaglutinação clássica com a determinação do antígeno H pela técnica de PCR-RFLP do gene *fliC*. Certamente no Brasil não encontramos na literatura consultada nenhum estudo semelhante. Esta pesquisa foi planejada para verificar a eficiência desta última técnica, principalmente nos casos de amostras de *E.coli* imóveis ou com antígeno H não tipável (NT). A determinação do antígeno H tem grande importância epidemiológica, possibilitando em muitos casos se ter uma idéia sobre o patótipo de uma determinada amostra de *E.coli* H- ou HNT.

Deste modo, o estudo da diversidade do antígeno *fliC* através da técnica de RFLP seria de grande valia, pois dentre as amostras escolhidas para este estudo existem antígenos H-, não tipáveis, e antígenos H conhecidos pela sorologia. Por outro lado, amostras que apresentarem antígenos H não determinados por esta técnica poderiam fornecer dados novos após clonagem e seqüenciamento do gene *fliC*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral estudar as diferenças do antígeno flagelar entre os principais sorotipos das categorias de *E. coli* encontradas em cães, ovinos, bovinos, macacos, coelhos e humanos.

2.2 Objetivos específicos

- ✦ Sorotipagem das amostras;
- ✦ Confirmação da caracterização das amostras de EPEC e STEC: amplificação dos genes *eae* e *stx* para confirmar os resultados previamente obtidos em pesquisas anteriores;
- ✦ Amplificação do gene *fliC* pela técnica de PCR;
- ✦ Estudo da variação dos genes da flagelina entre os sorotipos móveis e imóveis de STEC e EPEC pelo seu polimorfismo de restrição (PCR-RFLP);
- ✦ Purificação dos produtos de PCR;
- ✦ Clonagem de amostras com perfil anômalo do antígeno H;
- ✦ Seqüenciamento das amostras clonadas para desta maneira tentar elucidar os motivos pelos quais estas apresentaram perfis díspares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Amostras estudadas

No presente estudo, foram utilizadas 112 amostras de *E. coli* provenientes de bovinos (LEOMIL *et al.*, 2003; LEOMIL *et al.*, 2005; AIDAR-UGRINOVICH *et al.*, 2007), coelhos (PENTEADO *et al.*, 2002), macacos (CARVALHO *et al.*, 2003), ovinos (VETTORATO *et al.*, 2003) e cães (NAKAZATO *et al.*, 2004). Tais amostras são oriundas de trabalhos realizados anteriormente no Laboratório de Bacteriologia Médica e Veterinária, e pertencem à coleção do Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro (Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Biomédicas II - Universidade de São Paulo).

As amostras estavam conservadas em Meio de Lignières (5 g de extrato de carne; 10 g de peptona; 5 g de NaCl; 7 g de ágar; 5 g de gelatina). A partir desse meio, as amostras foram semeadas nos meios *Tryptic Soy Agar* (TSA) e Ágar MacConkey, sendo incubadas por 18 h a 37 °C, para verificar uma possível contaminação.

3.1.2 Amostras padrão para fatores de virulência

As amostras padrão utilizadas na PCR para a pesquisa dos genes *eae* e *stx* estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Amostras padrão utilizadas.

AMOSTRAS	DESCRIÇÃO
<i>E. coli</i> K12 C600	Padrão negativo para <i>eae</i> e <i>stx</i>
<i>E. coli</i> E2348/69 (EPEC)	Padrão positivo para <i>eae</i>
EDL 933	Padrão positivo para <i>stx</i>

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção do DNA genômico

Para a amplificação do gene *fliC*, colônias puras de cepas bacterianas foram cultivadas em 3 ml de meio TSB (*Tryptone Soya Broth* - OXOID®) e incubadas por 18 horas sob agitação constante a 200 rpm. Para a obtenção do DNA genômico, utilizou-se 1 ml da cultura, que foi submetido ao protocolo de extração do *Easy DNA Kit* (Invitrogen™). A quantificação do DNA e sua integridade foram verificadas pelo método de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, comparando-se com um padrão de massa molecular conhecido (*High DNA Mass™ Ladder* - Invitrogen™). O gel foi corado em solução de brometo de etídio (Invitrogen™) na concentração de 10 µg/ml e as bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV). Após a quantificação, o DNA extraído foi diluído a uma concentração final de 10 ng/µL, para que todas as amostras apresentassem a mesma quantidade de DNA a ser utilizada nas reações de PCR.

Para a amplificação dos genes *eae* e *stx*, colônias puras de cepas bacterianas foram imersas em água ultrapura e lisadas através de congelamento para a extração do DNA genômico.

3.2.2 Sorotipagem

As amostras escolhidas para este trabalho foram novamente sorotipadas para verificar se havia algum erro quanto à identificação do antígeno flagelar, já que mais de um laboratório foi responsável pela sorologia inicial, incluindo laboratórios do exterior (Lugo, Espanha e Universidade de Guelph, Ontário, Canadá).

Os antígenos somáticos (O) e flagelares (H) das amostras foram determinados por ensaios de aglutinação padrões, utilizando-se os antissoros O1 a O181 e H1 a H56 (EWING, 1986), preparados pela Dra. Kinue Irino no Instituto Adolfo Lutz (IAL), São Paulo.

As amostras de referência são provenientes do International Reference Center for *E. coli* and *Klebsiella*, Copenhagen.

3.2.3 Confirmação dos fatores de virulência

As condições citadas no plano inicial para amplificar o gene *eae* (OSWALD *et al.*, 2000) foram modificadas para que fosse seguido o protocolo de Gannon *et al.* (1993). Este vem sendo utilizado com êxito nos trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Bacteriologia Médica e Veterinária do Departamento de Microbiologia do ICB/USP.

A pesquisa dos genes *eae* e *stx* foi realizada por PCR, utilizando os primers descritos na Tabela 2. As concentrações dos reagentes utilizados foram: 27 µL de água ultrapura estéril; 2,5 µL de tampão Tris-HCl; 2,5 µL de MgCl₂; 1 µL da mistura de dNTP (0,2 mM cada base); 1 µL de cada iniciador; 0,5 µL de Taq-DNA Polimerase e 15 µL de DNA molde, num volume final de 50 µL.

A pesquisa dos fatores de virulência no presente estudo foi realizada novamente devido ao considerável tempo de armazenamento de algumas das amostras em meio de cultura (descrito no item 3.1.1). Tal forma de armazenamento poderia ter ocasionado uma eventual perda de algum dos fatores de virulência pesquisados, o que enquadraria uma ou mais amostras a serem estudadas em outra categoria de DEC.

Tabela 2. Iniciadores, temperatura de anelamento da PCR e tamanho dos amplicons para os genes que codificam fatores de virulência.

GENE	SEQUÊNCIA	TAMANHO (pb)	TEMP. (°C)	REF.
<i>eae</i> F	ACG TTG CAG CAT GGG TAA CTC	815	56	GANNON <i>et al.</i> , 1993.
<i>eae</i> R	GAT CGG CAA CAG TTT CAC CTG			
<i>stx</i> 1 F	CGC TGA ATG TCA TTC GCT CTG C	302	55	BLANCO <i>et al.</i> , 2003.
<i>stx</i> 1 R	CGT GGT ATA GCT ACT GTC ACC			
<i>stx</i> 2 F	CTT CGG TAT CCT ATT CCC GG	516	55	BLANCO <i>et al.</i> , 2003.
<i>stx</i> 2 R	CTG CTG TGA CAG TGA CAA AAC GC			

Após os ciclos de amplificação, a visualização do fragmento de DNA foi feita em gel de agarose a 1%. Uma alíquota de 3 µL de tampão de corrida eletroforética Azul de Bromotimol foi adicionada a uma alíquota de 5 µL de cada amostra. Foram, então, submetidas à separação eletroforética a 70 Volts, durante aproximadamente 1 h, juntamente com um marcador de peso molecular de 1 Kb (*1 Kb DNA Ladder* – Invitrogen™).

O gel foi corado com brometo de etídio (10 µg/mL) e a sua leitura foi procedida em transiluminador.

3.2.4 Amplificação do gene *fliC*

As reações de PCR para amplificar o gene *fliC* das 112 amostras foram realizados de acordo com protocolo desenvolvido por Fields *et al.*(1997), com algumas modificações. A concentração dos reagentes e o volume final da reação encontram-se descritos no item 3. 2. 3.

O par de iniciadores e as temperaturas utilizadas para amplificar o gene estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Iniciadores utilizados para amplificar o gene *fliC*, temperatura de anelamento e tamanho do amplicon.

GENE	SEQUENCIA	TAMANHO (pb)	TEMP. (°C)	Ref.
<i>fliC</i> F	ATG GCA CAA GTC ATT AAT ACC CAA	1.300 a 2.600	61	FIELDS <i>et al.</i> , 1997
<i>fliC</i> R	CTA ACC CTG CAG CAG AGA CA			

Após os ciclos de amplificação, o DNA foi visualizado segundo os procedimentos descritos no item 3. 2. 3.

3.2.5 Testes de PCR-RFLP

O protocolo de digestão enzimática foi realizado segundo Ramos Moreno *et al.* (2006) com algumas modificações do plano inicial, para que melhor se adequasse às condições da PCR que amplificou o gene *fliC*.

A saber: a precipitação e concentração do amplicon foram necessárias para que obtivéssemos melhor resultado na digestão enzimática. Para isto, 45 µL do produto da reação de PCR foram adicionados a 5 µL de acetato de sódio 3 M, pH 7,0 e 125 µL de etanol absoluto gelado. A mistura foi incubada por 18 h a -20 °C e centrifugada a 14.462 xg por 20 min. O sobrenadante foi desprezado e o DNA sedimentado foi ressuspensionado em 50 µL de etanol 70% gelado. Após nova centrifugação por 15 min, o sobrenadante foi desprezado e o tubo com o DNA permaneceu aberto para secagem em fluxo laminar. O DNA foi então ressuspensionado em 16 µL de água ultrapura estéril e conservado a -20 °C.

A digestão enzimática do amplicon foi realizada com 1 µL da endonuclease de restrição *Rsa* I (Invitrogen™), 1 µL de REact® 1 (tampão da enzima) e 8 µL do DNA precipitado. A mistura foi incubada em banho-maria a 37 °C por 2 h e depois submetida à separação eletroforética em gel de agarose a 3% por cerca de 5 h, juntamente com um marcador de massa molecular conhecido (*100pb DNA Ladder* – Invitrogen™).

O gel foi corado com brometo de etídio (10 µg/mL) para ser visualizado em transiluminador.

3.2.6 Purificações dos produtos de PCR

As amostras imóveis provenientes de diferentes animais que não tiveram seu antígeno flagelar determinado através da técnica de PCR-RFLP foram selecionadas para clonagem e seqüenciamento. Tais amostras não apresentaram identidade molecular com os antígenos flagelares conhecidos.

Para a clonagem do gene *fliC*, uma alíquota de 90 µL do produto da PCR foi submetida ao protocolo de purificação *PureLink™ PCR Purification Kit* (Invitrogen™). A integridade do DNA foi verificada pelo método de eletroforese em gel de agarose a 1%, comparando-se com um padrão de massa molecular conhecido de 1 Kb (*1 Kb DNA Ladder* – Invitrogen™). O gel foi corado em solução de brometo de etídio e as bandas foram visualizadas em transiluminador.

3.2.7 Clonagem do gene *fliC*

A clonagem das amostras com perfis de RFLP desconhecidos seria inicialmente realizada de acordo com o protocolo do *TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing* (*pCR® 4-TOPO® vector*) com *One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli* - Invitrogen™ (BOTELHO *et al.*, 2003).

Várias tentativas de clonagem com o uso do kit acima foram infrutíferas, mesmo utilizando diferentes concentrações dos reagentes nas reações de clonagem. Como não foram obtidos resultados com o material e a metodologia descritos acima, mudamos o protocolo da clonagem e preparamos nossas células quimicamente competentes em laboratório para que recebessem o vetor com o gene *fliC* a ser clonado.

Para o preparo das bactérias quimicamente competentes, uma colônia de *E. coli* K12 DH5α foi inoculada em 5 mL de caldo Luria Bertani (LB – DIFCO®) e incubada por 18 h sob agitação constante. Desta cultura, 3 mL foram inoculados em 30 mL de caldo LB e incubados por 100 min sob agitação constante de 160 rpm. Após o crescimento, a cultura foi centrifugada por 5 min a 3.615 xg em tubo do tipo Falcon (50 mL) em centrífuga previamente refrigerada a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 15 mL de Cloreto de Cálcio (CaCl₂) gelado ao

sedimentado. A mistura foi incubada por 20 min em gelo. Após a incubação, a mistura foi novamente centrifugada a 4 °C por 5 min a 3.615 xg. O sobrenadante foi desprezado, e o sedimento ressuspensionado em 7,5 mL de CaCl₂ gelado. As bactérias foram utilizadas para a clonagem imediatamente após de seu preparo.

O vetor para a clonagem do gene *fliC* utilizado na transformação foi o plasmídeo pCR®2.1-TOPO, integrante do *TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing* (pCR® 4-TOPO® vector), da marca Invitrogen™. A transformação foi realizada segundo as instruções do kit.

Para a reação de clonagem, foram utilizados 300 µL das bactérias quimicamente competentes preparadas como descrito acima. Às bactérias foram adicionados 6 µL da reação de transformação com o vetor. A mistura foi mantida em gelo por 40 min. Após esse período, a reação foi aquecida em banho-maria a 42 °C por 2 min, sendo, em seguida, novamente incubada em gelo por 10 min. À reação foi adicionado 1 mL de caldo LB previamente aquecido a 37 °C. As bactérias foram incubadas a 37 °C por 1 h 30 min sem agitação, para depois serem semeadas em placas de meio LB Agar contendo 50 µg/mL de kanamicina e 40 mg/mL de X-Gal diluída em Dimetilformamida, para a seleção dos transformantes.

As colônias foram selecionadas de acordo com as instruções do manual do plasmídeo utilizado como vetor (pCR®2.1-TOPO da marca Invitrogen™). As colônias de coloração azul foram descartadas, e as de cor branca foram então semeadas para extração de seu DNA e verificação da inserção do plasmídeo através da reação de PCR. O DNA bacteriano foi obtido através da lise pelo calor, como descrito anteriormente no item 3. 2. 1.

O par de iniciadores e as temperaturas utilizadas para amplificar a sequência inserida estão descritos na Tabela 3 (FIELDS *et al.*, 1997).

3.2.8 Sequenciamento do gene *fliC*

As três amostras animais selecionadas para clonagem e sequenciamento apresentaram perfis de RFLP desconhecidos. Através de seu sequenciamento buscamos conhecer os motivos pelos quais tais amostras apresentaram perfis díspares.

As reações de sequenciamento foram realizadas através de serviço terceirizado pela empresa Genomic Engenharia Molecular LTDA. As reações de sequenciamento foram realizadas usando o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* da Applied Biosystems. Os produtos de sequenciamento foram submetidos à eletroforese em um sequenciador modelo 3130xl da Applied Biosystems. As sequências foram revisadas e editadas no módulo *SeqMan Pro* do pacote de software *LaserGene* versão 7.1.0 (DNASTAR, Inc. – EUA).

Todas as sequências obtidas foram alinhadas e comparadas através do programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), disponível no site National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4 RESULTADOS

4.1 Confirmação da presença dos genes *eae* e *stx*

Do total de 112 amostras analisadas, 60 delas (53,5%) foram positivas apenas para o gene *eae*; 23 amostras (20,5%) deram resultado positivo apenas para os genes *stx*₁ e *stx*₂; cinco (4,5%) foram positivas tanto para *stx* quanto para *eae*; e 24 delas (21,4%) deram resultado negativo para ambos os genes, confirmando dessa forma, os resultados obtidos nas pesquisas anteriores dos fatores de virulência codificados por estes dois genes.

Dentre os diferentes animais que deram origem às amostras, apenas os isolados de *E. coli* provenientes de bovinos e ovinos apresentaram resultados positivos para *stx*, sendo estes classificados como portadores de amostras de STEC. Das 24 amostras estudadas de bovinos, sete delas eram positivas para *stx*₁ (29%); três para *stx*₂ (12,5%) e outras três eram positivas para os genes *stx*₁ e *stx*₂ (12,5%). Dentre estas 13 amostras, cinco (20,8%) também foram positivas para o gene *eae*. Quatro amostras (16,6%) foram positivas apenas para *eae*. Do total, somente sete amostras (29,1%) apresentaram resultados negativos para *eae* e *stx*.

Entre as 22 amostras de ovinos, sete (31,8%) foram positivas para *stx*₁ e *stx*₂; seis para *stx*₁ (27,2%) e duas para *stx*₂ (9%). Dentre estas 15, nenhuma foi positiva para o gene *eae*, sendo assim classificadas como STEC. Do total de 22 amostras, apenas quatro (18,1%) apresentaram resultado positivo apenas para o gene *eae* e três (13,6%) deram resultado negativo para ambos os genes.

As 20 amostras de macacos e 22 de cães foram, em sua totalidade, positivas para o gene *eae* e negativas para o gene *stx*, podendo ser classificadas como amostras de EPEC.

Dentre as 24 amostras de coelho analisadas, dez eram EPEC, pois foram positivas para o gene *eae* e negativas para *stx*; 14 eram negativas para ambos os genes.

Os resultados dos testes de PCR para os genes *eae* e *stx* encontram-se na Tabela 4.

4.2 Sorotipagem

As amostras sorotipadas não apresentaram qualquer diferença quanto à identificação de seus antígenos somáticos ou flagelares tipados anteriormente. Esta confirmação dos sorotipos eliminou qualquer hipótese de contaminação, impedindo que, em uma mesma amostra, mais de um antígeno H tivesse os seus genes *fliC* amplificados na PCR.

Na Tabela 4 estão descritas as amostras de *E. coli* que foram analisadas, os animais das quais foram isoladas, os resultados da sorotipagem e dos testes de PCR-RFLP.

4.3 PCR para *fliC*

Os testes de PCR para amplificar o gene *fliC* das 112 amostras de *E. coli* isoladas de diferentes animais foram realizados segundo a metodologia descrita no item 3. 2. 4.

Dentre as 24 amostras de coelhos que foram analisadas, apenas duas delas (amostras 12 e 144) não amplificaram o gene *fliC* através do método descrito anteriormente (FIELDS *et al.*, 1997). Uma das amostras pertence ao sorotipo O126:H-, e a outra ao sorotipo O128:H2.

Entre as 22 amostras de cães analisadas, cinco delas não amplificaram o fragmento de DNA correspondente ao gene *fliC* (amostras BIO 2, BIO 4, C27 col.1, HE 8 e HE 9), duas delas pertencendo ao sorotipo O157:H16, uma delas ao sorotipo O25:H8 e as outras duas ao sorotipo O111:H25.

Das 24 amostras de bovinos analisadas, sete delas não amplificaram o gene *fliC* (amostras 6CP(8)-1, Elga (5)-1, 92MB (4)-1, 129MB-2, 002HV-5, 7J(15)-1, N61-12). Destas, três pertenciam ao sorotipo O119:HNT, uma delas ao sorotipo O111:H19, uma ao sorotipo O123:H2, uma era ONT:HNT e a outra O22:H16.

Para tais amostras, diferentes concentrações dos reagentes na reação de PCR foram usadas, mas não obtivemos êxito na amplificação do gene *fliC*.

Dentre as 22 amostras de ovinos e 20 amostras de macacos todas tiveram o fragmento correspondente ao gene *fliC* amplificado através da PCR.

Os fragmentos de DNA amplificados das amostras provenientes de coelhos variaram entre 1393 e 1863pb. Entre as amostras de cães, os fragmentos de DNA variaram de 1309 e 1753pb (Figura 2). Já entre as amostras de bovinos, os fragmentos amplificados tiveram a variação de 1324 a 1955pb.

As amostras de ovinos amplificaram o gene *fliC* com fragmentos variando de 1215 a 1903pb (Figuras 1 e 2); já entre as amostras de macacos, os fragmentos amplificados variaram de 1466 a 1767pb (Figura 2).

Figura 1: Reação de PCR para o gene *fliC* das amostras isoladas de ovinos. Linha 1: Ladder 1Kb; Linha 2: amostra 210-7 (O75:H-); Linha 3: amostra RB24-14 (O75:H-); Linha 4: amostra RB20-1 (O5:H-); Linha 5: amostra 123-4(O5:H-); Linha 6: amostra RB31-5 (O153:H7); Linha 7: RB7-4 (ONT:H19); Linha 8: amostra 124-3 (O75:H8); Linha 9: amostra RB6-13 (O178:H7); Linha 10: amostra C8-8 (O87:H16); Linha 11: amostra 243-18 (O146:H21); Linha 12: Ladder 1Kb.

Figura 2: PCR do gene *fliC* de amostras isoladas de diferentes animais com antígeno flagelar imóvel. Linha 1: Ladder 1Kb; Linha 2: amostra B2N, isolada de cão (ONT:H-); Linha 3: amostra 234-7, isolada de ovino (O16:H-); Linha 4: amostra 4a, isolada de macaco (O33:H-); Linha 5: Ladder 1Kb.

4.4 Testes de RFLP

Dentre as 112 amostras estudadas, 98 apresentaram perfil molecular único para cada antígeno flagelar. Destas, 82 confirmaram seu antígeno H determinado através da sorologia e outras 16 amostras classificadas anteriormente como imóveis tiveram seu antígeno H determinado através da PCR-RFLP. As outras 14 amostras não amplificaram o gene *fliC* e, portanto, não apresentaram padrão através da técnica de RFLP.

Não foi observado nenhum tipo de relação entre o sorotipo e as diferentes espécies de animais analisadas. Poucos sorotipos em comum foram encontrados entre os animais pesquisados. Dentre estes podemos citar o O127:H40, que foi identificado em uma amostra de bovino e outra de macaco. O sorotipo O128:H2 foi o mais comum, encontrado em três amostras de coelho, duas de ovino e uma de macaco. O sorotipo O119:H2 foi identificado em apenas uma amostra de bovino e duas de cão; já o O153:H7 foi encontrado em três amostras de coelho e duas de ovino. Duas amostras de macaco e uma de cão apresentaram o sorotipo O167:H6; três amostras de macaco e uma de cão apresentaram o O142:H6; já o sorotipo ONT:H8 foi identificado apenas em uma amostra de bovino e uma de coelho. O sorotipo ONT:H40 foi comum a apenas duas amostras: uma de macaco e uma de cão.

Os ensaios de RFLP com todas as amostras que amplificaram o gene *fliC* foram feitos por meio da digestão enzimática com a enzima de restrição *RsaI*, conforme descrito no item 3. 2. 5. A análise do perfil de restrição das amostras foi feita baseada nos perfis de amostras padrão apresentados por Ramos Moreno *et al.* (2006).

Amostras de coelhos que possuíam o antígeno flagelar determinado através do método de soroaglutinação tiveram seu perfil molecular confirmado através da técnica de PCR-RFLP. O mesmo ocorreu com as amostras de cães, bovinos, ovinos e macacos analisadas, como mostram as Figuras 3 e 4 e a Tabela 4.

As amostras provenientes de coelhos que possuíam o antígeno flagelar não-tipável através do método clássico de soroaglutinação, ou eram imóveis, puderam ser classificados através da PCR-RFLP. Os fragmentos do gene *fliC* amplificados nestas amostras variaram entre 1393 e 1772pb. Os antígenos

flagelares determinados foram: H2 (amostra 21), H8 (amostra 117), H14 (amostra 145), H20 (este identificado em duas amostras imóveis: amostras 101 e 102) e H28 (amostra 38).

As sete amostras de cães imóveis que foram analisadas amplificaram fragmentos que variaram entre 1278 e 1339pb. Dentre estas, apenas duas delas tiveram seu antígeno flagelar determinado através da PCR-RFLP. Os antígenos flagelares determinados foram H25 (amostra B17) e H52 (amostra HE13).

Uma das amostras teve seu fragmento amplificado não digerido pela enzima de restrição utilizada. O fragmento possuía 1278pb, enquadrando-se no perfil dos antígenos flagelares H5 ou H55, que segundo Ramos Moreno *et al.* (2006) não possuem sítios de restrição para a endonuclease *RsaI*.

As outras quatro amostras imóveis provenientes de cães não tiveram seu antígeno flagelar determinado, pois não apresentaram identidade molecular com os antígenos flagelares conhecidos. Devido a esse não pareamento com os perfis de amostras padrão (RAMOS MORENO *et al.*, 2006), estas não puderam ser caracterizadas quanto ao antígeno flagelar apresentado. Como as quatro amostras apresentaram o mesmo perfil de RFLP, uma delas (amostra B2N) foi selecionada para clonagem e seqüenciamento (Figura 5).

As quatro amostras de bovinos que possuíam o antígeno H imóvel ou não-tipável que amplificaram o gene *fliC*, apresentaram variação no tamanho dos fragmentos de 1520 a 1947 pb. Duas delas (Beleza-2 e Beleza-4) tiveram seus antígenos flagelares determinados como H8. A amostra 43CC-2 apresentou o antígeno flagelar H44, já amostra 132MB(9)-1 teve seu antígeno flagelar determinado como H2.

As cinco amostras de ovinos que possuíam antígeno H imóvel amplificaram o gene *fliC*. Os fragmentos dessas amostras variaram de 1298 a 1903 pb. Duas dessas amostras (210-7 e RB24-14) tiveram o antígeno flagelar determinado como H8. Duas outras (RB20-1 e 123-4) tiveram seu antígeno determinado como H19 (Figura 3). Uma única amostra de ovino (234-7) teve seu antígeno flagelar não determinado através da técnica de RFLP. Esta não apresentou identidade molecular com os antígenos flagelares conhecidos. A amostra foi então selecionada para clonagem e seqüenciamento (Figura 5).

As amostras de macacos que amplificaram o gene *fliC* apresentaram variação em seu amplicon de 1466 a 1767pb. A amostra isolada de macaco que

possuía o antígeno H imóvel (amostra 4a) apresentou um padrão de RFLP que não pode ser classificado dentre os antígenos flagelares atualmente conhecidos (Figura 5). Tal amostra foi também selecionada para clonagem e seqüenciamento.

Tabela 4. Amostras utilizadas no presente estudo, sorologia, resultados de PCR para os genes *eae* e *stx* e determinação do antígeno H por PCR-RFLP.

Amostra	Resultado da sorologia	Resultado da PCR para o gene <i>eae</i>	Resultado da PCR para os genes <i>stx1/2</i>	Fragmento amplificado do gene <i>fliC</i> (pb)	Perfis obtidos por RFLP (pb)	Antígeno H determinado por PCR-RFLP
151MB-13 ^a	O7:H10	-	-	1324	519/321/303	O7:H10
Mora-1 ^a	O132:H51	-	-	1940	350/304/257/238/194/140/135/99	O132:H51
Mora-5 ^a	O132:H51	-	-	1955	352/307/259/241/198/140/132/101	O132:H51
6 CP(8)-1 ^a	O10:H51	-	+/-	Não amplificou	-	-
Ficha-4 ^a	O127:H40	+	-	1577	291/247/154	O127:H40
129MB-2 ^a	O123:H2	+	+/+	Não amplificou	-	-
Elga(5)-1 ^a	O123:H2	-	+/-	Não amplificou	-	-
Florinda-19 ^a	O80:H26	-	-	1473	523/310/134	O80:H26
73CC-11 ^a	O86:H36	-	-	1939	684/549/276/200/139/98	O86:H36
65CC-3 ^a	O123:H11	+	-	1553	586/272/173/148/113	O123:H11
34CC-3 ^a	O123:H11	+	-	1551	531/506/346/207/127	O123:H11
001HV-2 ^a	O8:H21	-	-/+	1613	374/313/291/271/169/148	O8:H21
001HV-5 ^a	O116:H20	-	-	1831	378/299/276/202/178	O116:H20
002HV-5 ^a	O111:H19	+	+/-	Não amplificou	-	-
16FB-12 ^a	O55:H19	-	+/-	1869	614/480/280/243/189	O55:H19
151MB-3 ^a	O175:H49	-	-/+	1568	432/331/309/274/209	O175:H49
92MB(4)-1 ^a	ONT:H8	-	+/-	Não amplificou	-	-
21FC-19 ^a	O7:H7	-	-/+	1579	531/506/346/207/127	O7:H7
N61-12 ^a	O22:H16	-	+/+	Não amplificou	-	-
43CC-2 ^a	O123:HNT	+	-	1947	656/529/413	O123:H44
7J(15)-1 ^a	O119:H-	-	-	Não amplificou	-	-
132MB(9)-1 ^a	O119:H-	+	+/+	1594	591/434/382/127	O119:H2
Beleza-2 ^a	O111:H-	+	+/-	1520	729/320/285/152	O111:H8
Beleza-4 ^a	O111:H-	+	+/-	1553	742/322/287/153	O111:H8
166 ^b	O4:H1	-	-	1852	752/439/294/173	O4:H1
167 ^b	O4:H1	-	-	1758	766/443/304/169	O4:H1
143 ^b	O128:H2	+	-	1429	625/460/347	O128:H2
144 ^b	O128:H2	+	-	Não amplificou	-	-
128 ^b	O132:H2	+	-	1662	605/441/337	O132:H2
130 ^b	O132:H2	+	-	1490	597/433/336	O132:H2
133 ^b	O132:H2	+	-	1502	612/445/347	O132:H2
237 ^b	O1:H45	-	-	1738	439/388/314/215/132	O1:H45
129 ^b	O103:H19	-	-	1758	690/466/303/266/200	O103:H19
L ^b	O103:H19	-	-	1852	672/442/285/248/203	O103:H19
183 ^b	O103:H19	-	-	1863	655/434/279/245/199	O103:H19
113 ^b	O110:H6	+	-	1702	560/448/355/229/150	O110:H6
119 ^b	O110:H6	+	-	1649	529/426/331/217/152	O110:H6
236 ^b	O153:H7	+	-	1737	596/533/363/239/136	O153:H7
238 ^b	O153:H7	+	-	1737	589/540/362/239/137	O153:H7
243 ^b	O153:H7	+	-	1798	593/547/380/251/139	O153:H7
160 ^b	O20:H28	-	-	1747	439/348/206/171	O20:H28
21 ^b	O128:NR	-	-	1525	642/447/351	O128:H2
38 ^b	NT:NR	-	-	1747	429/340/203/171	NT:H28
117 ^b	NT:NR	-	-	1636	749/329/285/143	NT:H8
145 ^b	NT:NR	-	-	1772	610/545/411	NT:H14
12 ^b	O126:H-	-	-	Não amplificou	-	-
101 ^b	O41:H-	-	-	1393	466/343/304/237/169	O41:H20
102 ^b	O41:H-	-	-	1533	402/333/305/236/161	O41:H20
C13-13 ^c	ONT:H8	-	+/+	1430	712/318/287/154	ONT:H8
RB15-16 ^c	O174:H8	-	+/+	1467	716/316/286/153	O174:H8
124-3 ^c	O75:H8	-	+/+	1556	700/315/285/147	O75:H8
C8-8 ^c	O87:H16	-	-/+	1646	377/330/290/146	O87:H16
220-2 ^c	ONT:H16	-	-/+	1486	380/336/299/157	ONT:H16
243-18 ^c	O146:H21	-	+/+	1556	374/316/285/220/147	O146:H21
CA2-10 ^c	O128:H2	-	+/-	1496	563/406/312/125	O128:H2

(continua)

Tabela 4. (continuação)

Amostra	Resultado da sorologia	Resultado da PCR para o gene <i>eae</i>	Resultado da PCR para os genes <i>stx1/2</i>	Fragmento amplificado do gene <i>fliC</i> (pb)	Perfis obtidos por RFLP (pb)	Antígeno H determinado por PCR-RFLP
CA3-14 ^c	O128:H2	-	+/-	1439	565/415/323/129	O128:H2
IT3-1 ^c	ONT:H14	-	+/-	1627	617/555/413	ONT:H14
RB18-8 ^c	O88:H25	-	-	1271	946/312	O88:H25
RB18-6 ^c	O88:H25	-	-	1215	946/311	O88:H25
RB24-8 ^c	O110:H28	-	-	1712	413/330/196/163	O110:H28
RB7-4 ^c	ONT:H19	-	+/-	1892	609/578/273/240	ONT:H19
RB6-2 ^c	O178:H7	+	-	1627	533/489/349/237/134	O178:H7
RB6-3 ^c	O178:H7	+	-	1837	536/498/349/229/125	O178:H7
RB31-3 ^c	O153:H7	+	-	1683	536/496/349/238/130	O153:H7
RB31-5 ^c	O153:H7	+	-	1837	525/489/342/227/125	O153:H7
RB20-1 ^c	O5:H-	-	+/-	1892	625/595/272/237	O5:H19
123-4 ^c	O5:H-	-	+/-	1903	625/587/272/235	O5:H19
210-7 ^c	O75:H-	-	+/+	1497	718/310/279/145	O75:H8
RB24-14 ^c	O75:H-	-	+/+	1517	718/314/280/145	O75:H8
234-7 ^c	O16:H-	-	+/+	1298	549/324/304	O16:H10
1 ^d	O128:H2	+	-	1514	577/413/317/124	O128:H2
2 ^d	O49:H46	+	-	1608	461/316/292/242/190	O49:H46
3 ^d	O127:H40	+	-	1477	298/262/148	O127:H40
12a ^d	ONT:H40	+	-	1466	285/260/156	ONT:H40
4b ^d	OR:H34	+	-	1583	651/542/413	OR:H34
5 ^d	O167:H9	+	-	1767	1008/303/276/163	O167:H9
12b ^d	O26:H7	+	-	1752	532/495/358/221	O26:H7
7a ^d	O132:H31	+	-	1565	530/427/378/217/152	O132:H31
7b ^d	O132:H31	+	-	1476	538/401/389/209/153	O132:H31
8 ^d	O132:H31	+	-	1628	572/421/398/233	O132:H31
6 ^d	O49:H6	+	-	1619	521/419/325/218/149	O49:H6
13a ^d	O167:H6	+	-	1603	520/417/332/224/150	O167:H6
13b ^d	O167:H6	+	-	1578	512/417/331/223/152	O167:H6
15a ^d	O142:H6	+	-	1619	522/408/333/220/145	O142:H6
15b ^d	O142:H6	+	-	1621	522/418/328/216/150	O142:H6
16a ^d	O142:H6	+	-	1614	518/409/330/222/151	O142:H6
16b ^d	O142:H6	+	-	1595	521/415/326/222/149	O142:H6
17a ^d	O139:H14	+	-	1590	631/568/416	O139:H14
17b ^d	O139:H14	+	-	1611	626/565/415	O139:H14
4a ^d	O33:H-	+	-	1636	720/579/439	O33:H34
008 ^c	O98:H28	+	-	1753	437/334/198/171	O98:H28
HE10 ^c	ONT:H40	+	-	1558	299/272/156	ONT:H40
HE8 ^c	O111:H25	+	-	Não amplificou	-	-
HE9 ^c	O111:H25	+	-	Não amplificou	-	-
BIO2 ^c	O157:H16	+	-	Não amplificou	-	-
BIO4 ^c	O157:H16	+	-	Não amplificou	-	-
HE4 ^c	O11:H16	+	-	1673	390/346/311/301/165/149	O11:H16
BIO12 ^c	O119:H2	+	-	1584	612/444/338	O119:H2
SPA14 ^c	O119:H2	+	-	1636	610/443/345	O119:H2
B1 ^c	O55:H7	+	-	1736	591/540/366/240/137	O55:H7
B4 ^c	O125:H49	+	-	1743	432/331/305/269/201/131	O125:H49
C32 ^c	O4:H6	+	-	1646	520/421/325/223/151	O4:H6
S6 ^c	O142:H6	+	-	1830	525/425/345/227/153	O142:H6
C27- col. 3 ^c	O167:H6	+	-	1830	531/426/331/217/152	O167:H6
C27- col. 1 ^c	O25:H8	+	-	Não amplificou	-	-
QSF4 ^c	O88:H-	+	-	1278	1278	O88:H5/O88:H55
HE13 ^c	O15:H-	+	-	1339	757/402/196	O15:H52
B17 ^c	O156:H-	+	-	1309	1016/339	O156:H25
B4-17 ^c	ONT:H-	+	-	1324	835/467/156	ONT:H-
SPA16 ^c	ONT:H-	+	-	1331	829/467/156	ONT:H-
B2N ^c	ONT:H-	+	-	1331	829/470/156	ONT:H52
S1 ^c	O174:H-	+	-	1324	825/467/154	O174:H-

LEGENDA: Amostras ^a: isoladas de bovinos; Amostras ^b: isoladas de coelhos; Amostras ^c: isoladas de ovinos; amostras ^d: isoladas de macacos; Amostras ^e: isoladas de cães.

(conclusão)

Figura 3: RFLP das amostras isoladas de ovinos. Linha 1: Ladder 100pb; Linha 2: amostra 210-7 (O75:H-, identificado como O75:H8); Linha 3: amostra RB24-14 (O75:H-, identificado como O75:H8); Linha 4: amostra RB20-1 (O5:H-, identificado como O5:H19); Linha 5: amostra 123-4 (O5:H-, identificado como O5:H19); Linha 6: RB31-5 (O153:H7); Linha 7: amostra RB7-4 (ONT:H19); Linha 8: amostra 124-3 (O75:H8); Linha 9: amostra RB6-13 (O178:H7); Linha 10: amostra C8-8 (O87:H16); Linha 11: amostra 243-18 (O146:H21); Linha 12: Ladder 100pb.

Figura 4: RFLP das amostras de cães (linhas 2 a 4), bovinos (linhas 5 a 8) e coelhos (linhas 9 a 11). Linha 1: Ladder 100pb; Linha 2: amostra 13b (O167:H6); Linha 3: amostra 16b (O142:H6); Linha 4: amostra 1 (O128:H2); Linha 5: amostra 132MB 9-1 (ONT:H-, identificada como ONT:H2); Linha 6: amostra Beleza 2 (O111:H-, identificada como O111:H8); Linha 7: amostra Ficha 4 (O127:H40); Linha 8: amostra 65CC-3 (O123:H11); Linha 9: amostra 167 (O4:H1); Linha 10: amostra 129 (O103:H19); Linha 11: amostra 101 (O41:H-, identificada como O41:H20); Linha 12: Ladder 100pb.

Figura 5: RFLP de amostras isoladas de diferentes animais que amplificaram o gene *fliC*, mas que apresentaram perfil anômalo após digestão com a enzima *Rsa* I. Linha 1: Ladder 100pb; Linha 2: amostra B2N, isolada de cão (ONT:H-); Linha 3: amostra 234-7, isolada de ovino (O16:H-); Linha 4: amostra 4a, isolada de macaco (O33:H-); Linha 5: Ladder 100pb.

4.5 Clonagem e sequenciamento das amostras

Das 112 amostras animais analisadas através da técnica de PCR-RFLP, seis apresentaram um perfil molecular que não condiz com os antígenos flagelares conhecidos atualmente.

Das amostras que apresentaram um perfil diferente de RFLP, três foram selecionadas para que a clonagem e o sequenciamento fossem desenvolvidos. As três amostras selecionadas foram: 4a (proveniente de macaco), 234-7 (proveniente de ovino) e B2N (proveniente de cão). As outras três amostras que também apresentaram perfil diferente (SPA-16, B4-17 e S1, isoladas de cão) não foram clonadas e sequenciadas, pois apresentaram perfis idênticos à amostra B2N.

Foram realizados seis sequenciamentos parciais de cada amostra para obtermos o fragmento do gene *fliC* completo. A amostra 4a apresentou um fragmento sequenciado de 1561 pares de bases. Já a amostra 234-7 teve 1167 pares de bases sequenciados. A amostra B2N apresentou 1254 pares de bases sequenciados.

A análise da amostra 4a apresentou 98,6% de homologia com o gene *fliC* da amostra BP 12665 (GenBank AY250016) (WANG *et al.*, 2003), o que indica que o gene sequenciado da presente amostra é o *fliC*. O antígeno flagelar identificado pelo programa BLAST após o sequenciamento e análise comparativa da amostra 4a foi o H34, assim como o antígeno da amostra BP 12665. A amostra apresentou inserções e remoções de nucleotídeos em sua sequência, mas segundo análise do BLAST estas mudanças não foram suficientes para alterar a proteína codificada pelo gene.

A sequência do gene *fliC* da amostra 234-7 apresentou 99,6% de similaridade com a amostra O157:H10 (AF 169320.1) (SEAH e KWANG, 2000). O antígeno flagelar identificado na presente amostra foi, portanto, H10. A amostra 234-7 também apresentou remoções e inserções em sua sequência nucleotídica, mas segundo análise do BLAST, tais nucleotídeos não alteraram a proteína codificada pelo gene, gerando o antígeno flagelar H10.

O gene *fliC* sequenciado da amostra B2N apresentou 76,6% de similaridade com o gene flagelar da amostra C2187-69 (AY 250028.1) (WANG *et al.*, 2003). Mesmo com baixo índice de similaridade, o antígeno identificado foi H52, e assim como nas outras duas amostras do presente trabalho, a amostra B2N apresentou

remoções e inserções em sua sequência nucleotídica. Segundo análise do BLAST, as modificações dos nucleotídeos não alteraram a proteína codificada pelo gene *fliC*, gerando um antígeno flagelar H52.

5 DISCUSSÃO

As STEC constituem um sério problema de saúde pública ao redor do mundo (BESSER *et al.*, 1999). Entre os sorogrupos de STEC mais comumente isolados podemos citar O26, O91, O103, O111, O113, O118 e O157 (PRADEL *et al.*, 2000; GERBER *et al.*, 2002). A habilidade destas amostras em causar doenças relaciona-se à produção das toxinas Stx1 e Stx2.

Cepas de STEC podem apresentar somente um dos genes *stx* ou uma combinação entre eles (NATARO e KAPER, 1998). Dentre as 13 amostras STEC de bovinos, 53% delas apresentaram apenas o gene *stx1*; já entre 15 amostras STEC de ovinos, a maioria delas (46%) foi positiva para *stx1* e *stx2*. Estes dados são compatíveis com os relatados por Schmidt *et al.* (2001), onde cepas de STEC de diferentes sorotipos com genótipo *stx1* eram predominantes.

Em uma pesquisa realizada no Chile, Rios *et al.* (1999) também mostraram que as cepas de STEC isoladas de pacientes com diarreia aguda e naqueles que evoluíram para SHU apresentavam os genótipos *stx1/stx2* ou *stx1*. Em contrapartida, Beutin *et al.* (2004) relataram em seu estudo que o gene *stx2* está associado à elevada virulência de amostras STEC com manifestações clínicas severas. Um estudo realizado em primatas por Siegler *et al.* (2003) corrobora tal afirmação, pois foi constatado que infecções ocasionadas por amostras EHEC *stx2+* resultou em SHU na maioria das vezes, ao contrário das infecções causadas por STEC portadoras apenas de *stx1*.

No presente estudo verificamos que 41,6% das amostras isoladas de bovinos são *stx1* positivas, dado também relatado por Wieler *et al.* (1996). Estes autores observaram em seu estudo que 87,7% de suas amostras de bovinos eram portadoras apenas do gene *stx1*. Hornitzky *et al.* (2005) realizaram um estudo onde demonstraram que as fezes de bovinos são uma fonte de STEC com sorotipos e genes de virulência que mostram muitas similaridades às EHEC de pacientes humanos com doenças gastrointestinais.

Dentre as amostras STEC de bovinos, cinco foram positivas também para o gene *eae* e destas, três eram *stx1*, o que confirma os dados apresentados por Wieler *et al.* (1996), que obtiveram um maior número de amostras produtoras de Stx1 e portadoras do gene *eae* isoladas de bezerros.

Ruminantes domésticos, particularmente bovinos e ovinos compreendem uma reconhecida fonte de STEC e EPEC atípicas e representam o maior reservatório para entrada desses patógenos na população humana através da cadeia alimentar (BLANCO *et al.*, 2004).

Na América do Norte, bovinos representam os maiores reservatórios de STEC, mas em países como a Austrália, os ovinos têm maior importância como reservatório (GYLES, 2006). Djordjevic *et al.* (2001) realizaram estudos extensivos sobre a saúde e a idade do gado ovino e bovino na Austrália. Eles indicaram que esses animais produtores de carne para consumo humano armazenam uma grande variedade de amostras de STEC de diversos sorotipos, incluindo amostras O5:H-, sorotipo também utilizado no presente estudo.

Mais de 100 sorotipos de STEC foram isolados de ovinos em diversos países (BLANCO *et al.*, 2003). Amostras de *E. coli* produtoras da Toxina de Shiga também já foram isoladas de animais como cabras, cavalos, cachorros, pássaros e cervos (GYLES, 2006).

Embora a maioria dos casos de SHU em humanos venha sendo associada ao sorotipo de EHEC O157:H7 (NATARO e KAPER, 1998), sorotipos não-O157 têm se tornado mais comuns que *E. coli* O157:H7 em algumas áreas (BEUTIN *et al.*, 2004). Os humanos são mais comumente expostos a amostras de STEC não-O157, pois estas são mais encontradas em animais e como fonte de contaminação de alimentos e água (BLANCO *et al.*, 2004). Nos Estados Unidos estima-se que entre 20 e 50% das infecções humanas provocadas por STEC sejam causadas por sorotipos não-O157 (BANATVALA *et al.*, 2001).

Apesar da associação de Stx com doenças em humanos, pode-se deduzir a partir da prevalência de amostras *stx* positivas em gado, que a toxina confere vantagem seletiva à bactéria nesse hospedeiro (SPEARS *et al.*, 2006). De acordo com esta informação, trabalhos têm sugerido a hipótese de que a toxina é importante imuno-modulador no gado, seja através de efeitos diretos na resposta imune adaptativa por efeitos nos linfócitos B e T, ou através da resposta inata, prevenindo a proliferação de linfócitos intra-epiteliais (MENGE *et al.*, 1999, 2004).

Com relação ao gene *eae*, apenas quatro entre as 22 amostras fecais de ovinos foram positivas para este gene. A baixa frequência do gene *eae* entre ovinos é comumente relatada por outros autores (FEGAN e DESMARCHELIER, 1999; DJORDJEVIC *et al.*, 2001; BLANCO *et al.*, 2003). Um estudo realizado com ovinos

na Índia, por Wani *et al.* (2003) onde foram estudados animais diarreicos, a prevalência do gene *eae* foi mais elevada (26,66%). Assim, como ocorre em bovinos, sugere-se que a frequência do gene *eae* em ovinos pode estar relacionada também ao fato do animal estar sadio ou diarreico (LEOMIL *et al.*, 2003).

Dentre as amostras de bovinos estudadas, 37,5% do total foram positivas para o gene *eae*. Wieler *et al.* (1996) realizaram um estudo onde 70,1% das amostras STEC isoladas de bezerros diarreicos eram portadoras do gene *eae*, o que os fez concluir que este gene é potencialmente virulento em amostras bovinas de STEC. Em contrapartida, Oliveira *et al.* (2007) realizaram no Brasil um estudo com búfalos onde isolaram amostras STEC que não eram portadoras do gene *eae*. Tais autores sugeriram que este fato pode ser devido à associação do gene *eae* com determinados sorotipos que não foram identificados no estudo.

Os sorotipos encontrados nas amostras de ovinos desta pesquisa foram comumente relatados em outros estudos com ovinos (BLANCO *et al.*, 2003) com exceção do sorotipo O16:H-. Bettelheim *et al.* (2000) demonstraram a importância da sorotipagem das amostras isoladas de ovinos, a fim de se estabelecer associações com infecções em humanos, já que é notório o grande número de sorotipos STEC de ovinos associados com doença em humanos.

Embora cerca de 500 sorotipos de STEC já tenham sido isolados de humanos com doença (BLANCO *et al.*, 2004), menos de 10 sorogrupos são responsáveis pela maioria dos casos (GYLES, 2006).

Rey *et al.* (2003) realizaram um estudo na Espanha durante um ano, onde foram isolados 105 diferentes sorotipos entre ovinos, dentre os quais 52% já foram descritos em humanos, incluindo 24 sorotipos associados com SHU. Entre estes sorotipos, podemos destacar o sorotipo O128:H2 que foi encontrado entre nossas amostras de ovinos. Este sorotipo foi também encontrado entre as amostras de coelhos por nós estudadas, sendo esta classificada como EPEC atípica por não possuir o gene *stx*.

Dentre as amostras de cães, duas pertencem ao sorotipo O111:H25, e outras duas ao sorotipo O119:H2, enquadrando-se nos sorotipos de EPEC atípicas (TRABULSI *et al.*, 2002). A amostra do sorotipo O142:H6, pelas suas características, foi classificada como EPEC típica, podendo causar doença em humanos (NAKAZATO *et al.*, 2004).

Amostras de coelhos, cães e macacos, as quais são portadoras apenas do gene *eae* se assemelham às EPEC atípicas de origem humana. Tais amostras por não pertencerem aos mesmos sorotipos da EPEC humanas, são denominadas de Attaching and Effacing *E. coli* (AEEC) (KRAUSE *et al.*, 2005). Outros autores preferem outras denominações, como por exemplo, DEPEC (DogEPEC), REPEC (RabbitEPEC) e PEPEC(PigEPEC) (GOFFAUX *et al.*, 2000).

Até a década de 1990, as EPEC típicas eram a principal causa de diarreia infantil no Brasil, mas este fato vem se tornando cada vez mais raro (GOMES *et al.*, 1991; ROSA *et al.*, 1998). Embora poucas amostras de EHEC tenham sido isoladas na década de 1980 (GIRALDI *et al.*, 1990), estas vêm sendo encontradas com maior frequência nos últimos anos. Este fato é corroborado por Franzolin *et al.* (2005), que realizaram um estudo durante 66 semanas com 1233 crianças na cidade de Salvador, onde analisaram 175 amostras fecais, das quais foram isoladas três amostras de EHEC.

As EPEC atípicas são patógenos entéricos emergentes que têm se tornado comum em animais domésticos e em grandes surtos de intoxicação alimentar. A presente situação no Brasil está se tornando similar àquela que existe em países desenvolvidos, onde EPEC típicas são menos frequentes que EPEC atípicas e EHEC (TRABULSI *et al.*, 2002). A redução da frequência de EPEC típica no Brasil pode ser devido a uma melhoria nas condições de saneamento nos últimos anos (CAMPOS *et al.*, 2004).

Um estudo realizado na Austrália por Robins-Browne *et al.* (2004) também demonstrou que as EPEC atípicas foram os patógenos encontrados com maior frequência em pacientes de gastroenterite com menos de dez anos de idade.

Patógenos como a EPEC iniciam seu processo de colonização no intestino do hospedeiro graças à participação de alguns fatores de virulência e diferentes adesinas. O flagelo pode contribuir nessa adesão inicial, facilitando a penetração na mucosa gastrointestinal (RAMOS *et al.*, 2004). Entretanto, existem evidências de que em alguns patógenos o flagelo pode contribuir diretamente na colonização, atuando como uma adesina (ROGERS *et al.*, 2006).

Giron *et al.* (2002) mostraram através de seu estudo que amostras de EPEC mutantes para o gene *fliC* apresentaram resultados negativos em testes de adesão *in vitro*, o que os levou a acreditar que o flagelo está diretamente envolvido na adesão bacteriana. Neste estudo, amostras sem flagelo apresentaram menor

adesão e não produziram grandes colônias em cultura celular após três horas de infecção, quando comparadas com amostras selvagens.

Erdem *et al.* (2007) também relataram que mutações no gene *fliC* de amostras de EPEC e EHEC resultaram em menor aderência às células do epitélio intestinal de bovino. Eles observaram ainda que a capacidade de aderência apresentada pelos flagelos H6 e H7 é de suma importância para a colonização do hospedeiro.

Mahajan *et al.* (2009) realizaram um estudo sobre a colonização de *E. coli* O157:H7 no epitélio intestinal, e observaram que a ligação inicial da bactéria às células epiteliais é mediada pelo flagelo, através da formação de pontos de contato diretamente na superfície celular. Eles também notaram que a expressão do flagelo diminuiu a partir do momento que as bactérias formaram colônias e os agregados de actina começaram a beneficiar as bactérias aderidas. De acordo com os resultados encontrados, eles concluíram que o flagelo H7 é importante nos estágios iniciais de colonização, e as adesinas LEE-dependentes passam a ter importância no segundo estágio da infecção, durante a modificação da função celular do hospedeiro.

O método clássico de soroaglutinação utilizado na determinação do antígeno H é trabalhoso e demanda muito tempo, sendo realizado apenas em um pequeno número de laboratórios de referência. A determinação do antígeno H por soroaglutinação exige que as amostras a serem examinadas sofram várias passagens em agar semi-sólido para ativar a motilidade e conseqüentemente a maior produção de flagelos ou de antígeno H imunorreativo para poder proceder a soroaglutinação. Tal fato aumenta muito o tempo necessário para a determinação do antígeno flagelar, resultando em atraso nas investigações epidemiológicas (EWING, 1986).

Outro problema do método clássico de soroaglutinação pode surgir de reações cruzadas entre antígenos de superfície da amostra estudada, o que pode gerar resultados falso-positivos. Além disso, o alto número de soros necessários para a detecção dos grupos O de *E. coli* (O1 a O181) e antígenos H (H1 ao H56) é um fator limitante para que a sorotipagem seja um método de rotina em laboratórios não especializados (ØRSKOV e ØRSKOV, 1992).

Muitas amostras de *E. coli*, incluindo algumas STEC, possuem antígenos O ou H, ou ambos, que não foram identificados pelo método de soroaglutinação usado internacionalmente e, desta maneira, não podem ser sorotipadas (GYLES, 2006).

Devido a essas e outras dificuldades encontradas, os genes da flagelina têm sido muito utilizados para detecção e identificação de bactérias devido às variações genéticas entre espécies (WHITTAM, 1995).

A maioria das amostras imóveis de EPEC e STEC aqui estudadas apresentou perfis de RFLP idênticos aos perfis de amostras móveis e aos perfis observados para as cepas padrão de antígeno H, enfatizando a capacidade do método de PCR-RFLP em classificar amostras imóveis de *E. coli* quanto ao gene da flagelina que carregam. Pela metodologia clássica de soroaglutinação para determinação do antígeno H essa classificação não é possível. Fields *et al.* (1997), Botelho *et al.* (2003), Amhaz *et al.* (2004), Beutin *et al.* (2004) e Ramos Moreno *et al.* (2006) também fizeram uso da PCR-RFLP para determinar o perfil de *fliC* das cepas imóveis estudadas.

Machado *et al.* (2000) realizaram um estudo com 182 amostras a fim de caracterizar os genes flagelares de *E. coli* através dos padrões de restrição das sequências amplificadas. Estes autores relataram que o gene *fliC* foi amplificado em todas as amostras e que a análise de restrição com a enzima *Hha* I pode ser utilizada como um sistema de identificação flagelar.

Sonntag *et al.* (2004) aplicaram a técnica de PCR-RFLP para caracterizar o gene *fliC* de 116 amostras imóveis de EHEC O145 isoladas de pacientes em estudos epidemiológicos na Alemanha. A análise dos perfis obtidos demonstrou que as amostras pertenciam a dois grupos distintos: o sorotipo O145:H25 foi encontrado em apenas três amostras imóveis; já o sorotipo O145:H28 foi encontrado nas 113 amostras restantes analisadas.

Comparando nossos resultados com a literatura (FIELDS *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2000; BOTELHO *et al.*, 2003), observamos uma fidelidade do perfil de restrição dos diferentes alelos de *fliC*, independente da categoria diarreiogênica de *E. coli*, sendo que a maioria dos perfis moleculares obtidos para as amostras de EPEC estudadas foi igual aos perfis observados para amostras não EPEC com os mesmos antígenos flagelares.

Uma alta porcentagem de sorotipos de STEC são mutantes imóveis (NM) de amostras que possuem o antígeno H. Estudos adicionais podem determinar os sorotipos aos quais estas amostras imóveis pertencem, ou então identificar diferenças entre os sorotipos imóveis julgados semelhantes através do método da soroaglutinação (GYLES, 2006). Amostras imóveis geralmente possuem o gene

estrutural do flagelo, mas não são aptas a construir um flagelo funcional (MACNAB, 1992).

Neste trabalho analisamos o perfil genético da flagelina de 23 amostras imóveis. Amostras imóveis não podem ser analisadas pela sorotipagem clássica de antígenos H de *E. coli* porque tais amostras possuem o gene *fliC* críptico, e não são capazes de expressar o antígeno H. Portanto, PCR-RFLP representa um método alternativo para caracterizar amostras imóveis (RAMOS MORENO *et al.*, 2006).

O antígeno flagelar H7 tem sido determinado através da análise do perfil de restrição da flagelina amplificada, o que facilita a identificação de EHEC do sorotipo O157:H7, sendo a amostra analisada móvel ou imóvel. Fields *et al.* (1997) comprovaram através de seu estudo que amostras O157:NM que produziam a Toxina de Shiga eram portadoras do gene flagelar H7.

Beutin e Strauch (2007) observaram que o genótipo do gene *fliC* para o antígeno H8 é altamente conservado em amostras que pertencem aos sorogrupos O8, O22, O111, O174 e O179 de STEC. Estes autores desenvolveram uma reação específica de PCR para o antígeno H8 e relataram que esta pode ser utilizada como diagnóstico de amostras isoladas de diferentes origens. O presente estudo analisou duas amostras isoladas de bovinos pertencentes ao sorogrupo O111 e ambas apresentaram o antígeno H8 após o teste de PCR-RFLP, o que confirma os dados descritos acima.

A técnica de PCR-RFLP provou ser mais rápida que a sorotipagem tradicional para identificação de antígenos H de *E. coli*, levando apenas dois dias para a técnica ser realizada, ao invés dos sete dias ou mais necessários para a realização da sorotipagem clássica (RAMOS MORENO *et al.*, 2006).

Durante seu estudo, Ramos Moreno *et al.* (2006) encontraram quatro amostras que apresentaram resultados discrepantes entre seu antígeno H e o padrão de *fliC*-RFLP. Tais amostras foram novamente submetidas à sorotipagem. Todas reagiram com o antígeno esperado após análise do padrão de RFLP. Estes resultados confirmam a afirmação de que a análise do *fliC* através do método de PCR-RFLP é um método eficiente e fidedigno para a caracterização deste gene em amostras de *E. coli*.

Das 112 amostras de nosso estudo, 14 delas não amplificaram o gene *fliC*, mesmo quando submetidas a diferentes condições da PCR. Este fato foi também observado por Botelho *et al.* (2003) em 11 amostras e Ramos Moreno *et al.* (2006),

com nove amostras que não amplificaram o gene *fliC*. Ambos concluíram que o ocorrido pode ser devido à ausência do gene flagelar na amostra ou a uma homologia inadequada do par de iniciadores.

Em estudo sobre a variabilidade do gene *fliC*, Wang *et al.* (2003) encontraram quatro amostras que não amplificaram o gene através da PCR. Duas delas apresentavam elementos de inserção; outras duas apresentavam sequências de nucleotídeos deletadas, impedindo sua amplificação por PCR.

O presente estudo analisou seis amostras que não apresentaram identidade molecular com os padrões de antígenos flagelares conhecidos, dados previamente encontrados por diferentes autores. Botelho *et al.* (2003) estudaram oito amostras que também apresentaram padrões diferentes, e concluíram que tais amostras poderiam corresponder a sorotipos que são raros ou inexistentes no Brasil.

Winstanley e Morgan (1997) relataram que a variabilidade nos padrões de RFLP deve ser interpretada com cautela, pois mutações de um único nucleotídeo podem ser responsáveis por tais diferenças.

O estudo realizado por Amhaz *et al.* (2004) seqüenciou o gene *fliC* de diferentes amostras de EIEC. Tais autores observaram que as regiões N-terminal e C-terminal deste gene são altamente conservadas, e a região central é altamente variável. Eles encontraram mutações pontuais, inserções e remoções nas amostras sequenciadas, o que pode ter ocasionado uma parada prematura na tradução do gene ou então um defeito na construção do flagelo, resultando num antígeno flagelar imóvel.

Os três antígenos flagelares sequenciados no presente estudo também apresentaram inserções e remoções de nucleotídeos, o que corrobora os dados encontrados por Amhaz *et al.* (2004). Botelho *et al.* (2003) encontraram uma diferença de apenas sete aminoácidos entre os antígenos H2 e H35. De acordo com este resultado, os autores concluíram que as diferenças sorológicas entre os antígenos H se devem a mínimas alterações em sua sequência protéica.

Dois dos antígenos flagelares sequenciados (4a e 234-7) apresentaram poucas diferenças na sequência de nucleotídeos, porém tais inserções e remoções não foram suficientes para alterar a proteína gerada pelo programa BLAST. Desta forma, podemos inferir que os perfis anômalos dos antígenos flagelares gerados na técnica de PCR-RFLP podem ter sido originados devido às alterações nucleotídicas em suas sequências.

A amostra B2N apresentou somente 76,6% de similaridade com C2187-69 (AY 250028.1) (WANG *et al.*, 2003). A baixa homologia pode ser devido à presença de uma única sequência do antígeno H52 no BLAST para comparação. Mesmo com baixa similaridade, as diferenças de nucleotídeos não foram significativas, pois a proteína da amostra B2N gerada pelo BLAST foi o antígeno flagelar H52.

A transferência horizontal do gene *fliC* pode contribuir para a diversidade dos sorotipos flagelares devido a recombinação entre amostras de *E. coli*. O sistema imune do hospedeiro é o principal fator da seleção e evolução contínua de novos antígenos flagelares (REID *et al.*, 1999).

Os sorotipos das amostras de *E. coli* animais que foram estudadas neste projeto já foram relatadas como causadoras de doenças em humanos e animais. O gene flagelar foi utilizado para estudo de complementação da tipificação sorológica dos antígenos H, também devido ao comprovado potencial desta estrutura em causar a adesão da bactéria à célula hospedeira (GIRON *et al.*, 2002) e porque este foi um sistema comparativo compreendendo várias espécies de animais.

A tipagem sorológica de uma amostra através do método de PCR-RFLP permite a identificação do antígeno H em aproximadamente dois dias, sendo particularmente importante em investigações epidemiológicas que necessitam de rápidas informações a respeito do antígeno flagelar das amostras envolvidas.

De acordo com os resultados aqui apresentados, podemos afirmar que a metodologia aplicada é eficiente e encontra-se em conformidade com a metodologia de sorotipagem clássica.

6 CONCLUSÕES

- A presente pesquisa demonstrou ser um eficiente sistema comparativo utilizando o gene flagelar, compreendendo um número abrangente de amostras de STEC e EPEC de diferentes animais.

- A técnica de PCR-RFLP provou ser mais rápida que a sorotipagem tradicional para identificação de antígenos H de *E. coli*, levando dois dias para a técnica ser completamente realizada.

- A maioria das amostras imóveis estudadas apresentou perfis de RFLP idênticos aos perfis de amostras móveis, enfatizando a capacidade do método de PCR-RFLP em classificar amostras imóveis de *E. coli* quanto ao gene da flagelina que carregam.

- De acordo com os resultados do programa BLAST após o sequenciamento das amostras B2N, 4a e 234-7, podemos inferir que as alterações nucleotídicas do gene *fliC* não foram suficientes para alterar a proteína gerada.

- Os três antígenos flagelares imóveis sequenciados apresentaram inserções e remoções de nucleotídeos, o que pode ter causado uma parada prematura na tradução do gene ou então um defeito na construção de um flagelo funcional.

- A metodologia de PCR-RFLP para o gene *fliC* aplicada nas amostras de *Escherichia coli* é eficiente e encontra-se em conformidade com a metodologia de sorotipagem clássica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AIDAR-UGRINOVICH, L.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; LEOMIL, L.; DAHBI, G.; MORA, A.; ONUMA, D. L.; SILVEIRA, W. D.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 115, p. 297-306, 2007.

AMHAZ, J. M. K.; ANDRADE, A.; BANDO, S. Y.; TANAKA, T. L.; MOREIRA-FILHO, C. A.; MARTINEZ, M. B. Molecular typing and phylogenetic analysis of Enteroinvasive *Escherichia coli* using the *flhC* gene sequence. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 235, p. 259-264, 2004.

BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M.; CANDY, D. C.; MOON, H. W. Plasmid-mediated adhesion in Enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 2, p. 534-538, 1983.

BANATVALA, N.; GRIFFIN, P. M.; GREENE, K. D.; BARRET, T. J.; BIBB, W. F.; GREEN, J. H.; WELLS, J. G.; THE HEMOLYTIC UREMIC SYNDROME STUDY COLABORATORS. The United States National prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical and epidemiological findings. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 1063-1070, 2001.

BARNICH, N.; BOUDEAU, J.; CLARET, L.; DARFEUILLE- MICHAUD, A. Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. **Mol. Microbiol.**, v. 48, p. 781-794, 2003.

BESSER, R. E.; GRITFIN, P.M.; SLUTSKER, L. *Escherichia coli* O157:H7 gastroenteritis and the hemolytic uremic syndrome: an emerging infectious disease. **Annu. Rev. Med.**, v. 50, p. 355-367, 1999.

BEST, A.; LA RAGIONE, R. M.; SAYERS, A. R.; WOODWARD, M. J. Role for flagella but not intimin in the persistent infection of the gastrointestinal tissues of specific-pathogen-free chicks by Shiga toxin-negative *Escherichia coli* O157:H7. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 1836-1846, 2005.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BETTELHEIM, K. A.; BENSINK, J. C.; TAMBUNAM, H. S. Serotypes of Verocytotoxin-producing (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli* isolated from healthy sheep. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 23, p. 1-7, 2000.

BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRUCK, H.; ZIMMERMANN, S.; SCHEUTZ, F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 2483-2488, 1993.

BEUTIN, L.; KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; KAULFUSS, S.; GLEIER, K. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 1099-1108, 2004.

BEUTIN, L.; STRAUCH, E. Identification of sequence diversity in the *Escherichia coli* *fliC* genes encoding flagellar types H8 and H40 and its use in typing of Shiga toxin-producing *E. coli* O8, O22, O111, O174, and O179 strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 333-339, 2007.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; REY, J.; ALONSO, J. M.; HERMOSO, M.; HERMOSO, J.; ALONSO, M. P.; DAHBI, G.; GONZALEZ, E. A.; BERNARDEZ, M. I.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1351-1356, 2003.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; DAHBI, G.; ALONSO, M. P.; GONZÁLEZ, E. A.; BERNÁRDEZ, M. I.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-ξ*). **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 645-651, 2004.

BOTELHO, B. A.; BANDO, S. Y.; TRABULSI, L. R.; MOREIRA-FILHO, C. A. Identification of EPEC and non-EPEC serotypes in the EPEC O serogroups by PCR-RFLP analysis of the *fliC* gene. **J. Microbiol. Methods**, v. 54, p. 87-93, 2003.

CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional Enteropathogenic *E. coli* O serogroups – A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 545-552, 2004.

CARVALHO, V. M.; GYLES, C. L.; ZIEBELL, K.; RIBEIRO, M. A.; CATÃO-DIAS, J. L.; SINHORINI, I. L.; OTMAN, J.; KELLER, R.; TRABULSI, L. R.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Characterization of monkey Enteropathogenic *Escherichia coli*

(EPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from neotropical nonhuman primates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1225–1234, 2003.

CHEN, H. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unraveling pathogenesis. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 29, p. 83-98, 2005.

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

DJORDJEVIC, S. P.; HORNITZKY, M. A.; BAILEY, M.; GILL, P.; VANSELOW, B.; WALKER, K.; BETTELHEIM, K. A. Virulence properties and serotypes of Shiga Toxin- producing *Escherichia coli* from healthy Australian slaughter-age sheep. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 2017-2021, 2001.

DONNENBERG, M. S.; TACKET, C. O.; JAMES, S. P.; LOSONSKY, G.; NATARO, J. P.; WASSERMAN, S. S.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M. The role of the *eaeA* gene in experimental Enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **J. Clin. Invest.**, v. 92, p. 1412-1417, 1993.

ERDEM, A. L.; AVELINO, F.; XICOHTENCATL-CORTES, J.; GIRÓN, J. A. Host protein binding and adhesives properties of H6 and H7 flagella of Attaching and Effacing *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 189, p. 7426-7435, 2007.

EWING, W. H. **Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae**. 4. ed. New York: Elsevier Publishing CO., 1986. 536 p.

FEGAN, N.; DESMARCHELIER, P. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep and pre-slaughter lambs in Eastern Australia. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 28, p. 335-339, 1999.

FIELDS, P. I.; BLOM, K.; HUGHES, H. J.; HELSEL, L. O.; FENG, P.; SWAMINATHAN, B. Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and a development of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism test for identification of *E. coli* O157:H7 and O157:NM. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 1066-1070, 1997.

FRANZOLIN, M. R.; ALVES, R. C.; KELLER, R.; GOMES, T. A.; BEUTIN, L.; BARRETO, M. L.; MILROY, C.; STRINA, A.; RIBEIRO, H.; TRABULSI, L. R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 359-363, 2005.

GANNON, V. P.; RASHED, M.; KING, R. K.; THOMAS, E. J. Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using Polymerase Chain Reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 1268-1274, 1993.

GERBER, A.; KARCH, H.; ALLERBERGER, F.; VERWEYEN, H. M.; ZIMMERHACKL, L. B. Clinical course and the role of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the Hemolytic-Uremic Syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 493-500, 2002.

GIRALDI, R.; GUTH, B. E. C.; TRABULSI, L. R. Production of Shiga toxin among *Escherichia coli* strains and other bacteria isolated from diarrhea in São Paulo, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p. 1460-1462, 1990.

GIRON, J. A.; HO, A. S. Y.; SCHOOLNIK, G. K. An inducible bundle forming pilus of Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 254, p. 710-713, 1991.

GIRON, J. A.; TORRES, A. G.; FREER, E.; KAPER, J. B. The flagella of Enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. **Mol. Microbiol.**, v. 44, p. 361-379, 2002.

GOMES, T. A. T.; RASSI, V.; MacDONALD, K. L.; RAMOS, S. R.; TRABULSI, L. R.; VIEIRA, M. A. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 164, p. 331-337, 1991.

GOFFAUX, F.; CHINA, B.; JANSSEN, L.; MAINIL, J. Genotypic characterization of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated in Belgium from dogs and cats. **Res. Microbiol.**, v. 151, p. 865-871, 2000.

GOOSNEY, D. L.; GRADO, M.; FINLAY, B. Putting *E. coli* on a pedestal: a unique system to study signal transduction and the actin cytoskeleton. **Trends Cell Biol.**, v. 9, p. 11-14, 1999.

GYLES, C. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. **J. Anim. Sci.**, v. 85, p. E45-E62, 2006.

HORNITZKY, M. A.; MERCIECA, K.; BETTELHEIM, K. A.; DJORDJEVIC, S. P. Bovine feces from animals with gastrointestinal infections are a source of serologically diverse atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* strains that commonly possess intimin. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 3405-3412, 2005.

HUGHES, K. T.; GILLEN, K. L.; SEMON, M. J.; KARLINSEY, J. E. Sensing structural intermediates in bacterial assembly by export of a negative regulator. **Science**, v. 262, p. 1277-1280, 1993.

HYMAN, H. C., TRACHTENBERG, S. Point mutations that lock *Salmonella typhimurium* flagellar filaments in the straight right-handed and left-handed forms and their relation to filament superhelicity. **J. Mol. Biol.**, v. 220, p. 79-88, 1991.

IINO, T.; KOMEDA, Y.; KITSUKAKE, K.; MACNAB, R. M.; MATSUMURA, P.; PARKINSON, J. S.; SIMON, M. I.; YAMAGUCHI, S. New unified nomenclature for the flagellar genes of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Microbiol. Rev.**, v. 52, p. 533-535, 1988.

JERSE, A. E.; YU, J.; TALL, B. D.; KAPER, J. B. A genetic locus of Enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of Attaching and Effacing lesions on tissue culture cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 7839-7843, 1990.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KARMALI, M. A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 2, p. 15-38, 1989.

KHAN, S. Gene to ultrastructure: the case of the flagellar basal body. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 2169-2174, 1993.

KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; BEUTIN, L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin-(*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. **Vet. Microbiol.**, v. 106, p. 87-95, 2005.

LA RAGIONE, R. M.; SAYERS, A. R.; WOODWARD, M. J. The role of fimbriae and flagella in the colonization, invasion and persistence of *Escherichia coli* O78: K80 in the day-old-chick model. **Epidemiol. Infect.**, v. 124, p. 351-163, 2000.

LAWN, A. M. Morphological distinction between different H serotypes of *Escherichia coli*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 101, p. 111-119, 1997.

LEOMIL, L.; AIDAR-UGRINOVICH, L.; GUTH, B. E. C.; IRINO, K.; VETTORATO, M. P.; ONUMA, D. L.; DE CASTRO, A. F. P. Frequency of Shiga toxin-producing

Escherichia coli (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 97, p. 103-109, 2003.

LEOMIL, L.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; KRAUSE, G.; SCHMIDT, H.; BEUTIN, L. Characterization of two major groups of diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains which are globally spread in human patients and domestic animals of different species. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 249, p. 335-342, 2005.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. **J. Inf. Dis.**, v. 155, p. 377-389, 1987.

LIOR, H. Classification of *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L (Ed.). ***Escherichia coli in domestic animals and humans***. Wallingford: CAB International, 1996. p. 31-72.

MACHADO, J.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D. Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fljC* gene. **Res. Microbiol.**, v. 151, p. 535-546, 2000.

MACNAB, R. M. Genetics and biogenesis of bacterial flagella. **Annu. Rev. Genet.**, v. 26, p. 129-156, 1992.

MACNAB, R. M. Flagella and motility. In: NEIDHARDT, F. C.; CURTISS III, R.; INGRAHAM, J. L.; LIN, E. C. C.; LOW, K. B.; MAGASANIK, B.; REZNIKOFF, W. S.; RILEY, M.; SCHAECHTER, M.; UMBARGER, H. E. (Ed.). ***Escherichia and Salmonella: cellular and molecular biology***. Washington: American Society for Microbiology, 1996. p.123-145.

MAHAJAN, A.; CURRIE, C. G.; MACKIE, S.; TREE, J.; McKENDRICK, I.; McNEILLY, T. N.; ROE, A.; LA RAGIONE, R. M.; WOODWARD, M. J.; GALLY, D. L.; SMITH, D. G. E. An investigation of the expression and adhesin function of H7 flagella in the interaction of *Escherichia coli* O157:H7 with the intestinal epithelium. **Cell. Microbiol.**, v. 11, p. 121-137, 2009.

MARTINEZ, M. B.; WHITTAM, T. S.; McGRAW, E. A.; RODRIGUES, J.; TRABULSI, L. R. Clonal relationship among invasive and non-invasive strains of Enteroinvasive *Escherichia coli* serogroups. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 172, p. 145-151, 1999.

MELTON-CELSA, A. R.; O'BRIEN, A. Structure, biology, and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D.

(Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains.** Washington: American Society for Microbiology, 1998. p. 121-128.

MENGE, C.; WIELER, L. H.; SCHLAPP, T.; BALJER, G. Shiga toxin 1 from *Escherichia coli* blocks activation and proliferation of bovine lymphocyte subpopulations *in vitro*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2209-2217, 1999.

MENGE, C.; STAMM, I.; VAN DIEMEN, P. M.; SOPP, P.; BALJER, G.; WALLIS, T. S.; STEVENS, M. P. Phenotypic and functional characterization of intraepithelial lymphocytes in a bovine ligated intestinal loop model of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 573-579, 2004.

MOYER, M. P.; DIXON, P. S.; ROTHMAN, S. W.; BROWN, J. E. Citotoxicity of Shiga toxin for primary cultures of human colonic and ileal epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 55, p. 1533-1535, 1987.

NAKAZATO, G.; GYLES, C.; ZIEBELL, K.; KELLER, R.; TRABULSI, L. R.; GOMES, T. A.; IRINO, K.; DA SILVEIRA, W. D.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Attaching and Effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human Enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Vet. Microbiol.**, v. 101, p. 269-277, 2004.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p. 142-201, 1998.

O'BRIEN, A. D.; HOLMES, R. K. Shiga and Shiga-like toxins. **Microbiol. Rev.**, v. 51, p. 206-220, 1987.

O'BRIEN, A. D.; KAPER, J. B. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: yesterday, today and tomorrow. In: KAPER, J. B.; O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains.** Washington: ASM Press, 1998. p. 1-11.

OLIVEIRA, M. G.; BRITO, J. R. F.; CARVALHO, R. R.; GUTH, B. E. C.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; KATO, M. A. M. F.; RAMOS, I. I.; VAZ, T. M. I.; IRINO, K. Water buffaloes (*Bubalus bubalis*) identified as an important reservoir of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Brazil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 5945-5948, 2007.

ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. **Can. J. Microbiol.**, v. 38, p. 699-704, 1992.

OSWALD, E.; SCHMIDT, H.; MORABITO, S.; KARCH, H.; MARCHÈS, O.; CAPRIOLI, A. Typing of intimin genes in human and animal Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 64-71, 2000.

PENTEADO, A. S.; AIDAR-UGRINOVICH, L.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; ANDRADE, J. R.; CORREA, S. S.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Serotypes and virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits in Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 89, p. 41-51, 2002.

PRADEL, N.; LIVRELLI, V.; DE CHAMPS, C.; PALCOUX, J.B.; REYNAUD, A.; SCHEUTZ, F.; SIROT, J.; JOLY, B.; FORESTIER, C. Prevalence and characterization of Shiga toxin-Producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 1023-1031, 2000.

RAMOS, H. C.; RUMBO, M.; SIRARD, J. C. Bacterial flagellin: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. **Trends Microbiol.**, v. 12, p. 509-517, 2004.

RAMOS MORENO, A. C.; GUTH, B. E. C.; MARTINEZ, M. B. Can the fliC PCR-Restriction Length Polymorphism Technique replace classic serotyping methods for characterization the H antigen of Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains? **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 1453-1458, 2006.

REGUA-MANGIA, A. H.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; ANDRADE, J. R. C.; IRINO, K.; TEIXEIRA, L. M. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Infect.**, v. 48, p. 161-167, 2004.

REID, S. D.; SELANDER, R. K.; WHITTAM, T. S. Sequence diversity of flagellin alleles in pathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** v. 181, p. 153-160, 1999.

REY, J.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; MORA, A.; DAHBI, G.; ALONSO, J. M.; HERMOSO, M.; HERMOSO, J.; ALONSO, M. P.; USERA, M. A.; GONZÁLEZ, E. A.; BERNÁRDEZ, M. I.; BLANCO, J. Serotypes, phage types and virulence genes of Shiga-producing *Escherichia coli* isolated from sheep in Spain. **Vet. Microbiol.**, v. 94, p. 47-56, 2003.

RIOS, M.; PRADO, V.; TRUCKSIS, M.; ARELLANO, C.; BORIE, C.; ALEXANDRE, M. FICA A.; LEVINE, M. M. Clonal diversity of Chilean isolates of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic

subjects, animal reservoirs, and food products. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 778-781, 1999.

ROBINS-BROWNE, R. M.; BORDUN, A. M.; TAUSCHEK, M.; BENNETT-WOOD, V.; RUSSEL, J.; OPPEDISANO, F.; LISTER, N. A.; BETTELHEIM, K. A.; FAIRLEY, C. K.; SINCLAIR, M. I.; HELLARD, M. E. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, p. 1797-1805, 2004.

RODRIGUES, J.; SCALETSKY, I. C. A.; CAMPOS, L. C.; GOMES, T. A. T.; WHITTAM, T. S.; TRABULSI, L. R. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2680-2686, 1996.

ROGERS, T. J.; PATON, J. C.; WANG, H.; TALBOT, U. M.; PATON, A. W. Reduced virulence of a *fliC* mutant of Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* O113:H21. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 1962-1966, 2006.

ROSA, A. C.; MARIANO, A. T.; PEREIRA, A. M.; TIBANA, A.; GOMES, T. A. T.; ANDRADE, J. R. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v. 47, p. 781-790, 1998.

ROSENSHINE I.; RUSCHKOWSKI, S.; STEIN, M.; REINSCHIED, D. J.; MILLS, S. D.; FINLAY, B. B. A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. **Embo J.**, v. 15, p. 2613-2624, 1996.

SCALETISKY, I. C. A.; SILVA, M. L.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of Enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 45, p. 534-536, 1984.

SCHMIDT, H.; BITZAN, M.; KARCH, H. Pathogenic aspects of Shiga toxin-producing *E. coli* infections in humans. In: DUFFY, G.; GARVEY, P.; McDOWELL, D. (Ed.). **Verocytotoxigenic Escherichia coli**. Trumbull: Food and Nutrition Press Inc., 2001. p. 241-262.

SEAH, J. N.; KWANG, J. Identification of H-specific determinants in flagellin of four *Escherichia coli* strains. **Arch. Microbiol.**, v. 174, p. 28-34, 2000.

SIEGLER, R. L.; OBRIG, T. G.; PYSHER, T. J.; TESH, V. L.; DENKERS, N. D.; TAYLOR, F. B. Response to Shiga toxin 1 and 2 in a baboon model of hemolytic uremic syndrome. **Pediatr. Nephrol.**, v. 18, p. 92-96, 2003.

SONNTAG, A. K.; PRAGER, R.; BIELASZEWSKA, M.; ZHANG, W.; FRUTH, A.; TSCHÄPE, H.; KARCH, H. Phenotypic and genotypic analyses of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 strains from patients in Germany. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 954-962, 2004.

SPEARS, K. J.; ROE, A. J.; GALLY, D. L. A comparison of Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 255, p. 187-202, 2006.

TOBE, T.; SASAKAWA, C. Role of bundle forming pilus of Enteropathogenic *Escherichia coli* in host cell adherence and in microcolony development. **Cell Microbiol.**, v. 3, p. 579-585, 2001.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 508-513, 2002.

VETTORATO, M. P.; LEOMIL, L.; GUTH, B. E. C.; IRINO, K.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from sheep in the State of Sao Paulo, Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 95, p. 103-109, 2003.

WANG, L.; ROTHEMUND, D.; CURD, H.; REEVES, P. R. Species-wide variation in the *Escherichia coli* flagellin. **J. Microbiol.**, v. 185, p. 2936-2943, 2003.

WANI, S. A.; BHAT, M. A.; SAMANTA, I.; NISHIKAWA, Y.; BUCHH, A. S. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from calves and lambs with diarrhea in India. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 37, p. 121-126, 2003.

WHITTAM, T. S. Genetic population structure and pathogenicity in enteric bacteria. In: BAUMBERG, S.; YONG, J. P. W.; WELLINGTON, E. M. H.; SAUNDERS, J. R. (Ed.). **Population genetics of bacteria**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p. 217-245.

WIELER, L. H.; VIELER, E.; ERPENSTEIN, C.; SCHLAPP, T.; STEINRÜCK, H.; BAUERFEIND, R.; BYOMI, A.; BALJER, G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of *eae* and other genes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 2980-2984, 1996.

WINSTANLEY, C.; MORGAN, A. W. The bacterial flagellin gene as a biomarker for detection, population genetics and epidemiological analysis. **Microbiology**, v. 143, p. 3071-3084, 1997.

ZHANG, W.; BIELASZEWSKA, M.; BOCKEMUHL, J.; SCHEUTZ, F.; KARCH, H. Molecular analysis of H antigens reveals that human diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains that carry the *eae* gene belong to the H11 clonal complex. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 2989-2993, 2000.