VERÔNICA DE FRANCO RENNÓ

**UM MECANISMO: INVASÃO DE CÉLULAS EPITELIAIS POR
AMOSTRAS DE *Escherichia coli* ENTEROHEMORRÁGICAS
(EHEC) LEE-NEGATIVAS**

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Microbiologia
do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre
em Ciências Biomédicas**

São Paulo

2008

VERÔNICA DE FRANCO RENNÓ

**UM MECANISMO: INVASÃO DE CÉLULAS EPITELIAS POR
AMOSTRAS DE *Escherichia coli* ENTEROHEMORRÁGICA
(EHEC) LEE-NEGATIVAS**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências Biomédicas**

Área de Concentração: Microbiologia

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Fernando
Pestana de Castro**

São Paulo

2008

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

© reprodução parcial

Renno, Verônica de Franco.

Um mecanismo: invasão de células epiteliais por amostras de
Escherichia coli Enterohemorrágicas (EHEC) LEE-negativas /
Verônica de Franco Renno. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Antonio Fernando Pestana de Castro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de
concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: *Escherichia coli*
enteropatogênica de origem animal.

Versão do título para o inglês: A mechanism: invasion of epithelial
cells by LEE-negative Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)
strains.

Descritores: 1. *Escherichia coli* enterohemorrágica 2. LEE-negativa
3. Invasão 4. Citocalasina D 5. Adesão em células Caco-2 6. SHU
I. Pestana de Castro, Antonio Fernando II. Universidade de São
Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação
em Microbiologia. III. Título.

ICB/SBIB059/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Verônica de Franco Renno.

Título da Tese: Um mecanismo: invasão de células epiteliais por amostras de *Escherichia coli* Enterohemorrágicas (EHEC) LEE-negativas.

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:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 122, referente ao projeto intitulado "*Um mecanismo: Invasão de células epiteliais por amostras de Escherichia coli Enterohemorrágica (EHEC) LEE-negativas*" sob a responsabilidade de Verônica De Franco Rennó, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 16 de novembro de 2005.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Vice Coordenador em Exercício
CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da CEPSh - ICB/USP

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais, minha Avó Márcia, meus irmãos
e familiares pelo constante incentivo, e apoio
incondicional para a minha formação.**

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar saúde, força e condição de levar este trabalho até o fim. E especialmente por Sua presença em todos os momentos da minha vida.

Ao orientador, Prof. Pestana, guia científico.

Ao Laboratório de Microbiologia Médica e Veterinária que me recebeu de braços abertos desde o primeiro dia de estágio (Luciana, Ylanna, Claudia, Eliana, Lika e Rodrigo).

Às amigas Ylanna, Luciana e Claudia, obrigada pela convivência, papos, risadas, pelo grande apoio e ajuda no sentido científico e pessoal.

Aos meus incríveis amigos de São Paulo e de Santa Rita, que juntamente com meus familiares não me deixaram desistir nas horas difíceis e tornam-se hoje parte de mais uma importante etapa de minha vida.

Ao Prof. João Ramos Costa Andrade da UERJ, pelo constante apoio, pela co-orientação e ajuda em minha formação científica.

Ao Prof. Mário Júlio Ávila Campos e Alice, pela compreensão.

E por fim, minha sincera gratidão aos queridos Tia Janete, Tio Márcio, Tia Carmem Sylvia, Tio Galeno, e suas respectivas famílias que me acolheram em São Paulo como se fossem meus verdadeiros pais.

RESUMO

RENNO, V.F. **Um mecanismo: Invasão de células epiteliais por amostras de *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC) LEE-negativas.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2008.

As *Escherichia coli* enterohemorrágicas (EHEC) são importantes patógenos humanos por causarem doenças que vão desde diarreia até Síndrome Hemolítico-Urêmica (SHU). Dentre as EHEC associadas à SHU, a maioria possui o LEE (Locus of Enterocyte Effacement), uma Ilha de Patogenicidade (PAI) na qual se encontram genes capazes de induzir lesões “Attaching and Effacing (A/E)” na mucosa intestinal. Embora o LEE seja importante para a colonização do hospedeiro, sorotipos de EHEC que não possuem LEE são frequentemente isolados de pacientes com doença severa. Muitos genes têm sido descritos como auxiliares na adesão deste patógeno às células do hospedeiro. Além disso, alguns sorotipos de EHEC LEE - negativas têm sido encontrados intracelularmente. Desta maneira, a habilidade de invasão em amostras relacionadas com SHU tem sido estudada, bem como a determinação do perfil genético “extra-LEE” capaz de favorecer e proporcionar a determinadas amostras o fenótipo invasor. Neste estudo foram pesquisados fatores de virulência de amostras LEE-negativas descritas como causadoras de SHU em humanos, bem como o padrão de adesão e o perfil de invasão em células epiteliais HEp-2 e Caco-2. Das nove amostras isoladas de ovinos e bovinos, quatro (44,5%) apresentaram o perfil *stx*₂⁺. Todas foram *lpfA*⁺ e *iha*⁺, genes que codificam para “long polar fimbriae” e “adherence-conferring protein”. Somente três amostras (33,3%) foram *saa*⁺ e cinco foram *Ehly*⁺ que codificam “autoagglutinating adhesin” e “Enterohemolisina”. Já para o gene *tox*B todas as amostras foram negativas. Em relação à adesão, observamos que a maioria das amostras apresentou um padrão de adesão difusa em células HEp-2, e em Caco-2 apresentaram aderência positiva com vários graus de intensidade. Avaliando a invasão, observamos que as células HEp-2 não foram permissivas à internalização das bactérias testadas. Ao contrário, em células Caco-2, a maioria das amostras testadas apresentou um perfil invasor maior que 3,3%. Frente ao inibidor de polimerização de actina Citocalasina D, houve uma significativa redução nos níveis de invasão, sugerindo que estas amostras utilizam um mecanismo da célula hospedeira para internalização, e que, provavelmente, a contribuição de fatores de virulência, como adesinas, favorece a adesão das mesmas, compensando a ausência de LEE. Desta maneira, julgamos importante investigar a adesão, bem como a analisar possíveis mecanismos que favoreçam a internalização de amostras LEE-negativas.

Palavras-chave: *Escherichia coli* Enterohemorrágica, LEE-negativa, Invasão Caco-2, Adesinas

ABSTRACT

RENNO, V.F. **A mechanism: Invasion of epithelial cells by LEE- negative Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) strains.** Master (Microbiology) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2008

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are important human pathogens that can cause diseases such as diarrhea and Hemolytic Uremic Syndrome (SHU). The most EHEC associated with SHU possess LEE (Locus of Enterocyte Effacement) a Pathogenic Island (PAI) that encodes genes able to induce Attaching and Effacing lesions (A/E) on intestinal mucosa. Although LEE is important for host colonization, some EHEC serotypes that lack LEE are frequently isolated from patients with severe disease, including SHU. Many genes have been described to contribute to adhesion of this pathogen on host cells. Moreover, some serotypes of LEE-negative EHEC have been found located intracellular. Then, the ability of invasion by strains related with SHU has been studied, such as the determination of “extra-LEE” genetic profile capable to favor and promote to some strains the invasion.

The aim of this study was to investigate putative virulence factors of LEE-negative strains related to the occurrence of SHU in humans and compare adherence and invasion patterns in epithelial HEp-2 and Caco-2 cells. Nine strains isolated from ovine and bovine, four (44.5%) were stx₂. All were positive for *lpfA* and *iha* genes. Only three (33.3%) harbor the *saa* gene and five were *Ehly* positive. All strains were negative for *toxB* gene. It was observed that the most strains showed a diffuse adhesion pattern to HEp-2 cells and in Caco-2 positive adherence with various degrees of intensity. It was also observed that none of the studied bacteria isolates internalize in HEp-2. Conversely, most tested strains showed an invasion profile displaying more than 3.3% in Caco-2. There was a significant reduction of invasion in the presence of the actin polymerization inhibitor Cytochalasin D, suggesting that strains use a host cell mechanism for internalization and probably the contribution of virulence factors like adhesins, favors their adhesion, compensating LEE absence, and the infection installation. Overall, it is important to investigate the role of adjuvant in intestinal colonization, and the mechanisms that strains may employ to invade the intestinal mucosa promoting the infection installation.

Key Words: Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, LEE-negative, Caco-2 Invasion, Adhesins

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Amostras analisadas no presente estudo	24
Tabela 2-Iniciadores, temperaturas de anelamento e tamanho dos amplicons obtidos na técnica de PCR	27
Tabela 3-Perfil genético das amostras LEE-negativas obtido através de PCR	32
Tabela 4-Resultados e análise da aderência de amostras às células CaCO-2	36
Tabela 5-Invasão de sorotipos de EHEC LEE-negativas às células HEp-2 e CaCO-2	41
Tabela 6-Porcentagem de invasão em células CaCO-2	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Perfil genético das amostras EHEC positivas para o gene <i>iha</i>.	33
Figura 2: Amostras testadas para o gene <i>lpfA</i> em técnica de PCR.	33
Figura 3: Amostras analisadas em técnica de PCR para o gene <i>saa</i>.	34
Figura 4: Adesão Agregativa em células HEp-2.	37
Figura 5: Adesão difusa em células HEp-2.	37
Figura 6: Adesão de amostras LEE-negativas em tapete semi-confluyente de células Caco-2.(A, B, C, D)	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

2.2 Objetivos Específicos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras bacterianas e condições de crescimento

3.2 Pesquisa de fatores de virulência

3.3 Cultura Celular

3.4 Adesão Celular

3.5 Invasão Celular

3.6 Inibição de Invasão Celular

4 RESULTADOS

5 DISCUSSÃO

6 CONCLUSÃO

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Escherichia coli* é um bacilo gram-negativo e anaeróbio facultativo. Faz parte de um grupo de bactérias cujos membros são tipicamente não patogênicos e compõem a microbiota intestinal de humanos e animais (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004). Em hospedeiros debilitados, imunossuprimidos ou quando a barreira fisiológica do intestino é rompida, amostras não patogênicas de *E. coli* podem causar infecções (NATARO e KAPER, 1998).

Entretanto, algumas cepas de *E. coli* representam importantes patógenos potencialmente hábeis em causar doenças. Esses patógenos têm sido classificados em duas principais categorias: patógenos entéricos e extra-intestinais (KUHNERT et al., 2000).

A habilidade de *E. coli* em causar diferentes tipos de doenças é devida à expressão de vários e distintos fatores de virulência, cujos genes responsáveis por sua codificação podem estar localizados no cromossomo, em plasmídios ou fagos (TRABULSI, 2002).

E. coli compreende grande número de tipos sorológicos, identificados por meio de anti-soros preparados contra as três variedades de antígenos presentes na espécie: antígeno O, determinado pelo lipopolissacarídeo da membrana externa (LPS); H, determinado por antígenos protéicos flagelares (GYLES, 2007) e K, antígenos polissacarídeos capsulares (LEOMIL et al., 2003). Todavia, nos dias atuais a determinação dos antígenos K raramente é utilizada, definindo-se seu sorotipo pela identificação dos antígenos O e H (TRABULSI e ALTHERTUM, 2004). Uma combinação específica dos antígenos O e H define o sorotipo de um isolado de *E. coli*, e sorotipos específicos podem ser associados com algumas síndromes clínicas. Os sorotipos e sorogrupos servem tanto para a identificação dos patógenos quanto para sua correlação com conjuntos específicos de fatores de virulência (WHITTAM et al., 1993).

A detecção de *E. coli* diarreio gênica tem sido direcionada para a identificação de fatores que determinam sua virulência. Esta identificação pode incluir ensaios fenotípicos *in vitro* (NATARO e KAPER, 1998).

Culturas de células epiteliais servem como modelos para avaliar os mecanismos pelos quais patógenos entéricos interagem com as células do hospedeiro *in vivo* (McKEE, 1995).

Células HeLa (Cérvix Humana), Caco-2 (Cólon Humano), HEP-2 (Laringe Humana), T84 (Cólon Humano) e Henle 407 (Intestino Delgado Humano) são exemplos

de células utilizadas para testes fenotípicos, tais como, adesão, invasão e citotoxicidade (McKEE et al., 1995).

O ensaio fenotípico mais utilizado para o diagnóstico presuntivo de *E. coli* diarreiogênica é a aderência das células bacterianas às células HEp-2 (NATARO e KAPER, 1998).

Os padrões de aderência de *E. coli* a essas linhagens celulares são descritos na literatura como: aderência localizada (LA); aderência agregativa (AA); aderência localizada-like (LAL) e bactérias que aderem difusamente (DA), padrões estes que se correlacionam diretamente aos diferentes patótipos de *E. coli* diarreiogênicas (McKEE et al., 1995; LEOMIL et al., 2003).

As *E. coli* diarreiogênicas que causam doença em humanos são divididas em seis categorias ou patótipos: *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* Enteropatogênica (EPEC), *E. coli* Enteroinvasora (EIEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC), *E. coli* que adere difusamente (DAEC) e *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC). Este último grupo pode ainda ser classificado como *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), que inclui amostras já descritas associadas a casos de SHU em humanos. Além desses patótipos, há também uma classe de *E. coli* que causam infecções no trato urinário denominadas de *E. coli* Uropatogênica (UPEC) (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004). As *E. coli* são classificadas nesses patótipos por características comuns. (NATARO e KAPER, 1998).

As ETEC são conhecidas como causadoras da Doença dos Viajantes e estão relacionadas também com diarreia em crianças com idade superior a um ano. As ETEC colonizam a porção proximal do intestino delgado. Este grupo foi o primeiro patótipo a ter alguns fatores de virulência descritos (NATARO e KAPER, 1998; TORRES et al., 2005).

As EPEC são a principal causa de diarreia em crianças com menos de um ano de idade, principalmente nos países em desenvolvimento (LEOMIL, et al. 2003). São divididas em dois grupos: EPEC típica e EPEC atípica (TRABULSI et al., 2002; KAPER et al., 2004).

As EPEC típicas têm sido definidas como amostras que possuem o plasmídio “*E. coli* Adherence Factor” (EAF), e são capazes de formar uma lesão histopatológica característica no epitélio do intestino, denominada lesão A/E.

A lesão A/E causa modificações estruturais nas células epiteliais levando à adesão íntima da bactéria a superfície celular. Tais mudanças incluem perda das

microvilosidades, acúmulo de proteínas do citoesqueleto celular e formação de um pedestal logo abaixo do sítio de aderência da bactéria (GYLES, 2007).

EPEC atípicas não possuem o plasmídio EAF, mas são capazes de produzir lesão A/E (NATARO e KAPER, 1998). Uma nova visão da definição de EPEC típicas foi proposta por Trabulsi et al. (2002) na qual, estas além do gene *eae*, teriam o gene *bfpA* e expressaria o “bundle forming pilus” (bfp), detectável por immuno-blot ou outros métodos sorológicos.

As EIEC são importantes causadoras de disenteria e estão relacionadas com as bactérias do gênero *Shigella* com respeito à sua patogenicidade, bioquímica e alguns aspectos genéticos (HART et al., 1993). Apesar de seu mecanismo de ação não estar totalmente elucidado, a habilidade das EIEC de invadir, sobreviver e multiplicar-se nos enterócitos é caracterizada pela presença de um plasmídio de 120-140 MDa que codifica todos os genes necessários para virulência (HART et al., 1993), incluindo proteínas de membrana externa necessárias para a invasão (LEVINE, 1987).

As EAEC estão associadas com diarreias protraídas (períodos maiores que 14 dias) nas populações de países em desenvolvimento e em surtos de diarreia em países desenvolvidos. Elas recebem essa denominação graças ao fenótipo de aderência agregativa apresentado quando infectam culturas de células HEP-2 (GOMES et al., 1998). Pouco se sabe sobre sua patogenicidade, exceto que elas produzem uma toxina denominada “enteroaggregative heat-stable enterotoxin” (EAST-I) (SAVARINO et al., 1991) e que sua capacidade de adesão agregativa é mediada por duas fimbrias (CZECZULIN et al., 1997). As fimbrias denominadas “Aggregative Adherence Fimbriae” (AAF/I e AAF/II) são os principais candidatos para fatores que podem facilitar a colonização inicial (NATARO e KAPER, 1998).

As DAEC recebem esta denominação por aderirem de forma difusa à superfície de células HeLa ou HEP-2. Seu papel como agente diarreiogênico não está totalmente esclarecido. Scaletsky et al. (2002) revelaram que estes microrganismos são isolados com mais frequência em crianças com diarreia e com idade acima de um ano.

As STEC e especialmente as EHEC são importantes patógenos emergentes que causam infecções severas em humanos (SCHMIDT et al., 2001). As EHEC são comprovadamente associadas à diarreia sanguinolenta (CAPRIOLI et al., 2005) e Colite Hemorrágica (CH) em humanos, podendo evoluir em 3 a 7% dos casos para a Síndrome Hemolítico-Urêmica (SHU) (LEOMIL et al., 2003). Esta síndrome afeta

fundamentalmente crianças e se caracteriza por anemia hemolítica, trombocitopenia e falência renal aguda e morte (KARMALI, et al., 1983; NATARO e KAPER, 1998).

Karmali et al. (2003) classificam as amostras de STEC em cinco diferentes soropatótipos levando em consideração o grau de severidade das infecções causadas em humanos. O soropatótipo A agrupa as O157:H7 e O157:NM, consideradas os sorotipos mais virulentos, responsáveis por aproximadamente 73.000 casos de doença, com 60 mortes por ano nos EUA (GANSHEROFF et al., (2000).

O soropatótipo B compreende sorotipos como O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19 e O145:NM. Em alguns países a incidência do sorogrupo O26 é similar à de O157(CAPRIOLI et al., 1997). STEC O26 foi caracterizada em muitos estudos em doenças diarréicas nos últimos 25 anos (JENKINS et al., 2008).

O soropatótipo C é composto de sorotipos que são relatados com pouca frequência como causadores de SHU. Fazem parte deste grupo O91:H21 e O113:H21. O soropatótipo D compõe diversos sorotipos associados a casos esporádicos de diarreia, e o grupo E detém inúmeros sorotipos que não foram descritos como causadores de doença em humanos.

Em outra forma de classificação os sorotipos de STEC seriam diferenciados como O157 e não-O157. Os sorogrupos não-O157 contribuem com mais de 37.000 casos nos Estados Unidos (MEAD et al., 1999).

Já na Argentina, um estudo realizado com 103 amostras de STEC isoladas de crianças com diarreia, 59% foram identificadas como O157:H7. Outros sorotipos presentes foram O145: NM, O26: H11, O113: H21 (RIVAS et al., 2006).

Amostras de STEC têm como principal fator de virulência a toxina de Shiga, que é codificada geneticamente por um profago temperado integrado no cromossomo bacteriano (CAPRIOLI et al., 2005).

Dois grupos de Toxina de Shiga são conhecidos (STROCKBINE et al., 1986). Stx1 tem a estrutura protéica quase idêntica à toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1(TAKAO et al., 1988); e Stx2 possui quase 60% de similaridade com Stx1 na sequência de aminoácidos (KAPER e O'BRIEN, 1998). A Toxina de Shiga pode também receber a denominação de Verotoxina (VT), pois Karmali et al. (1983) demonstraram através de um ensaio citotóxico, que filtrados de cultura de alguns isolados de *E. coli* ocasionavam um efeito citopático irreversível em cultura de células renais de macaco verde Africano (Células Vero).

Em 2002, ZHANG et al. descreveram a única variante de Stx1, denominada de Stx1c. Em contraste, Stx2 possui diversas variantes antigênicas, que diferem entre si tanto na atividade biológica quanto em sua associação com doença (CAPRIOLI et al., 2005).

Estudos epidemiológicos (BOERLIN et al., 1999) e estudos em modelos animais (SIEGLER et al., 2003) sugerem que Stx2 está mais freqüentemente associada com doenças fatais que Stx1.

Em humanos, as células alvo da toxina Stx se concentram principalmente no epitélio tubular renal (LEOMIL et al., 2003), células endoteliais vasculares do fígado, intestino, pâncreas e cérebro (ROGERS et al., 2003).

EHEC é um patótipo de *E. coli* de origem zoonótica definida (CAPRIOLI et al., 2005). Os ruminantes atualmente representam o maior reservatório para entrada na população humana através da cadeia alimentar (CAPRIOLI et al., 2005).

Além dos bovinos, mais de 100 sorotipos de STEC foram isolados de ovinos em países como Austrália (COOKSON et al., 2006). Porcos, cachorros, pássaros, cavalos e cervos já foram descritos como reservatórios de amostras de STEC (CAPRIOLI et al., 2005). Oliveira et al. (2007) isolaram pela primeira vez amostras de STEC proveniente de búfalos na América do Sul.

Além da produção de Stx, outro fator de virulência associado que pode ser expresso por essas bactérias é uma proteína chamada de intimina, responsável pela formação de lesões A/E em células do epitélio intestinal. A intimina é uma proteína de membrana externa de 94 kDa. É codificada pelo gene cromossomal *eae*, que por sua vez é parte de uma Ilha de Patogenicidade de 35 kb, conhecida como LEE (Locus Enterocyte Effacement) (McDANIEL et al., 1995). Diarréia severa (especialmente CH) e SHU estão intimamente associadas com amostras que albergam o gene *eae* (KARMALI, 1989).

O LEE é organizado em 5 operons policistrônicos – LEE1 a LEE5. Os produtos codificados por ele são: o Sistema de Secreção Tipo III (LEE1 a LEE3); o sistema de translocação de proteínas (LEE4) e o os genes *eae* e *tir* no operon LEE5 (GYLES, 2007).

A habilidade das amostras STEC de causar lesões A/E está associada ao LEE (WIELER et al., 1998), porém alguns estudos demonstraram que o LEE não é essencial para a patogênese de amostras STEC, uma vez que existem relatos de casos de doenças

causadas por STEC, incluindo casos de SHU, causados por amostras LEE-negativas (PATON et al., 1999).

Estudos realizados por Paton et al. (2001), relataram que amostras LEE-negativas causadoras de SHU foram capazes de aderir eficientemente às células epiteliais, e colonizar o intestino de ratos e bezerros (LINDGREN et al., 1993; DOUGHTY, et al., 2002).

Em outro estudo, Dytoc et al. (1994), relataram que amostras EHEC O113:H21 (LEE-negativa) aderiram a células HEp-2 sem acúmulo de actina ou formação da lesão A/E.

A adesão à mucosa intestinal constitui a primeira e essencial etapa para a colonização das células e para o desenvolvimento da infecção, e na ausência do LEE, pouco se sabe como essas amostras colonizam o hospedeiro (PATON, et al., 1998).

Alguns produtos codificados por genes presentes no cromossomo ou em plasmídios desempenham um papel importante na virulência de amostras STEC. Esses produtos podem incluir adesinas, toxinas e proteases, LPS, sistema de aquisição de ferro e flagelina. Muitas dessas adesinas têm sido relacionadas à aderência da bactéria em culturas de células (GYLES, 2007). As adesinas não fimbriais incluem Efa1, Iha, ToxB e Saa. E as fimbriais incluem principalmente LpfA.

Destas proteínas, ToxB possui 71% de homologia com a proteína Efa1, possui 93Kb e é codificada pelo plasmídio O157 e é necessária para a completa aderência do sorotipo O157:H7, cepa Sakai de STEC (TATSUNO et al., 2001).

Tarr et al. (2000), descreveram Iha (adherence-conferring protein), uma proteína de membrana externa de 67 kDa, que apresenta homologia com gene *IrgA* de *Vibrio cholerae*, um gene de regulação de ferro. Está amplamente presente em amostras LEE-positivas e LEE-negativas. (TATARCZAK, et al., 2005). Apesar dos estudos de adesão realizados, o gene *iha* parece não codificar uma adesina e sim tem a função de aumentar a expressão de outra adesina, aumentando desta forma a adesão às células (TATARCZAK et al., 2005).

Saa é uma proteína de membrana externa que funciona como adesina autoaglutinina, semelhante à YadA de *Yersinia* spp. Localiza-se no plasmídio O113 e foi descrita por Paton et al. (2001). Sugere-se que o gene *saa* está presente somente em amostras LEE-negativas e principalmente em amostras relacionadas com surtos de SHU (PATON et al., 2001).

Doughty et al. (2002) descreveram o gene *lpfA*. Este gene fimbrial cromossomal foi identificado em EHEC O113:H21 LEE-negativas e estaria relacionado com “Long Polar Fimbriae” (LPF). Esta fimbria do tipo I foi descrita pela primeira vez em *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium (BAUMLER e HEFFRON, 1995) e aparentemente contribui para o tropismo da bactéria nas placas de Peyer em ratos (BAUMLER et al., 1996). A contribuição desse gene para a virulência de O157:H7 e O113:H21 ainda é desconhecida. Doughty et al. (2002) observaram que após a deleção da maior subunidade do gene *lpfA*, ocorreu uma significativa redução na aderência da EHEC O113:H21 (EH41) em células CHO-K1.

Além de doenças severas, Luck e Bennett-Wood (2005) relataram a presença de bactérias LEE-negativas internalizadas em células CHO-K1, enquanto amostras do sorotipo O157:H7 permaneceram extracelulares e intimamente ligadas às células. Neste mesmo estudo, foi observado que amostras O113:H21 foram capazes de aderir às células CHO-K1 em um intervalo de 5 minutos após a infecção das células, e em 15 a 30 minutos a maioria das bactérias já se encontrava no citosol, indicando que o processo de invasão fora amplamente completado.

Muitos patógenos invasores exploram mecanismos do hospedeiro para induzir sua própria internalização (LUCK e BENNETT-WOOD, 2005). Um exemplo deste processo são os patógenos *Salmonella* e *Shigella*, que exploram o processo de macropinocitose para internalizarem em células do intestino, e para isso utilizam membros da família da Rho-GTPases para estimular sua captação para dentro da célula (ADAM, et al., 1996; CHEN et al., 1996).

Já Kim et al. (2005) observaram que o rearranjo do citoesqueleto de actina da célula hospedeira era imprescindível para a internalização da *E. coli* K1, causadora de meningite.

Rosenshine et al. (1992) observaram que invasões de células hospedeiras por bactérias como *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia* foram bloqueadas pelo inibidor de formação dos filamentos de actina, Citocalasina D. Testes realizados com bloqueadores de Tirosina Quinase (Genisteína) impediram a invasão por *Yersinia* em células epiteliais, mas não impediram a internalização de *Salmonella*.

Luck e Bennett-Wood (2005) analisaram amostras de O113:H21 quanto ao possível mecanismo de invasão e observaram que, da mesma forma que outros

patógenos entéricos, o bloqueio da invasão pode ser mediado pelo inibidor de polimerização de actina, Citocalasina D.

Isso sugere que os mecanismos envolvidos na invasão de células eucarióticas mostram-se diferentes dependendo do tipo de tecido do hospedeiro e de determinantes específicos do patógeno (KIM et al., 2005).

Apesar dos estudos recentes sugerirem hipóteses para os processos de adesão de invasão celular de amostras LEE-negativas, atualmente a base genética pela qual estes processos ocorrem permanece sem esclarecimento.

Mais estudos necessitam ser realizados para sugerir mecanismos pelos quais a internalização de amostras LEE-negativas ocorre, bem como o perfil genético de amostras patogênicas, na tentativa de elucidar quais fatores de virulência podem estar envolvidos no processo de adesão e invasão, viabilizando a instalação da infecção, o que torna estas bactérias importantes patógenos para a atualidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS:

Tendo em vista a importância das EHEC LEE-negativas como agentes causadores de doenças graves em humanos, como CH e SHU, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade invasiva de amostras isoladas de animais (bovinos e ovinos) em células epiteliais humanas, assim como pesquisar a presença de genes de virulência que podem contribuir para um mecanismo eficiente de patogenicidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Pesquisa de adesinas fimbriais e não fimbriais através de técnica molecular de PCR.
- Observar o padrão de adesão das amostras em células HEp-2 e Caco-2.
- Avaliar a invasão das amostras em células epiteliais HEp-2 e Caco-2.
- Averiguar quais seriam os possíveis mecanismos pelos quais as STEC LEE-negativas são capazes de internalizar em células epiteliais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras bacterianas e condições de crescimento:

Amostras do presente trabalho foram selecionadas por serem sorotipos relatados como causadores de SHU em humanos de acordo com o site www.microbionet.com.au.

Sete amostras utilizadas no presente estudo fazem parte da coleção do Professor Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro. Essas amostras são oriundas de trabalhos realizados anteriormente no Laboratório de Bacteriologia Médica e Veterinária - ICB II - USP (AIDAR et al., 2000; VETTORATO et al., 2003).

Duas amostras também relacionadas à SHU, isoladas de bovinos na Argentina, foram gentilmente cedidas pela Professora Nora Lia Padola, da Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNICEN, Argentina) (Tabela 1).

As amostras foram mantidas congeladas a -80 °C e foram semeadas em meio Tryptic Soy Broth (TSB) (GIBCO) para utilização nos experimentos.

Tabela 1: Amostras analisadas no presente estudo.

Amostra	Sorotipo	Origem
123-4	O5:H-	Ovino ^a
CA3-14	O128:H2	Ovino ^a
285-14	O91:H-	Ovino ^a
9FC-19	O103:H21	Bovino ^a
001-HV-2	O8:H21	Bovino ^a
N62-15	O174:H21	Bovino ^a
102MB-9	O113:H21	Bovino ^a
M1	O113:H21	Bovino ^b
M2	O113:H21	Bovino ^b

^a amostras isoladas no Brasil; ^b amostras isoladas na Argentina.

3.2 Pesquisa de fatores de virulência

Os genes que codificam os fatores de virulência foram pesquisados através da técnica de PCR, segundo descrita por Sambroock et al. (1989). Para o mix foram utilizados 2,5µL de 10X PCR Buffer, 2,5µM de MgCl₂, 25 pmol cada primer e 0,2µM de cada oligo de dNTP, 2,5U de Taq Polimerase (Invitrogen), 15µL do DNA molde e água Milli-Q q.s.p 50µL.

Os iniciadores utilizados neste estudo estão listados na Tabela 2.

Para a realização dos testes, o DNA bacteriano foi extraído através de fervura durante 10 minutos.

Após os ciclos de amplificação, a visualização do fragmento de DNA foi feita em gel de agarose a 2% para o gene *saa* e 1% para os demais genes. Uma alíquota de 1µL 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 e o gel foi corado com brometo de etídio (10µL/ml) e a sua leitura foi procedida em transluminador UV.

3.3 Cultura Celular

Neste estudo, as linhagens celulares HEp-2 (carcinoma de laringe humana – ATCC CCL – 23) e Caco-2 (ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO) foram utilizadas. Segundo Tristão et al. (2007) Caco-2 (human colonic adenocarcinoma; ATCC HTB 37).

Células HEp-2 e Caco-2 foram mantidas em atmosfera de 5% de CO₂ em estufa a 37 °C nutridas com meio D-MEM (GIBCO) suplementado com 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e 5% de Soro Fetal Bovino (GIBCO). O meio de cultura contendo as células Caco-2 foi suplementado com 1% de Anfotericina B (GIBCO) e 1% de aminoácidos não-essenciais (GIBCO).

Para a realização dos testes, as células foram cultivadas sob condições citadas acima, até a formação da monocamada celular.

3.4 Adesão Celular

A capacidade de aderência às células epiteliais foi verificada utilizando-se técnica descrita por Cravioto et al. (1979) modificada.

Monocamadas da linhagem celular foram cultivadas em microplacas de 24 câmaras contendo lamínulas, sendo posteriormente lavadas três vezes com tampão PBS estéril. Em cada câmara adicionou-se 0,9 ml de meio “Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (D-MEM) (GIBCO) acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (GIBCO) e 2% de D-Manose (Merck). Em seguida, 40 µL de amostra bacteriana, cultivada previamente por 18h a 37 °C em caldo Tryptic Soy Broth (TSB) (GIBCO), foi adicionada em cada câmara. As microplacas foram incubadas por 3 e/ou 6 horas a 37 °C e 5% de CO₂ e, após este período, foram lavadas 10 vezes com 1 mL de PBS estéril por câmara. Em seguida, as lamínulas foram fixadas com 1 mL de metanol (Merck) durante 30 min e coradas com Giemsa (Merck) e May-Grunwald, e observadas em microscópio óptico.

Tabela 2: Iniciadores, temperaturas de anelamento e tamanho dos amplicons obtidos na técnica de PCR.

Gene	Primer (5'-3')	Temperatura	Amplicon	Referência
<i>stx1</i>	F – CGC TGA ATG TCA TTC GCT CTG C R – CGT GGT ATA GCT ACT GTC ACC	55°C	302 pb	BLANCO et al., 1996.
<i>stx2</i>	F- CTT CGG TAT CCT ATT CCC GG R – CTG CTG TGA CAG TGA CAA AAC GC	55°C	516 pb	BLANCO et al., 1996
<i>iha-I</i> <i>iha-II</i>	CAG TTC AGT TTCC GCA TTC ACC GTA TGG CTC TGA TGC GAT G	56°C	1305 pb	SCHIMIDT et al., 2001
<i>saa</i>	F – CAT AAT GGA TCC ACT TAT GAA AGC CTT GAA AAA GGG R – GTA TAA CCTAGG TGA CTT TCG GAA CTT TTT CCC	52°C	119 pb	TOMA et al., 2004
<i>toxB</i>	F- ATA CCT ACC TGC TCT GGA TTG A R – TTC TTA CCT GAT CTG ATG CAG G	52°C	602 pb	TOMA et al., 2004
<i>lpfA</i>	F – ATG AAG CGT AAT ATT ATA G R – TTA TTT CTT ATA TTC GAC	52°C	573 pb	DOUGHTY et al., 2002
<i>eae</i>	F – ACG TTG CAG CAT GGG TAA CTC R – GAT CGG CAA CAG TTT CAC CTG	52°C	815 pb	GANNON et al., 1993
<i>ehly</i>	F – CAC ACG GAG CTT ATA ATA TTA TGT CA R – AAT GTT ATC CCA TTG ACA TCA TTT GAC T	52°C	1551 pb	SCHIMIDT et al., 1995

3.5 Invasão Celular

3.5.1 Realização do teste

O teste quantitativo de invasão foi realizado de acordo com Robins-Browne e Bennett-Wood (1992).

Microplacas de 24 câmaras foram mantidas em atmosfera de 5% de CO₂ à temperatura de 37 °C até a obtenção do tapete celular confluyente de células HEP-2 e Caco-2. Tanto as amostras bacterianas como os padrões positivo (*Salmonella* Typhimurium C20) e negativo (*E. coli* K12) foram previamente cultivados em 5mL de meio TSB a 37 °C overnight, sem agitação. Da cultura bacteriana, uma alíquota de 200 µL foi adicionada a 3 mL de tampão PBS. A placa foi lavada 2 vezes com tampão PBS estéril. Foi adicionado a cada poço 1 mL de D-MEM (suplementado com 2% de soro fetal bovino e 1% de D- manose) e 100 µL da diluição bacteriana para a infecção das células.

A placa foi incubada por 3 horas a 37 °C em 5% de CO₂. Cada poço foi lavado 2 vezes com PBS e cobriu-se a metade dos poços relativos à mesma amostra (2 poços) com 1 mL de D-MEM (suplementado com 2% de SFB) e os outros dois poços com 1 mL de D-MEM (suplementado com 2% de SFB e 250 µg/ml do antibiótico Amicacina (Novamin- Bristol-Myers Squibb)).

A placa foi novamente incubada por 1 hora a 37 °C em 5% de CO₂. Após este período, os poços foram lavados duas vezes com PBS e adicionou-se a todos os poços 1 mL de solução de Triton X-100 a 1% diluída em PBS (solução de lise), e incubou-se por mais 30 minutos.

Homogeneizou-se o lisado para o rompimento definitivo das células e 200 µL deste lisado foram transferidos para poços em uma placa de 96 poços estéril. Os quatro poços seguintes da respectiva fileira receberam 200µL de PBS.

3.5.2 Cálculo de Invasão

A fim de criar um gradiente de diluição (1:10 a 1:100.000), 20 µL do lisado celular foram transferidos para os poços seguintes da respectiva fileira. Após este procedimento, uma alíquota de 10 µL de cada um dos poços foi semeada em triplicata

em placa de TSA (GIBCO) e incubada a 37 °C por 18 horas. Após esta etapa, contaram-se as colônias associadas às células, tendo como base as diluições.

Para o cálculo de invasão, fez-se a relação, em porcentagem, entre o número de bactérias aderidas às células (poços que não receberam antibiótico) e o número de bactérias internalizadas (câmaras que receberam antibiótico), comparando-se com valores obtidos dos padrões positivo e negativo.

3.6 Inibição de Invasão Celular

3.6.1 Realização do teste

A realização do teste de Inibição de Invasão segue a técnica citada acima para o teste de Invasão (item 3.5.1.), porém, a monocamada celular foi previamente pré-incubada a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ por 30 min na presença de 2 µL/mL de Citocalasina D. Além disso, a presença de Citocalasina D a 2 µL/mL foi mantida em todas as etapas do teste.

3.6.2 Cálculo da Invasão na presença de Citocalasina D

Nesta etapa, utilizou-se a mesma técnica descrita para o cálculo de Invasão (item 3.5.2.).

4 RESULTADOS

As amostras foram primeiramente analisadas quanto à ausência do gene *eae*. Os resultados mostraram a ausência de bandas específicas em gel de agarose, comprovando a condição *eae* negativas das amostras.

Após esta confirmação, outros genes foram pesquisados através da técnica de PCR para a análise da presença ou ausência de determinantes genéticos já descritos como auxiliares na virulência de amostras isoladas de humanos com SHU. Foram eles: *stx*₁ e *stx*₂, *lpfA*, *iha*, *toxB*, *saa* e os dados encontrados apresentam-se na tabela 3.

Das nove amostras selecionadas, duas (22,2%) foram positivas somente para o gene *stx*₁; quatro (44,4%) positivas somente para *stx*₂ e três (33,3%) positivas para ambas as variedades da Toxina de Shiga: *stx*₁ e *stx*₂. Dentre as amostras de ovinos, todas apresentaram *stx*₁, mas somente a amostra O91:H- apresentou-se positiva também para *stx*₂. Já para as amostras de bovinos, foi observado o perfil oposto; onde todas as amostras foram positivas para *stx*₂ e somente as amostras O103:H21 e O113:H21 (102MB-9) foram positivas também para *stx*₁.

O resultado do teste de PCR mostrou que as todas as amostras de ovinos e bovinos possuíam os genes *lpfA* e *iha* (Figuras 1 e 2).

Para o gene *toxB* todas as nove amostras mostraram-se negativas.

Já para o gene *saa* seis amostras revelaram bandas específicas no gel de agarose a 2% (Figura 3), determinando que, do total de amostras analisadas, 66,6% possuem o gene *saa* e as demais 33,4% (três amostras) não o possuem. Dentre as amostras de ovinos, todas foram negativas para este gene, enquanto que nas amostras de bovinos 50% (três amostras) foram positivas. É interessante ressaltar que das três amostras do sorotipo O113:H21, somente uma (M1), originária da Argentina, possui o gene *saa*.

Em relação ao gene *Ehly*, cinco amostras foram positivas (55,5%). Observamos no perfil deste gene que todas as amostras de ovinos foram positivas, enquanto que somente duas (33,3%) amostras de bovinos apresentaram o mesmo perfil, sendo elas O8:H21 e O113:H21 (M1).

Em uma análise geral do perfil de adesinas fimbriais e não fimbriais de amostras LEE-negativas, bem como dos demais fatores de virulência de amostras EHEC estudadas, pudemos observar que as amostras apresentaram pelo menos dois destes fatores positivos.

Tabela 3: Perfil genético de amostras LEE-negativas obtido através da PCR.

Amostra	Sorotipo	eae	iha	tox_B	lpfA	ehly	stx₁	stx₂	saa
123-3	O5:H-	-	+	-	+	+	+	-	-
CA3-14	O128:H2	-	+	-	+	+	+	-	-
285-14	O91:H-	-	+	-	+	+	+	+	-
9FC-19	O103:H21	-	+	-	+	-	+	+	+
001-HV-2	O8:H21	-	+	-	+	+	-	+	+
N62-15	O174:H21	-	+	-	+	-	-	+	-
102MB-9	O113:H21	-	+	-	+	-	+	+	-
M1	O113:H21	-	+	-	+	+	-	+	+
M2	O113:H21	-	+	-	+	-	-	+	-

Figura 1: Perfil genético das amostras EHEC positivas para o gene *iha*: Da esquerda para direita- 1- Padrão positivo EDL933; 2-Padrão negativo K12; 3- O5:H-; 4-O128:H2; 5-O91:H-; 6-O103:H21; 7-O8:H21; 8-O174:H21; 9-O113:H21 (102MB-9).

Figura 2: Amostras testadas para o gene *lpfA* pela técnica de PCR: Da esquerda para direita- (Acima) 1- Padrão positivo O113:H21; 2-Padrão negativo K12; 3- O5:H-; 4-O128:H2; 5-O91:H-; 6-O103:H21; 7-O8:H21; 8- Branco; (Abaixo) 9-Padrão Positivo O113:H21; 10-Padrão negativo K12; 11-O174:H21; 12-O113:H21(102MB-9)

Figura 3: Amostras analisadas em técnica de PCR para o gene *saa*: Da esquerda para direita- (Acima) 1-Padrão positivo O113:H21; 2-Padrão negativo K12; 3- O5:H-; 4-O128:H2; 5-O91:H-; 6-O103:H21; 7-O8:H21; 8- Branco; (Abaixo) 9- Padrão Positivo O113:H21; 10- Padrão negativo K12; 11-O174:H21; 12-O113:H21

4.2 Teste de Adesão

No teste de adesão de 3 horas em células HEp-2 confluentes, a amostra O174:H21 teve o tapete destruído impossibilitando a análise da lâmina. As demais amostras apresentaram adesão difusa (AD) (Figura 5), o que se repetiu no teste de 6 horas, com exceção das amostras O5:H- (Figura 4) e O91:H-, que apresentaram adesão agregativa (AA).

Em células Caco-2, a adesão de tapetes semi-confluentes foi analisada tanto na região da periferia das ilhotas como na região de confluência celular (Figuras 6). Das nove amostras testadas, as amostra de ovinos, O5:H-, O128:H2 e O91:H-, apresentaram aderência periférica negativa (Figura 6A). A amostra O8:H21 teve o tapete descolado impossibilitando a análise da mesma. As demais amostras, todas de origem bovina, apresentaram aderência periférica positiva em variados graus de intensidade, onde O174:H21 mostrou-se discreta, O103:H21 e O113:H21 (M1) mostraram-se moderada (Figura 6C) e as amostras O113:H21 e O113:H21 (M2) mostraram intenso grau de adesão periférica (Figura 6 D).

Em relação à região de confluência das células Caco-2, na maioria das amostras observaram-se raras bactérias aderidas, que se mostravam isoladas ou aos pares. Destaca-se neste teste, a amostra O91:H-, que apresentou aderência periférica negativa, porém, na região de confluência celular, apresentou aderência intensa, sugestiva de adesão Agregativa.

Os resultados das adesões em células Caco-2 encontram-se descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados e análise da aderência de amostras em células Caco-2.

Amostras	Aderência Periférica (AP)	Aderência em tapete semi-confluyente
O5:H-	Negativa	Aderência discreta, bactérias isoladas/pares
O128:H2	Negativa	Raras bactérias isoladas/pares; Vidro: aderência intensa, cordões bacterianos sugestivo de aderência agregativa
O91:H-	Negativa	Aderência intensa, bactérias isoladas/pares/pequenas cadeias, sugestivo de aderência difusa
O103:H21	Positiva (++)	Aderência moderada, bactérias isoladas/pares, pequenos grupos frouxos de 10 a 20 elementos.
O8:H21	—	—
O174:H21	Positiva (+)	Raras bactérias aderidas, isoladas/pares
O113:H21 (102MB-9)	Positiva (+++)	Raras bactérias aderidas, isoladas/pares
O113:H21 (M1)	Positiva (++)	Raras bactérias aderidas, isoladas e pequenos grupos frouxos
O113:H21 (M2)	Positiva (+++)	Raras bactérias aderidas, isoladas/pares

Figura 4: Adesão Agregativa às células HEp-2: Amostra O5:H-

Figura 5: Adesão difusa às células HEp-2: amostra O128:H2

Figura 6: Adesão de amostras LEE-negativas em tapete semi-confluyente de células Caco-2.

A

A- Amostra O5:H-: adesão periférica negativa

B

B- Amostra O128:H2: Adesão periférica negativa, adesão ao vidro positiva intensa

C

C- Amostra O103:H21: Adesão moderada, grupos frouxos.

D

D- Amostra O113:H21 (M2): adesão periférica intensa (+++)

4.3 Invasão Celular

Das nove amostras do estudo, sete foram testadas quanto à capacidade de invasão em células HEp-2.

O teste realizado em HEp-2, não mostrou níveis significativos de invasão para nenhuma das amostras analisadas, pois os percentuais obtidos foram compatíveis com os níveis do padrão negativo K12 que se mostra equivalente a 0,03%.

Em células Caco-2, seis amostras foram selecionadas para a avaliação quanto à invasão em tapete celular confluyente.

Os resultados mostraram variação nos percentuais de invasão obtidos, que flutuaram de 1,5% até 3,8%. A maioria das amostras apresentou percentual acima de 3,4%, muito superior ao padrão negativo K12.

Os percentuais de invasão em células HEp-2 e Caco-2, associados a cada amostra estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Invasão de sorotipos de EHEC LEE-negativas em células HEp-2 e Caco-2.

% de invasão em		
Amostra	HEp-2	Caco-2
O5:H-	0,09	NT
O128:H2	0,02	2,04
O91:H-	0,01	NT
O103:H21	0,01	3,36
O8:H21	0,05	3,80
O174:H21	0,03	NT
O113:H21 (BR)	0,01	3,40
O113:H21 (M1)	NT	3,60
O113:H21 (M2)	NT	1,50
K12	0,03	0,081
<i>Salmonella</i> C20	3,0	17,8
NT- Não Testada		
K12- Padrão Negativo		
<i>Salmonella</i> C20- Padrão Positivo		

4.4 Inibição de Invasão

Para analisar a possível participação de mecanismos celulares do hospedeiro no processo de invasão celular das amostras LEE-negativas relatadas como causadoras de SHU, realizamos o teste de inibição de invasão com Citocalasina D, em células Caco-2. Pudemos observar neste teste, que todas as amostras testadas tiveram seus percentuais de invasão radicalmente reduzidos na presença do inibidor da polimerização de actina, Citocalasina D.

Os resultados obtidos nos testes de invasão, comparados aos seus respectivos percentuais na presença de Citocalasina D, estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6: Porcentagem de Invasão em células Caco-2.

Amostras	% Invasão	% Invasão na presença de Citocalasina D
O128:H2	2,04	0,3
O103:H21	3,36	0,13
O8:H21	3,80	0,70
O113:H21(102MB-9)	3,40	0,40
O113:H21 (M1)	3,60	0,1
O113:H21 (M2)	1,50	0,01
K12	0,18	0
<i>Salmonella</i> C20	17,4	0,5
K12- Padrão Negativo		
<i>Salmonella</i> C20- Padrão Positivo		

5 DISCUSSÃO

Novas adesinas foram recentemente identificadas em sorotipos de EHEC LEE-positivas e LEE-negativas provenientes de isolados clínicos (TOMA et al., 2004), e sugere-se que juntamente com outros fatores de virulência, contribuam para a adesão e instalação do processo infeccioso em hospedeiros humanos.

Segundo Nataro e Kaper (1998), dados epidemiológicos e experimentais demonstraram que o gene *stx*₂ pode desempenhar papel mais importante que *stx*₁ no que diz respeito à capacidade de causar CH e SHU.

Amostras de bovinos do presente estudo apresentaram, em sua maioria (66%), um genótipo *stx*₂ e nenhuma desta origem foi identificada com o genótipo *stx*₁.

Estes dados são similares aos encontrados na França por Pardel et al. (2000) e na Austrália por Cobbold e Desmarchelier (2001), que mostraram uma maior prevalência de *stx*₂ nos bovinos estudados, 50% e 57% respectivamente.

Em contrapartida, Leomil et al. (2003) encontraram maior prevalência de amostras *stx*₁ em bovinos do Estado de São Paulo, o que talvez possa ser explicado pela diferença na localização geográfica da origem das amostras comparada com os estudos citados acima.

As amostras de ovinos estudadas no presente trabalho apresentaram, em sua maioria um perfil *stx*₁/*stx*₂ e *stx*₁. Similarmente, Vettorato et al. (2003) observaram o perfil de prevalência dos subtipos *stx* em ovinos no Brasil, e das amostras estudadas, 50% apresentaram o genótipo *stx*₁/*stx*₂ e 38,1% o genótipo *stx*₁. Da mesma maneira, Cookson et al. (2006) isolaram um maior número de amostras com o perfil *stx*₁⁺ (43,9%) em ovinos da Nova Zelândia.

Este perfil genotípico encontrado em amostras isoladas de animais no Brasil é compatível aos encontrados em amostras isoladas de pacientes, como os relatados por Smith et al. (1999), onde cepas de STEC de diferentes sorotipos com genótipo *stx*₁ predominavam tanto em casos de diarreia, como em casos de diarreia sanguinolenta e SHU. Paralelamente, 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 *stx*₁/*stx*₂ ou *stx*₁.

Dos genes descritos como coadjuvantes na adesão de amostras EHEC, Tatsuno et al. (2001), descreveram *tox*B, que pode auxiliar no fenótipo de aderência da amostra Sakai O157 pois auxilia na formação e na secreção de proteínas do Complexo

de Secreção Tipo III codificadas pelo LEE. Nenhuma das amostras estudadas no presente trabalho foi positiva para *toxB*.

Similarmente, Toma et al. (2004) estudaram a presença de *toxB* em diversos sorotipos de STEC e mostraram que este gene parece estar sempre ausente em amostras LEE-negativas. Apesar destes resultados, o trabalho citado revela que algumas amostras *eae*-positivas foram negativas para o gene *toxB*, mas foram positivas para o gene *efa1*, que devido à similaridade genética entre ambos os genes, (NICHOLLS et al., 2000) a presença de *efa1* pode ser capaz de compensar a ausência de *toxB*. Da mesma maneira, Cergole-Novella et al., (2007) mostraram que 27% das amostras *eae*-positivas estudadas apresentavam *toxB*.

Porém, confrontando os dados do presente estudo, Tatarczak et al. (2005) relataram quatro amostras LEE-negativas que possuíam o gene *toxB*, dentre elas, uma amostra O113:H21 isolada de humano. Este sorotipo foi estudado no presente trabalho, porém com resultados negativos para este gene.

Neste trabalho foi observado que o gene *saa* foi positivo para três amostras de bovinos (50%) e negativo para todas as amostras de ovinos. Similarmente, um estudo realizado por Orden et al. (2005) revelou que nenhum dos isolados obtidos de ovinos eram positivos para o gene *saa*, em contraste com as amostras STEC *eae*-negativas de bovinos. Cergole-Novella et al. (2007) também mostraram que o gene *saa* foi positivo somente para amostras *eae*-negativas isoladas de bovinos e alimentos. Resultados similares foram relatados por Toma et al. (2004), onde o gene *saa* foi positivo somente para sorotipos LEE-negativos. Este fato pode reforçar a hipótese sobre o gene *saa* estar associado apenas com amostras STEC *eae*-negativas de bovinos.

Similarmente, em 2001, Paton et al. descreveram uma importante associação do gene *saa* em amostras STEC isoladas de bovinos, sugerindo uma provável função desta adesina na ligação da bactéria às células epiteliais do intestino bovino.

Observou-se no presente estudo que amostras positivas e negativas para o gene *saa* obtiveram o mesmo nível de adesão em células HEp-2 e Caco-2, sugerindo que outras adesinas podem estar envolvidas na adesão eficiente de amostras LEE-negativas.

Do mesmo modo, Paton et al. (2001) comprovaram que a deleção no gene *saa* diminui a adesão de amostras selvagens às células HEp-2, porém, a adesão não foi completamente suprimida, o que reforça a hipótese de que fatores adicionais também estão envolvidos neste processo.

No presente estudo foi observado que todas as amostras EHEC isoladas de ovinos eram positivas para o gene *Ehly*. Tal fato pode sugerir que este gene representa um importante fator de virulência não só para sorotipos isolados de bovinos, como sugere Paton et al. (2001). Vettorato et al. (2003) encontraram 33,3% de amostras de ovinos positivas para o gene *Ehly*, e descreveram que este gene foi encontrado principalmente dentre as amostras STEC com genótipo *stx*₁/*stx*₂.

Em contrapartida, para as amostras isoladas de bovinos foi verificado que somente duas (33,3%) foram positivas para o gene *Ehly*. Dados semelhantes foram obtidos por Leomil et al. (2003) que observaram em STEC amostras isoladas de bovinos, 31,6% *Ehly*⁺. Segundo o estudo de Leomil et al. (2003), estas porcentagens não são significativamente altas, já que Kobayashi et al. (2001) relataram em seus estudos 66 (72%) de amostras positivas para *Ehly*. Ainda de acordo com Leomil et al. (2003), esta discrepância de valores pode ser devida a fatores geográficos e ambientais.

Interessante ressaltar que as amostras de bovinos do presente estudo que apresentaram o gene *Ehly* tiveram maiores percentuais de invasão em células Caco-2, podendo representar um importante fator de virulência para amostras EHEC. Esta hipótese pode ser reforçada analisando o estudo de Cobbold e Desmarchelier (2001) que observaram que a produção da enterohemolisina (*Ehly*) aumenta a virulência das STEC, sugerindo que amostras que possuem os genes *eae*, *stx* e *Ehly*, sejam potencialmente amostras de EHEC, e com isso possam causar estas doenças em humanos.

No presente estudo, observamos que amostras isoladas de bovinos apresentam um perfil similar quanto ao gene *saa* e *Ehly*.

Corroborando com estes dados, Paton et al. (2001) demonstraram que há uma estreita relação entre os genes *saa* e *Ehly* em amostras *eae*-negativas de diferentes sorotipos, embora algumas delas fossem somente *saa* ou *Ehly* positivas. Similarmente, foi observado em nosso estudo que a amostra O103:H21 possui genótipo *saa*⁺/*Ehly*⁻.

A *Ehly* é um fator de virulência cuja função no desenvolvimento da CH e SHU ainda não é totalmente conhecida, porém este gene está comumente presente em amostras STEC (LEOMIL et al., 2003, SCHIMITH et al., 1995), e associado ao gene *saa* pode conferir às amostras um maior potencial patogênico (PATON et al., 2001). Isso poderia ser explicado devido à alta variabilidade dos plasmídios presentes em STEC onde este dois genes estão codificados.

Segundo Baumber et al. (1996) a adesina não fimbrial codificada pelo gene *lpfA*_{O113} está associada à adesão de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium às células da Placa de Peyer em modelos murinos. Posteriormente, foi descrita em amostras de STEC do sorogrupo O113 por Doughty et al. (2002).

A pesquisa deste gene no presente estudo revelou que todas as amostras foram positivas, corroborando com estudos realizados por Osek et al. (2003), o qual revelou também que esta adesina tem sido encontrada em amostras isoladas de humanos e animais, principalmente em amostras LEE-negativas. Em contrapartida, Tatsuno et al. (2006) que este gene não é necessário para a adesão de amostras EPEC em células HeLa ou em biópsia de células intestinais *in vitro* (IVOC).

Diferentemente, Doughty et al. (2002) observaram que este gene pode representar um importante fator de virulência, visto que sua deleção resultou em diminuição significativa da adesão de amostras O113:H21 em células CHO-K1. Esta diferença entre a representatividade do gene *lpfA* na adesão de amostras de *E. coli* pode ser devido à ausência do gene *eae* em amostras LEE-negativas, as quais podem ter se adaptado para utilizar novas adesinas que favoreçam sua adesão às células do intestino, facilitando sua permanência no hospedeiro.

No presente estudo, todas as amostras foram positivas para o gene *iha*. Reforçando estes dados, Toma et al. (2004) relataram o gene *iha* é conservado entre as EHEC LEE-negativas e representa a adesina de STEC mais amplamente distribuída entre as 139 amostras de diversos sorotipos analisadas no referido estudo.

Paralelamente, estudos de Tatarczak et al. (2005) revelaram que este gene foi encontrado em 60% das amostras isoladas de bovinos, suínos, alimentos e de humanos; tanto sorotipos *eae*-positivos quanto *eae*-negativos. Diferentemente, Tristão et al. (2007) observaram que diversos sorotipos de EHEC LEE-positivas isoladas de bovinos foram 100% *iha* negativas.

De maneira geral, o estudo de fatores de virulência das amostras LEE-negativas deste estudo concordam com estudos mostrados por Toma et al. (2004) e Cergole-Novella et al. (2007), onde as adesinas mais prevalentes foram *iha*, *lpfA*, e o perfil genotípico observado entre as amostras causadoras de SHU é semelhante.

Apesar da ausência do LEE, observamos no presente trabalho que a maioria das amostras apresentou um perfil de adesão difusa em células HEP-2.

Dados similares foram observados por Dytoc et al. (1994), onde a amostra O113:H21, isolada de um paciente com SHU apresentou um padrão de aderência difusa em células HEp-2, e corroboram com os dados apresentados por Paton et al. (2001). Isto sugere que apesar de ser importante na patogenicidade, o LEE não é essencial para a virulência, já que sorotipos de STEC LEE-negativas são igualmente capazes de causar doença, e aderirem-se aos enterócitos (GYLES, 2007).

Interessante observar que todas as amostras de ovinos do presente estudo obtiveram padrões opostos para adesão em HEp-2 e Caco-2. As amostras apresentaram adesão positiva para células HEp-2, e para células Caco-2 a adesão foi negativa na região periférica das ilhotas. Tendo em vista a diferença entre as linhagens celulares e conseqüentemente de seus receptores de superfície, podemos sugerir que as amostras de ovinos não possuem adesinas capazes de interagir com os receptores presentes na região periférica das ilhotas destas células epiteliais, interferindo diretamente na capacidade de adesão destas amostras. Diferentemente, Dytoc et al. (1993) sugerem que proteínas de membrana externa de bactérias interferem diretamente na adesão de sorotipos a células epiteliais, modulando ainda seu padrão de adesão.

Em relação à diferença na adesão entre a área periférica e a área de confluência celular de células Caco-2 na amostra O91:H-, pode-se sugerir que seja devido à variação dos receptores, já que na área de confluência as células encontram-se polarizadas, e o perfil de expressão de receptores se modifica interferindo conseqüentemente na possibilidade de interação com a célula bacteriana (Andrade, comunicação pessoal).

Além da capacidade de adesão mostrada por amostras LEE-negativas, Luck e Bennett-Wood (2005) observaram que ao contrário de amostras O157:H7, as amostras de EHEC LEE-negativas foram capazes de invadir células epiteliais CHO-K1 e Caco-2, com o mecanismo semelhante aos de *Shigella*, um patógeno entérico naturalmente invasor.

Embora HEp-2 seja amplamente utilizada como modelo e padrão para testes de interação de bactérias em células epiteliais, esta linhagem não se mostrou permissiva à invasão dos sorotipos estudados. Similarmente, Oelschlaeger et al. (1994) demonstraram que amostras EHEC isoladas de pacientes com CH e SHU foram incapazes de invadir células HEp-2.

Foi observado neste estudo que as amostras LEE- negativas testadas apresentaram um nível de invasão significativo quando comparadas com amostra isenta

de potencial invasor (K12) e *Salmonella*, um patógeno invasor. Corroborando com estes dados, Luck e Bennett-Wood (2005) observaram que amostras LEE-negativas foram capazes de invadir células Caco-2 e HCT-8 em níveis compatíveis aos de *E. coli* invasora (EIEC).

As adesinas e/ou invasinas envolvidas no processo de invasão de amostras LEE-negativas ainda não foram totalmente elucidadas, porém Luck e Bennett-Wood (2005) sugerem que em amostras O113:H21, estes fatores sejam codificados pelo cromossomo, já que a deleção do plasmídeo pO113, que codifica adesinas já descritas, não gerou nenhum impacto na adesão destas amostras às células CHO-K1.

Interessante observar a diferença entre os níveis de invasão para todos os sorotipos estudados, em ambas as linhagens celulares. Tendo em vista esta discrepância, podemos sugerir que células de diferentes linhagens interagem e permitem a internalização de bactérias em níveis distintos. Corroborando com estes dados, Luck e Bennett-Wood (2005) mostraram que, frente a uma amostra de *E. coli* K12, células de diferentes linhagens mostraram valores de invasão muito diferentes, sugerindo que determinadas linhagens celulares detêm uma capacidade inerente de internalização de bactérias. Similarmente, observamos em nosso estudo, que a amostra *Salmonella* C20, um patógeno invasor, obteve níveis muito discrepantes de invasão em ambas as células estudadas (3% em HEP-2 e 17% em Caco-2), sugerindo que a capacidade de invasão por parte de cepas bacterianas pode ser limitado dependendo do tipo de célula com a qual esta interage.

Apesar destas hipóteses, observamos no presente estudo, que as três amostras do sorotipo O113:H21 obtiveram níveis diferentes de invasão em células Caco-2, sugerindo que, apesar da participação moduladora de diferentes linhagens celulares na captação de células bacterianas, o perfil genotípico de adesinas e/ou invasinas também pode influenciar na capacidade de internalização celular, diferenciando dentro de um mesmo sorotipo, cepas com diferentes potenciais de invasão e virulência. Corroborando com esta hipótese, Robins-Browne e Bennett-Wood (1992) mostraram que adesinas de *E. coli* diarreiogênicas não desempenham um papel direto na invasão, embora estas adesinas possam facilitar a invasão promovendo a adesão e o contato inicial entre a célula epitelial e a bactéria.

No presente trabalho utilizou-se o inibidor de polimerização de actina, Citocalasina D para avaliar os possíveis mecanismos pelos quais as amostras LEE-

negativas são capazes de invadir células Caco-2. Os resultados obtidos sugerem que a invasão de células Caco-2 por estas amostras requer um citoesqueleto de actina intacto e a polimerização de actina, já que a presença deste inibidor resultou em níveis expressivamente menores de internalização dos sorotipos estudados. Similarmente, Luck e Bennett-Wood (2005) descreveu que esta invasão requer um citoesqueleto funcional da célula do hospedeiro, com polimerização de actina, para o englobamento da bactéria.

Além do citoesqueleto, Luck e Bennett-Wood (2005) relatam que a rede de microtúbulos celulares, não requerida para a invasão de *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia*, parece ser fundamental para a entrada de outros patógenos invasores nas células. Igualmente, Oelschlaeger et al. (1994) descreveram que amostras de O157:H7 foram invasoras para células de bexiga T24 e células ileocecais HCT-8 através de um mecanismo dependente da rede de microtúbulos.

Neste mesmo estudo, Oelschlaeger et al. (1994) mostrou que a inibição da síntese de proteínas reduziu drasticamente a invasão de amostras de EHEC em células epiteliais, sugerindo a presença de proteínas invasoras. Apesar disso, amostras de EHEC não mostraram comportamentos semelhantes na presença de inibidores em linhagens celulares específicas para a invasão, sugerindo a existência de mecanismos variados para a internalização de diferentes sorotipos.

6 CONCLUSÕES

- Amostras LEE-negativas devem possuir outros genes que auxiliam na adesão às células do hospedeiro, já que amostras com diferentes genótipos foram capazes de aderir *in vitro* na mesma intensidade. Neste sentido, faz-se necessária a realização de estudos adicionais sobre prováveis coadjuvantes na adesão às células.

-Amostras LEE-negativas isoladas de bovinos e ovinos do Estado de São Paulo invadem células epiteliais Caco-2, independente do perfil genético de adesinas analisadas, podendo representar, além de uma potencialização da virulência, um mecanismo de permanência no hospedeiro humano.

- Pode-se inferir que amostras de EHEC LEE-negativas invadem células epiteliais, utilizando um mecanismo da célula hospedeira o que na patogênese da infecção pode compensar a ausência de LEE e a incapacidade de formar lesões A/E.

-Estudos complementares com o objetivo de confirmar o mecanismo preciso pelo qual a invasão ocorre necessitam se conduzidos para que por fim possa haver o desenvolvimento de pesquisas para possíveis estratégias que combatam a infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, T.; GIRY, P.; BOQUET, P.; SANSONETTI, P. Rho-dependent membrane folding causes *Shigella* entry into epithelial cells. **EMBO J.**, v.15, p.3315-3321, 1996.

AIDAR, L.; PENTEADO, A.S.; TRABULSI, L.R.; BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; PESTANA DE CASTRO, A.F. Subtypes of intimin among non-toxigenic *Escherichia coli* from diarrheic calves in Brazil. **Can. J. Vet. Res.**, v.64 p.15-20, 2000.

BAUMLER, A.J.; TSOLIS, R.M.; HEFFRON, F. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.93, p.279-283, 1996.

BAUMLER, A.J.; HEFFRON, F. Identification and sequence analysis of *lpf*ABCDE, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.**, v.177, n.8, p.2087-2097, 1995.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J.; GONZÁLEZ, E.A.; MORA, A.; PRADO, C.; FERNANDEZ, L.; RIO, M.; RAMOS, J.; ALONSO, M.P. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in healthy cattle. **Epidemiol. Infect.**, v.117, p.251-257, 1996.

BOERLIN, P.; McEWEN, S.A.; BOERLIN-PETZOLD, F.; WILSON, J.B.; JOHNSON, R.P.; GYLES, C.L. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.3, p.497-503, 1999.

CAPRIOLI, A.; TOZZI, A.E.; RIZZONI, G.; KARCH, H. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Europe. **Emerg. Infect. Dis.**, v.3, n.4, p.578-579, Oct-Dec, 1997.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGÈRE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Vet. Res.**, v.36, p.289-311, 2005.

CERGOLE-NOVELLA, M.C.; NISHIMURA, L.S.; DOS SANTOS, L.F.; IRINO, K.; VAZ, T.M.; BERGAMINI, A.M.; GUTH, B.E. Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.274, n.2, p.329-334, 2007.

CHEN, L.M.; HOBBIE, S.; GALAN, J.E. Requirement of CDC42 for *Salmonella*-induced cytoskeletal and nuclear responses. **Science**, v.274, p.2115-2118, 1996.

COBBOLD, R.; DESMARCHELIER, P. Characterization and clonal relationships of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from Australian dairy cattle. **Vet. Microbiol.**, v.79, p.323-335, 2001.

COOKSON, A.L.; TAYLOR, S.C.; BENNETT, J.; THOMSON-CARTER, F.; ATTWOOD, G.T.; Serotypes and analysis of distribution of Shiga toxin producing *Escherichia coli* from cattle and sheep on the lower North Island, New Zealand. **N. Z. Vet. J.**, v.54, p.78-84, 2006.

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.

CZECZULIN, J.R.; BALEPUR, S.; HICKS, S.; PHILLIPS, A.; HALL, R.; KOTHARY, M.H.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J.P. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.65, n.10, p.4135-4145, 1997.

DOUGHTY, S.; SLOAN, J.; BENNETT-WOOD, V.; ROBERTSON, M.; ROBINS-BROWNE, R.M.; HARTLAND, E.L. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. p.6761-6769, 2002.

DYTOC, T.M.; ISMAILI, A.; PHILPOTT, D.J.; SONI, R.; BRUNTON, J.L.; SHERMAN, P.M. Distinct binding properties of *eae*-negative verotoxin-producing *Escherichia coli* of serotype O113:H21. **Infect. Immun.**, v.62, p.3494-3505, 1994.

DYTOC, M.; SONI, R.; COCKERILL, F. 3RD.; DE AZAVEDO, J.; LOUIE, M.; BRUNTON, J.; SHERMAN, P. Multiple determinants of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 attachment-effacement. **Infect. Immun.**, v.61, n.8, :3382-3391, Aug., 1993.

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, n.5, p.1268-1274, May, 1993.

GANSHEROFF, L.J.; O'BRIEN, A.D. *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle presented for slaughter in the U.S.: higher prevalence rates than previously estimated. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.97, n.7, p.2959-2961, 2000.

GOMES, T.A.; VIEIRA, M.A.; ABE, C.M.; RODRIGUES, D.; GRIFFIN, P.M.; RAMOS, S.R. Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in São Paulo city, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, n.12, p.3609-3613, Dec,1998.

GYLES, C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. **J. Anim. Sci.**, v. 85, p. 45-62, 2007.

HART, C.A.; BATT, R.M.; SAUNDERS, J.R. Diarrhoea caused by *Escherichia coli*. **Ann. Trop. Paediatr.**, v.13, n.2, p.121-131, 1993.

JENKINS, C.; EVANS, J.; CHART, H.; WILLSHAW, G.A.; FRANKEL, G. *Escherichia coli* serogroup O26-a new look at an old adversary. **J. Appl. Microbiol.**, v.104, n.1, p.14-25, Jan., 2008.

KARMALI, M.A.; MASCARENHAS, M.; SHEN, S.; ZIEBELL, K.; JOHNSON, S.; REID-SMITH, R.; ISAAC-RENTON, J.; CLARK, C.; RAHN, K.; KAPER, J.B. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-

producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, n.11, p.4930-4940, Nov., 2003.

KARMALI, M.A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.2, n.1, p.15-38, Jan., 1989.

KARMALI, M.A, STEELE, B.T., PETRIC, M.; LIM, C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. **Lancet**, v.1, n.8325, p.619-620, 1983.

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

KAPER, J.B.; O'BRIEN, A.D. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. Washington, USA: ASM, p.459, 1998.

KIM, B.Y.; KANG, J.; KIM, S.K. Invasion processes of pathogenic *Escherichia coli*. **Int. J. Med. Microb.**, v.295, p. 463-470, 2005.

KOBAYASHI, H.; SHIMIDA, J.; NAKAZAWA, M.; MOROZUMI, T.; POHJANVIRTA, T.; PELKONEN, S.; YAMAMOTO, K. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. **Appl. Environ. Microbiol.** v.67, p.484-489, 2001.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.24, n.1, p.107-117, 2000.

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.

LEVINE, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **J. Infect. Dis.**, v.155, n.3, p.377-389, Mar., 1987.

LINDGREN, S.W.; MELTON, A.R.; O'BRIEN, A.D.; Virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 clinical isolates in an orally infected mouse model. **Infect. Immun.**, v.61, p.2171-2182, 1993.

LUCK, S.M.; BENNETT-WOOD, V.; Invasion of Epithelial Cells by Locus of Enterocyte Effacement-Negative Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, **Infect. Immun.**, p.3063-3071, May, 2005.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, V. R. Food-related illness and death in the United States. **Emerg. Infect. Dis.**, v.5, p.607-625, 1999.

McDANIEL, T.K.; JARVIS, K.G.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B.. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, n.5, p.1664-1668, Feb.,1995.

McKEE, M.L.; O'BRIEN, A.D. Investigation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adherence characteristics and invasion potential reveals a new attachment pattern shared by intestinal *E. coli*. **Infect. Immun.**, p.2070-2074, May, 1995.

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

NICHOLLS, L.; GRANT, H.T.; ROBINS-BROWNE, R.M. Identification of a novel genetic locus that is required for *in vitro* adhesion of a clinical isolate of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. **Mol. Microbiol.**, v.35, n.2, p.275-288, 2000.

OLIVEIRA, M.G.; BRITO, J.R.; CARVALHO, R.R.; GUTH, B.E.; GOMES, T.A.; VIEIRA, M.A.; KATO, M.A.; RAMOS, I.I.; VAZ, T.M.; IRINO, K. Water buffaloes (*Bubalus bubalis*) identified as an important reservoir of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Brazil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.73, n.18, p.5945-5948, Sep., 2007.

OELSCHLAEGER, T.A.; BARRET, T.J.; KOPECKO, D.J. Some structures and processes of human epithelial cells involved in uptake of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strains. **Infect. Immun.**, p.5142-5150, Nov., 1994.

ORDEN, J.A.; CORTES, C.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A.; MARTINEZ, S.; DE LA FUENTE, R. Detection of the *saa* gene in Verotoxin-producing *Escherichia coli* from ruminants. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.17, n.1, p.65-67, 2005.

OSEK, J.; WEINER, M.; HARTLAND, E.L. Prevalence of the *lpf*_{O113} gene cluster among *Escherichia coli* O157 isolates from different sources. **Vet. Microbiol.**, v.96, p.259-266, 2003.

PARDEL, N.; LIVRELLI, V.; CHAMPS, C.; PALCOUX, J.B.; REYNAUD, A.; SHEUTZ, 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.

PATON, A.W.; SRIMANOTE, P.; WOODDROW, M.C.; PATON, J.C. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infect. Immun.**, v.69, n.11, p.6999-7009, Nov., 2001.

PATON, A.W.; WOODROW, M.C.; DOYLE, R.M.; LANSER, J.A.; PATON, J.C. Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.10, p.3357-3361, Oct., 1999.

PATON, J.C.; PATON, A.W.; Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.11, p.450-479, 1998.

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.

RIVAS, M.; MILIWEBSKY, E.; CHINEN, I.; ROLDÁN, C.D.; BALBI, L.; GARCÍA, B.; FIORILLI, G.; SOSA-ESTAN, I. S.; KINCAID, J.; RANGEL, J.; GRIFFIN, P.M. The Case-Control Study Group. Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. **Foodborne Pathog. Dis.**, v.3, n.1, p.88-96, Spring, 2006.

ROBINS-BROWNE, R.M.; BENNETT-WOOD, V.; Quantitative assessment of the ability of *Escherichia coli* to invade cultured animals cells. **Microb. Pathog.**, v.12, p. 159-164, 1992.

ROGERS, T.J.; PATON, A.W.; MCCOLL, S.R.; PATON, J.C. Enhanced CXC chemokine responses of human colonic epithelial cells to locus of enterocyte effacement-negative shiga-toxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.71, n.10, p.5623-5632, Oct., 2003.

ROSENSHINE, I.; DURONIO, V.; FINLAY, B.B. Tyrosine protein kinase inhibitors block invasin-promoted bacterial uptake by epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 60, n.6, p.2211-2217, 1992.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd ed: New York, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1989.

SAVARINO, S.J.; FASANO, A.; ROBERTSON, D.C.; LEVINE, M.M. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. **J. Clin. Invest.**, v.87, n.4, p.1450-1455, 1991.

SCALETSKY, I.C.; FABBRICOTTI, S.H.; CARVALHO, R.L.; NUNES, C.R.; MARANHÃO, H.S.; MORAIS, M.B.; FAGUNDES-NETO, U. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n.2, p.645-648, 2002.

SCHIMIDT, H.; ZHANG, W.L.; HEMMRICH, U.; JELACIE, S.; BRUNDER, W.; TARR, P.I.; DOBRINDT, U.; HACKER, J.; KARCH, H. Identification and characterization of a novel genomic island integrated at *selC* in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.69, p.6863-6873, 2001.

SCHIMITH, H.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. **Infect. Immun.** v.63, p.1055-1061, 1995.

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, n.2, p.92-96, 2003.

SMITH, H.; GEITZ, C.; TARR, P.I.; FROSH, M.; KARCH, H. Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for clonality. **J. Infect. Dis.**, v.179, p.115-123, 1999.

STROCKBINE, N.A.; MARQUES, L.R.; NEWLAND, J.W.; SMITH, H.W.; HOLMES, R.K.; O'BRIEN, A.D. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. **Infect. Immun.**, v. 53, n.1, p.135-140, 1986.

TAKAO, T.; TANABE, T.; HONG, Y.M.; SHIMONISHI, Y.; KURAZONO, H.; YUTSUDO, T.; SASAKAWA, C.; YOSHIKAWA, M.; TAKEDA, Y. Identity of molecular structure of Shiga-like toxin I (VT1) from *Escherichia coli* O157:H7 with that of Shiga toxin. **Microb. Pathog.**, v. 5, n.5, p.57-69, 1988.

TARR, P.I.; BILGE, S.S.; VARY, J.C.; JELACIC, S.; HABEEB, R.L.; WARD, T.R.; BAYLOR, M.R.; BESSER, T.E. Iha: A novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. **Infect. Immun.**, v.68, p.1400-1407, 2000.

TATARCZAK, M.; WIECZOREK, K.; POSSE, B.; OSEK, J. Identification of putative adhesin genes in shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from different sources. **Vet. Microbiol.**, v.110, p.77-85, 2005.

TATSUNO, I.; MUNDY, R.; FRANKEL, G.; CHONG, Y.; PHILLIPS, A.D.; TORRES, A.G.; KAPER, J.B. The *lpf* gene cluster for long polar fimbriae is not involved in adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* or virulence of *Citrobacter rodentium*. **Infect. Immun.** v.74, n.1, p.265-272, Jan., 2006.

TATSUNO I.; HORIE, M.; ABE, H.; MIKI, T.; MAKINO, K.; SHINAGAWA, H.; TAGUCHI, H.; KAMIYA, S.; HAYASHI, T.; SASAKAWA, C. *tox*B Gene on pO157 of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. **Infect. Immun.**, p.6660-6669, Nov., 2001.

TRABULSI, L.R.; KELLER, R.; TARDELLI GOMES, T.A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v.8, n.5, p.508-513, 2002.

TRABULSI, L.R.; ALTHERTUM, F. **Microbiologia**, 4ª ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2004).

TRISTÃO, L.C.; GONZALEZ, A.G.; COUTINHO, C.A.; CERQUEIRA, A.M.; GOMES, M.J.; IRINO, K.; GUTH, B.E.; ANDRADE, J.R. Virulence markers and

genetic relationships of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from serogroup O111 isolated from cattle. **Vet. Microbiol.**, v.119, n.2-4, p.358-65, 2007.

TOMA, C.; ESPINOSA, M.E.; SONG, T.; MILIWEBSKY, E.; CHINEN, I.; IYODA, S.; IWANAGA, M.; RIVAS, M. Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **J. Clin. Microb.**, p.4937-4946, Nov., 2004.

TORRES, A.G.; ZHOU, X.; KAPER, J.B. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. **Infect. Immun.**, v.73, n.1, p.18-29, Jan., 2005.

VETTORATO, M.P.; LEOMIL, L.; GUTH, B.E.; 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.

ZHANG, W.; BIELASZEWSKA, M.; KUCZIUS, T.; KARCH, H. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx (1c)) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, n.4, p.1441-1446, Apr, 2002.

WHITTAM, T.S.; WOLFE, M.L.; WACHSMUTH, I.K.; ORSKOV, F.; ORSKOV, I.; WILSON, R.A. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. **Infect. Immun.**, v.61, n.5, p.1619-2169, 1993.

WIELER, L.H.; SCHWANITZ, A.; VIELER, E.; BUSSE, B.; STEINRÜCK, H.; KAPER, J.B.; BALJER, G. Virulence properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains of serogroup O118, a major group of STEC pathogens in calves. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n.6, p.1604-1607, 1998.