BIANCA TOMÉ MONTEIRO

**CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA DISPERSINA EM AMOSTRAS
DE *Escherichia coli* NÃO PERTENCENTES AO PATÓTIPO DE *E.*
coli ENTEROAGREGATIVA**

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

**São Paulo
2008**

BIANCA TOMÉ MONTEIRO

CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA DISPERSINA EM AMOSTRAS DE *Escherichia coli* NÃO PERTENCENTES AO PATÓTIPO DE *E. coli* ENTEROAGREGATIVA

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Dr. Waldir Pereira Elias Junior

**São Paulo
2008**

**Aos meus pais, pelo apoio e incentivo
incondicional aos meus estudos durante
toda minha vida.**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan (São Paulo, SP), com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processos 04/12136-5 e 05/57477-7).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Waldir Pereira Elias Junior, por ter me dado a oportunidade de realizar este projeto e pela confiança depositada em mim e no meu trabalho desde o meu início no laboratório.

À Dra. Roxane Fontes Piazza, por ter aberto as portas do seu laboratório e por toda a ajuda e sugestões dadas no decorrer deste trabalho.

Ao Dr. Marcelo Palma Sircili, um dos meus orientadores na época de FUNDAP, pelo auxílio em algumas etapas deste trabalho e por todo apoio, conselhos e disponibilidade em ajudar quando preciso.

À Dra. Márcia Regina Franzolin, pelas amostras semeadas, listas e cardápios fornecidos e pela imensa boa vontade em sempre ajudar.

Ao doutorando e amigo Sérgio Rocha, pela paciência e ajuda na minha iniciação à Biologia Molecular.

À doutoranda e amiga Luciana Carvalho, pelos anos de almoço no bandeijão e pelas primeiras baladas da minha volta a São Paulo.

Ao doutorando e amigo Márcio Menezes e à Dra. Isabel Batista, do Laboratório de Bioquímica, pela ajuda nos experimentos de purificação de proteína.

Aos amigos e vizinhos de bancada Vanessa Bueris e Renato Ruiz, pelo apoio, pelas palavras amigas e pela companhia constante no laboratório.

À Dra. Silvia Bando, pós-doutoranda do laboratório, por todas as dicas e sugestões dadas a este trabalho, pelas “consultorias” e pela disposição em sempre ajudar.

À mestrande Franciely Paiva, pela na preparação das células e por sua constante boa vontade e disposição em ajudar.

Às funcionárias Regina e Sebastiana pelo auxílio na preparação dos materiais e à secretária Nadja, pelas palavras sábias nas horas difíceis.

A todos os meus colegas de laboratório, inclusive os já citados, pela amizade, pelos cafés e pelas risadas nestes mais de três anos de Instituto Butantan.

Obrigada!

"Não devemos ter medo dos confrontos.

Até os planetas se chocam e do caos

nascem as estrelas."

Charles Chaplin

RESUMO

MONTEIRO, B. T. **Caracterização da proteína dispersina em amostras de *Escherichia coli* não pertencentes ao patótipo de *E. coli* enteroagregativa.** 2008. 97 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

As *Escherichia coli* que causam infecções intestinais são denominadas *E. coli* diarreiogênicas (EDC) e são classificadas em seis patótipos distintos, de acordo com os seus mecanismos de virulência, as síndromes clínicas que causam e/ou os tipos de interação com células epiteliais in vitro. A dispersina, uma proteína de 10,2 kDa, codificada pelo gene *aap*, é um importante fator de virulência de *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Ela é secretada no meio extracelular e permanece ligada à superfície da bactéria permitindo sua dispersão pelo epitélio intestinal. A detecção do gene *aap* tem sido utilizada no diagnóstico molecular de EAEC em associação com outros marcadores, como os genes *aggR*, que codifica um regulador transcricional de vários genes de virulência deste patótipo, e *aatA*, que corresponde ao fragmento sonda EAEC e codifica uma proteína de membrana que faz parte de um complexo transportador de proteínas. No intuito de verificar a especificidade desses marcadores, foi realizada a pesquisa desses genes em uma coleção de 243 amostras pertencentes aos vários patótipos de EDC, utilizando a técnica de PCR. Todas as amostras foram negativas para os genes *aggR* e *aatA*, enquanto 26 amostras foram positivas para *aap*. Tais bactérias haviam sido previamente descritas como pertencentes ao patótipo de *E. coli* enteropatogênica atípica. Entretanto, análises confirmatórias revelaram que elas, na verdade, não apresentavam o gene *eae*, bem como os genes característicos de outros patótipos de EDC. Os padrões de adesão dessas 26 amostras foram determinados em ensaio de 6 horas em células HEp-2. Três amostras aderiram no padrão agregativo (AA), sendo então classificadas como EAEC atípicas, uma vez que não apresentavam o gene *aggR*. Cinco amostras aderiram no padrão difuso, três apresentaram padrão não característico de adesão e 15 amostras mostraram-se não aderentes. A pesquisa de marcadores de virulência associados ao patótipo EAEC revelou a presença dos genes *astA* em 18, *shf* em 9, *pilS* em 7, *agg3C* em 5 e *irp2* em 2 amostras. Não houve associação entre a presença e/ou combinação desses marcadores com algum dos padrões de adesão em células HEp-2. O sequenciamento do gene *aap* de 6 amostras revelou alta homologia entre as seqüências obtidas e a seqüência da amostra protótipo de EAEC 042. Entretanto, a expressão desse gene foi observada em apenas 7 das 26 amostras. A proteína dispersina parece não estar relacionada à adesão dessas bactérias, uma vez que um anti-soro específico obtido neste trabalho não alterou o fenótipo observado em células HEp-2. Este estudo revelou que o gene *aap* não é exclusivo de EAEC, tendo sido encontrado em amostras de *E. coli* que não aderem no padrão agregativo em células HEp-2 nem apresentam a seqüência do fragmento sonda EAEC.

Palavras-chave: Diarréia; *Escherichia coli*; Virulência.

ABSTRACT

MONTEIRO, B. T. **Characterization of the dispersin protein in *Escherichia coli* strains that do not belong to the enteroaggregative *E. coli* pathotype.** 2008, 97 f. Master thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Escherichia coli that cause diarrhea are known as diarrheagenic *E. coli* (DEC) and are classified into six distinct pathotypes, based on their virulence mechanisms, clinical syndromes they provoke and/or the type of interaction with epithelial cells. Dispersin, which has been characterized as a 10.2 kDa protein encoded by the *aap* gene, is an important virulence factor of enteroaggregative *E. coli* (EAEC). This protein is secreted to the extra cellular milieu where it remains attached to the surface of the bacterium, allowing its dispersal throughout the intestinal epithelium. The detection of *aap* has been used along with others genes, as *aggR* and *aatA*, for the molecular diagnosis of EAEC. *aggR* encodes a transcriptional activator of several EAEC virulence genes and *aatA*, which corresponds to the EAEC probe fragment, encodes an outer membrane protein that is part of a protein transporter system. In order to verify the specificity of these markers, the search of *aap*, *aggR* and *aatA* was performed in a collection of 243 strains belonging to different DEC pathotypes, using the PCR technique. All of them were negative for *aggR* and *aatA*, whereas 26 strains were positive for *aap*. These strains were previously described as atypical enteropathogenic *E. coli*. However, confirmatory analysis revealed that they did not harbor the *eae* gene, as well as the genes that characterize the other DEC pathotypes. The adherence patterns to HEp-2 of these 26 strains were evaluated in a six-hour assay. Three samples showed the aggregative adherence (AA) pattern and could be therefore classified as EAEC. Five strains displayed the diffuse adherence pattern, 3 strains showed a non-characteristic pattern and 15 were non-adherent. The search of EAEC-associated virulence markers demonstrated the presence of *astA* in 18, *shf* in 9, *pilS* in 7, *agg3C* in 5 and *irp2* in 2 strains. There was no association between the presence and/or combinations of these markers and any of the adherence patterns to HEp-2 cells. The DNA sequence analysis of six *aap*-harboring strains showed high homology between the sequence of these strains and the prototype EAEC 042. However, expression of this gene was detected in only 7 out of the 26 strains. Dispersin did not seem to be related to bacterial adhesion of these strains, since a specific antiserum obtained in this work did not change the phenotype observed in HEp-2 cells. This study revealed that *aap* is not exclusive of EAEC, since it was detected in *E. coli* strains that do not express the AA pattern in HEp-2 cells neither harbor the EAEC probe sequence.

Key words: Diarrhea; *Escherichia coli*; Virulence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose a 1%, após coloração com brometo de etídio, dos produtos de PCR amplificados referentes ao gene <i>aap</i> empregando os iniciadores disp1(F) e disp1(R).	50
Figura 2 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidas a partir do seqüenciamento do produto referente ao gene <i>aap</i> amplificado com auxílio dos iniciadores disp1(F) e disp1(R) das amostras 84, 179, 227, 268, 901 e 1205, em comparação com a seqüência deduzida da amostra protótipo de EAEC 042.	51
Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, após coloração com brometo de etídio, dos produtos de PCR amplificados referentes ao gene <i>eae</i> empregando os iniciadores Int _{FC} e Int _{RC}	52
Figura 4 - Alinhamento entre a seqüência de nucleotídeos da IS21 de <i>Shigella sonnei</i> disponível no GenBank e as seqüências dos produtos amplificados referente ao gene <i>eae</i> utilizando os iniciadores Int _{FC} e Int _{RC} de 14 amostras <i>aap</i> -positivas deste estudo.....	53
Figura 5 - Distribuição percentual das amostras <i>aap</i> -positivas deste estudo quanto ao padrão de adesão a células HEp-2 em ensaios de 6h de interação bactérias-células epiteliais.....	56
Figura 6 - Padrões de interação com células HEp-2 representativos dos padrões encontrados nas amostras deste estudo após 6h de interação bactérias-células epiteliais.....	57
Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, após coloração com brometo de etídio, caracterizando o inserto <i>aap</i> amplificado pelos iniciadores disp4(F) e disp4(R) clonado no vetor pGEM-T Easy.	60
Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, após coloração com brometo de etídio, dos fragmentos gerados pela digestão dos plasmídios dos transformantes 14 e 16 com a enzima <i>AccI</i>	61
Figura 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida , na concentração de 20%, com dodecil sulfato de sódicas frações protéicas obtidas antes e após a indução do cultivo da amostra BL21(DE3)-pBTM2 com isopropil-β-D-tiogalactosidase, seguida da coloração com Comassie Brilliant Blue..	62

Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida, na concentração de 20%, com dodecil sulfato de sódio da proteína isolada na fração solúvel da amostra BL21(DE3)-pBTM2 após indução com isopropil- β -D-tiogalactosidase, purificação em colunas de níquel, diálise e concentração, seguida de coloração com Comassie Brilliant Blue.	63
Figura 11 – Reatividade dos soros pré-imune dos ratos imunizados com a proteína His ₆ -Aap contra os extratos protéicos das amostras 042 e DH5 α	64
Figura 12 - Padronização do ensaio de imunodeteção da proteína dispersina com o soro anti-Dispersina.. ..	65
Figura 13 - Imunodeteção da proteína dispersina com soro anti-Dispersina.	66
Figura 14 – Ensaios de adesão e de inibição da adesão com o soro anti-Dispersina (1:10) em células HEp-2 após 6h de interação bactérias-células epiteliais.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras utilizadas como controle positivo nas reações de PCR deste estudo.	31
Tabela 2 - Seqüência dos iniciadores utilizados para detecção dos genes <i>aap</i> , <i>aggR</i> e <i>aatA</i> , ciclos de amplificação e tamanho dos fragmentos amplificados.....	32
Tabela 3 - Seqüência dos iniciadores utilizados para detecção dos genes <i>eae</i> , <i>lta</i> , <i>sta</i> , <i>stx</i> e <i>ipaH</i> , ciclos de amplificação e tamanho dos fragmentos amplificados.....	35
Tabela 4 - Seqüência dos iniciadores, ciclos de amplificação e tamanho dos fragmentos amplificados nas reações de PCR utilizados para a pesquisa de fatores de virulência de EAEC.	38
Tabela 5 - Sorotipos e padrões de adesão em células HEp-2 determinados nas amostras positivas para o gene <i>aap</i>	58
Tabela 6 – Combinações dos marcadores de virulência de EAEC detectado em 21 amostras <i>aap</i> -positivas em associação com o padrão de adesão em células HEp-2.....	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2 OBJETIVOS.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Meios de cultura e soluções.....	30
3.2 Amostras bacterianas	30
3.3 Pesquisa dos genes <i>aap</i> , <i>aggR</i> e <i>aatA</i>	31
3.3.1 Reação de polimerase em cadeia (PCR)	31
3.3.2 Eletroforese em gel de agarose	32
3.4 Confirmação da presença do gene <i>aap</i>	33
3.5 Seqüenciamento do gene <i>aap</i>	33
3.6 Amplificação e seqüenciamento do gene <i>eae</i>	34
3.7 Pesquisa de genes de virulência de outros patótipos de <i>E. coli</i>	34
3.8 Ensaio de adesão em células HEp-2	35
3.8.1 Preparo das células e das amostras bacterianas	35
3.8.2 Ensaio de adesão.....	36
3.9 Sorotipagem das amostras	37
3.10 Detecção de genes de virulência de EAEC	37
3.11 Obtenção do clone para expressão da proteína dispersina.....	39
3.11.1 Clonagem do gene <i>aap</i> no vetor pGEM-T	39
3.11.1.1 Obtenção do inserto <i>aap</i>	39
3.11.1.2 Ligação do inserto ao vetor pGEM-T	39
3.11.1.3 Transformação por eletroporação	39
3.11.1.4 Seleção do clone contendo o inserto <i>aap</i> no vetor pGEM-T Easy	40
3.11.2 Sub-clonagem de <i>aap</i> no vetor de expressão pET28a.....	41
3.11.2.1 Extração e preparo do vetor pET28a.....	41
3.11.2.2 Ligação do inserto ao vetor pET28a.....	41
3.11.2.3 Transformação por eletroporação	42
3.11.2.4 Seleção do clone contendo o inserto <i>aap</i> no vetor pET28a	42
3.12 Expressão e purificação da proteína His ₆ -Aap	43
3.12.1 Indução da expressão e localização da proteína recombinante na amostra hospedeira BL21(DE3)-pBTM2.....	43
3.12.2 Análise das proteínas através de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	44
3.12.3 Purificação da proteína His ₆ -Aap.....	45
3.13 Produção do soro anti-dispersina	46
3.14 <i>Imunoblotting</i> para detecção da proteína dispersina	46
3.15 Inibição da adesão em células HEp-2.....	48
4 RESULTADOS.....	49
4.1 Pesquisa dos genes <i>aap</i> , <i>aggR</i> e <i>aatA</i>	49
4.2 Confirmação da presença do gene <i>aap</i>	49

4.3 Seqüenciamento do gene <i>aap</i>	50
4.4 Amplificação e seqüenciamento do gene <i>eae</i> das amostras <i>aap</i> -positivas	51
4.5 Pesquisa de genes de virulência associados a outros patótipos de <i>E. coli</i> diarreiogênicas	55
4.6 Padrões de adesão e sorotipos	56
4.7 Análise da presença de outros genes de EAEC	58
4.8. Obtenção do clone de expressão da proteína recombinante His ₆ -Aap	60
4.9 Expressão e purificação da proteína recombinante His ₆ -Aap	62
4.10 <i>Immunoblotting</i> para detecção de Dispersina nas amostras que albergam o gene <i>aap</i>	63
4.11 Inibição da adesão	66
 5 DISCUSSÃO	 69
6 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Nenhum ser vive sozinho. Cada organismo interage não só com outros indivíduos de sua própria espécie, como com outros de uma variedade de diferentes espécies (TRAGER, 1970).

No curso da evolução, muitos tipos de interação entre espécies se estabeleceram. Nas comunidades pioneiras, relações negativas como a predação e o parasitismo predominavam. Na evolução e desenvolvimento dos ecossistemas, os organismos passaram a adotar novas associações em que uns dependem dos outros, ganhando e gerando benefícios mútuos (ODUM, 1988).

Dentre as associações entre organismos de diferentes espécies que deram certo durante a evolução, certamente está a entre os mamíferos e os microrganismos que habitam seu trato gastrointestinal. A natureza simbiótica da relação entre a microbiota do intestino e seu hospedeiro promove benefícios para ambos. O hospedeiro oferece abrigo e alimento para a microbiota e, em troca, os microorganismos produzem substâncias benéficas como vitaminas e ácidos graxos de cadeia curta (NOVERR *et al.*, 2004).

Nos seres humanos a microbiota intestinal começa a se estabelecer na criança com poucas horas de vida. O processo de colonização do trato gastrointestinal após o nascimento leva a uma série de sucessões ecológicas, que resultam na formação de uma microbiota estável e única para cada indivíduo (NOVERR *et al.*, 2004).

Muitas espécies evoluíram e se adaptaram para viver e crescer no trato gastrointestinal do homem. O número de células microbianas no lúmen intestinal é cerca de 10 vezes maior que o número de células eucarióticas no corpo humano (GUARNER *et al.*, 2003). O estômago e o intestino delgado concentram pouca quantidade e variedade de espécies microbianas, provavelmente por causa da composição inóspita do meio. Em contrapartida, o intestino grosso contém um ecossistema complexo e dinâmico com alta densidade de bactérias vivas (GUARNER *et al.*, 2003).

A microbiota do intestino tem importante papel na saúde do homem. Além de produzirem nutrientes como a vitamina K e ácidos graxos, a circulação constante de microorganismos no intestino é importante para desenvolver e manter o sistema imune ativo (NOWROUZIAN *et al.*, 2003).

Os microorganismos intestinais também têm papel na proteção do hospedeiro contra patógenos diversos (GUARNER *et al.*, 2003). Bactérias aderentes da microbiota podem prevenir a adesão e conseqüentemente a entrada de bactérias enteroinvasoras em células epiteliais. Além disso, as bactérias competem com possíveis patógenos por nutrientes disponíveis no nicho e podem inibir o crescimento de outras produzindo substâncias antimicrobianas (GUARNER *et al.*, 2003).

A população microbiana no intestino é basicamente constante, embora haja variação na quantidade de cada espécie de acordo com a idade (HOPKINS; MACFARLANE, 2002). As maiores mudanças na microbiota intestinal ocorrem durante os primeiros meses de vida. Ao nascer os intestinos são estéreis. Em poucas horas, bactérias começam a aparecer nas fezes (PENDERS *et al.*, 2006). Como o intestino dos recém-nascidos apresenta um potencial positivo de óxido-redução, é primeiramente colonizado por organismos anaeróbios facultativos. Gradualmente, o consumo de oxigênio por estes microorganismos muda o ambiente intestinal, permitindo o desenvolvimento de anaeróbios estritos (PENDERS *et al.*, 2006).

Em um homem adulto, a microbiota intestinal consiste de centenas de diferentes espécies de microorganismos (variando de 400 a 1000 espécies) dentre as quais mais da metade não pode ser cultivada fora desse ambiente (PENDERS *et al.*, 2005). A microbiota humana é composta de espécies permanentes, que habitam o intestino por meses ou anos, e de membros transitórios, que o colonizam por poucas semanas (NOVERR *et al.*, 2004). Tanto células procarióticas como eucarióticas habitam os intestinos, mas as espécies bacterianas predominam (NOVERR *et al.*, 2004).

A grande maioria das espécies que habitam o intestino humano consiste de anaeróbios estritos (cerca de 97%), enquanto apenas 3% correspondem às bactérias anaeróbias facultativas (NOVERR *et al.*, 2004). Dentre os gêneros de organismos anaeróbios que predominam na microbiota intestinal humana estão *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* e *Clostridium*. *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp.,

Klebsiella spp., *Lactobacillus* spp. e *Proteus* spp. estão entre os anaeróbios facultativos presentes em menor quantidade no trato gastrointestinal do homem (GUARNER *et al.*, 2003).

E. coli é uma das primeiras bactérias a colonizar o intestino da criança. Este microorganismo provavelmente é transmitido através do contato do recém-nascido com a flora fecal da mãe durante o parto, mas esta espécie também pode ser disseminada nas maternidades através dos médicos e enfermeiros que estão em contato direto com a criança (NOWROUZIAN *et al.*, 2003). A população de *E. coli* se mantém alta durante os seis primeiros meses de vida, mas cai cerca de dez vezes entre os seis e doze meses. A população de facultativos diminui enquanto a de anaeróbios se torna mais complexa (NOWROUZIAN *et al.*, 2003).

E. coli e seu hospedeiro coexistem há milhares de anos em perfeita harmonia gerando benefícios mútuos. Entretanto, durante a evolução, alguns clones dessa espécie adquiriram uma série de fatores de virulência que lhes conferiram adaptação a novos nichos e capacidade de causar um amplo espectro de doenças (KAPER *et al.*, 2004). Cepas patogênicas de *E. coli* têm sido associadas com infecções urinárias e intestinais, meningites e até mesmo infecções sistêmicas (NATARO; KAPER, 1998).

As amostras de *E. coli* associadas à infecção intestinal, tanto em crianças como em adultos, são conhecidas como *E. coli* diarreiogênicas (ECD) e são classificadas em seis patótipos, considerando os seus mecanismos de virulência específicos, as síndromes clínicas que causam, os sorotipos O:H, os aspectos epidemiológicos e/ou os tipos de interação com linhagens celulares (NATARO; KAPER, 1998). Os patótipos de ECD são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC). Embora essa classificação continue sendo usada pela maioria dos autores, torna-se evidente que algumas categorias incluem microorganismos bastante diferentes. Recentemente, as EPEC e EAEC foram subdivididas em típicas e atípicas e as EHEC passaram a constituir uma subcategoria de STEC ou amostras de *E. coli* que produzem a toxina de Shiga (Stx) (KAPER *et al.*, 2004).

Embora a taxa de mortalidade tenha diminuído sensivelmente nos últimos anos, ainda são registradas cerca de dois milhões de mortes anualmente por doenças diarréicas no mundo. A maior parte dos casos ocorre em crianças com menos de cinco anos de idade, residentes de países em desenvolvimento estando, geralmente, associados à desnutrição (PETRI *et al.*, 2008). *E. coli*, com sua variedade de fatores de virulência e mecanismos de patogenicidade, é um dos principais microorganismos envolvidos em casos de diarreia, sendo responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade (CLARKE, 2001).

As EPEC são caracterizadas pela capacidade de causar a lesão histopatológica no epitélio intestinal denominada lesão *attaching-effacing* (lesão A/E), desencadeada por proteínas codificadas pelos genes presentes em uma ilha de patogenicidade denominada região LEE (*locus of enterocyte effacement*) (McDANIEL *et al.* 1995). Esta lesão é caracterizada pela destruição das microvilosidades intestinais, aderência íntima da bactéria à membrana apical da célula epitelial e formação de estruturas celulares semelhantes a pedestais, onde a bactéria está aderida (MOON *et al.*, 1983).

Atualmente, dividem-se as EPEC em duas categorias: EPEC típicas e EPEC atípicas. O termo EPEC atípica foi criado em 1995 para denominar amostras de *E. coli* que diferiam das EPEC típicas, por não transportarem o plasmídeo EAF (*EPEC adherence factor*) e das EHEC, por não produzirem a toxina Stx (KAPER, 1996). O plasmídeo EAF contém os genes envolvidos com a biogênese de uma adesina fimbrial denominada *bundle-forming pilus* (BFP), além da sequência genética referente ao fragmento sonda EAF e do *operon per* (*plasmid encoded regulator*), o qual codifica um complexo regulador dos genes de virulência de EPEC (TRABULSI *et al.*, 2002).

Além da fímbria BFP, outros fatores de virulência estão associados à formação da lesão A/E. A proteína de membrana externa intimina, codificada pelo gene *eae*, é responsável pela íntima aderência da bactéria à membrana da célula. A proteína Tir, produzida e translocada pela própria EPEC, se liga à membrana celular e atua como um receptor para intimina. Proteínas secretadas da família Esp, codificadas em LEE, também são essenciais na patogênese de EPEC (GARMENDIA *et al.*, 2005).

As EPEC típicas aderem a células epiteliais *in vitro* no padrão descrito como adesão localizada (AL). Nesse padrão, observado após 3 horas de interação bactérias-

células epiteliais, as bactérias apresentam-se aderidas em grumos compactos em pontos localizados da superfície da célula epitelial (SCALETISKY *et al.*, 1984). EPEC atípicas podem apresentar adesão em um padrão semelhante ao AL, denominado adesão localizada-*like* (AL-L), que difere do padrão AL por se apresentar como grupamentos frouxos das bactérias sobre a superfície da célula epitelial, observado após 3 horas adicionais de interação bactérias-células (SCALETISKY *et al.*, 1999). As EPEC atípicas podem, ainda, aderir nos padrões difuso (AD) ou agregativo (AA) e mais raramente no padrão AL (HERNANDES *et al.*, 2006; TRABULSI *et al.*, 2002). O padrão AD, usado para definir o patótipo DAEC, refere-se à adesão bacteriana sobre toda a superfície da célula epitelial de forma difusa. O padrão AA, descrito como característico do patótipo EAEC, apresenta as bactérias aderidas umas às outras, em uma configuração que lembra tijolos empilhados, sobre a superfície das células epiteliais e da lamínula (NATARO *et al.*, 1987).

A Organização Mundial da Saúde reconhece atualmente doze sorogrupos clássicos de EPEC. São eles: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158 (TRABULSI *et al.*, 2002). As EPEC típicas geralmente se encaixam dentre esses sorogrupos; as EPEC atípicas por sua vez, formam um grupo mais heterogêneo, apresentando maior diversidade de antígenos O como, por exemplo, O34, O51 e O101 (BLANCO *et al.*, 2006; TRABULSI *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2001).

EPEC típicas e atípicas têm sido relacionadas a surtos de diarreia aguda, especialmente em crianças com menos de dois anos de idade. Em países em desenvolvimento, esse patógeno continua sendo uma das principais causas de diarreia infantil (CHEN; FRANKEL, 2005). No Brasil, vários estudos demonstram altas taxas da doença causada por EPEC em crianças (BUERIS *et al.* 2007; FRANZOLIN *et al.*, 2005; GOMES *et al.*, 1989; GOMES *et al.*, 1991; GOMES *et al.*, 2004; MEDEIROS *et al.*, 2001). O reservatório das EPEC típicas é o próprio homem. As EPEC atípicas, por outro lado, já foram isoladas de animais (TRABULSI *et al.*, 2002). A transmissão é fecal-oral e pode ocorrer por alimentos, fômites ou mãos contaminadas (NATARO; KAPER, 1998).

O diagnóstico de EPEC pode ser realizado pela detecção de um dos doze antígenos O através de soroaglutinação. Entretanto, essa metodologia pode levar à identificação de amostras pertencentes a diferentes patótipos de ECD. Dessa forma, a

detecção genética dos genes *eae* (que codifica a intimina) e de *bfpA* (que codifica a pilina da fímbria BFP) é necessária para o diagnóstico e diferenciação de EPEC típica e atípica (TRABULSI *et al.*, 2002).

Identificadas em 1982, as EHEC causam diarreia sanguinolenta ou não sanguinolenta e síndrome hemolítica urêmica (SHU) em seres humanos (RILEY *et al.*, 1983). Os reservatórios dessas bactérias são animais, destacando-se os bovinos. A transmissão por alimentos como carne mal passada e leite não pasteurizado tem sido reportada (KAPER *et al.*, 2004). A maioria dos casos de doenças no mundo é causada pelo sorotipo O157:H7, mas sorogrupos como O26, O11, O103 e O145 também estão envolvidos com infecções (CAPRIOLI *et al.*, 2005).

As EHEC são, na verdade, uma subcategoria de STEC. Ambas produzem a toxina Stx, mas EHEC é capaz de causar a lesão A/E, semelhante à induzida por EPEC, e está intimamente associada com o desenvolvimento de colite hemorrágica e SHU. Embora nem todas as STEC possam provocar doenças, todas as EHEC, segundo esta definição, são consideradas patógenos (NATARO; KAPER, 1998).

Stx de EHEC é similar à mesma toxina elaborada por *Shigella dysenteriae* tipo 1 e constitui o principal fator de virulência deste patótipo. O gene que codifica Stx está em um profago integrado ao cromossomo da bactéria (CAPRIOLI *et al.*, 2005). A toxina produzida no cólon pode chegar aos rins pela corrente sanguínea, provocando danos às células e aos vasos renais. Os danos podem levar ao desenvolvimento de SHU, caracterizada por anemia, trombocitopenia e falência renal. Em casos menos graves, Stx provoca morte das células intestinais, levando à diarreia sanguinolenta ou colite hemorrágica (RAZZAG, 2006).

As EHEC são responsáveis por grandes surtos envolvendo centenas de indivíduos, mas casos esporádicos da doença têm sido reportados com frequência em países como os Estados Unidos e Canadá. A EHEC também é um patógeno importante na Europa e no Japão, mas nestes lugares, os casos de infecção parecem ser sazonais, ocorrendo no verão (NATARO; KAPER, 1998). A Argentina é o país que mais registra casos de SHU no mundo, com aproximadamente 420 novos casos todos os anos. Vários agentes etiológicos têm sido associados a esta patologia, mas a

infecção por EHEC é a mais comum, estando geralmente associada ao sorotipo O157:H7 (RIVERO *et al.*, 2004).

O diagnóstico de EHEC baseia-se na detecção da toxina Stx através de ensaios em culturas celulares, de métodos imunológicos ou mesmo da pesquisa de seqüências genéticas que codificam essa toxina (NATARO; KAPER, 1998).

As EIEC são bioquímica, genética e patogenicamente muito relacionadas a *Shigella* spp. Elas diferem em alguns testes bioquímicos, mas compartilham genes essenciais de virulência (PARSOT, 2005).

Embora as EIEC possam causar colite inflamatória e disenteria, elas geralmente causam apenas diarreia aquosa semelhante à causada por outras ECD (KAPER *et al.*, 2004). O mecanismo de patogênese de EIEC consiste em penetração na célula epitelial, seguida de lise do vacúolo endocítico, multiplicação celular, movimentação no citoplasma e passagem para a célula adjacente (PARSOT, 2005). Os genes necessários para realizar este mecanismo complexo de patogenicidade estão codificados num plasmídeo de virulência de 213 kb. Esse plasmídeo codifica um sistema de secreção tipo III e uma proteína de membrana externa denominada lcsA. O sistema de secreção tipo III secreta várias proteínas, como as proteínas lpa que medeiam eventos de sinalização epitelial, rearranjo do citoesqueleto, lise do vacúolo endocítico, entre outras funções (COSSART; SANSONETTI, 2004).

O diagnóstico de EIEC baseia-se na detecção da capacidade invasora através do teste de ceratoconjuntivite em cobaia ou em cultura de células epiteliais, ou na pesquisa de genes de virulência associados com o processo de invasão (NATARO; KAPER, 1998).

As ETEC são conhecidas por sua capacidade de produzirem duas toxinas distintas, uma termo-lábil (LT) e outra termo-estável (ST). Dependendo da cepa, pode haver a produção de LT ou ST ou de ambas. LT é bastante semelhante à toxina colérica e é formada por uma subunidade central e cinco subunidades ligadoras idênticas entre si. ST é um peptídeo pequeno, com cerca de 18 aminoácidos. LT leva ao aumento de AMP cíclico intracelular, enquanto a ST eleva os níveis de GMP cíclico, com conseqüente desequilíbrio no metabolismo hidrossalino, levando à diarreia aquosa (TURNER *et al.*, 2006).

Além das duas toxinas, outros fatores de virulência estão associados à diarreogenicidade de ETEC. Mais de 22 fatores de colonização (CF) foram identificados em amostras de ETEC isoladas de humanos. Os CF podem ser proteínas fimbriais ou não-fimbriais, que levam o microrganismo a colonizar a mucosa do intestino e permitem assim a expressão de LT e/ou ST (QADRI *et al.*, 2005). A detecção das toxinas LT e/ou ST, através de ensaios em modelos animais ou de culturas celulares, ou mesmo da pesquisa das seqüências genéticas que codificam essas toxinas, constituem o método mais confiável para o diagnóstico de ETEC (NATARO; KAPER, 1998).

Infecções por ETEC podem ser resultado de ingestão de comida ou água contaminada. Casos de diarreia por ETEC são registrados durante o ano todo em áreas endêmicas, mas durante as estações quentes os índices aumentam. Além de causar diarreia em crianças, ETEC pode causar em adultos a chamada “diarreia do viajante”, que também costuma ser mais freqüente nos meses mais quentes e úmidos (QADRI *et al.*, 2005).

As DAEC são definidas pelo padrão difuso de adesão a células HEp-2 (NATARO *et al.*, 1987). Alguns autores não consideram as DAEC como um patótipo de ECD pela incerteza a respeito de seu real potencial patogênico, uma vez que um grande número de estudos não associa estatisticamente DAEC à diarreia (GOMES *et al.*, 1998; NATARO *et al.*, 1987; RODRIGUES *et al.*, 2002). Entretanto, a literatura relata casos de diarreia, especialmente em crianças, causadas por este microrganismo (GIRÓN *et al.*, 1991; SCALETSKY *et al.*, 2002; SPANO *et al.*, 2008). Pouco se sabe sobre as características de patogenicidade desses microrganismos. A fímbria F1845 foi associada ao fenótipo AD da amostra C1845 (O78:HNM) e o gene que a codifica pode ser encontrado tanto no cromossomo quanto num plasmídeo (BILGE *et al.* 1989). A adesão difusa na amostra 2787 (O126:H27) foi relacionada à AIDA-I (*adhesin involved in diffuse adherence*). Esta proteína de 100 kDa se liga a células HeLa mediando o fenótipo de adesão difuso dessa amostra. O gene que codifica esta adesina está num plasmídeo de alto peso molecular (BENZ; SCHMIDT, 1992).

Cepas de DAEC são capazes de produzir projeções *finger-like* na superfície de células Caco-2 e HEp-2. Estas projeções parecem envolver a bactéria, protegendo-a

sem internalizá-la. Entretanto, o papel deste fenótipo na patogênese de DAEC ainda não foi demonstrado (COOKSON *et al.*, 1996).

O teste padrão para diagnóstico de DAEC continua sendo feito pela observação do padrão de adesão difuso a células HEp-2 ou HeLa. Um fragmento derivado do gene *daaC*, que codifica o *usher* necessário para a expressão da fímbria F1845, tem sido empregado como sonda, para diagnóstico molecular, porém sem muito sucesso, uma vez que a sua sensibilidade é muito variável (NATARO; KAPER, 1998).

EAEC é definida como o patótipo de *E. coli* que adere a células epiteliais cultivadas no padrão AA e que não secreta as enterotoxinas ST e LT elaboradas por ETEC (NATARO *et al.*, 1987). O padrão AA foi estabelecido para definir a adesão em células HEp-2 de amostras de *E. coli* isoladas em um estudo epidemiológico envolvendo crianças com diarreia no Chile (NATARO *et al.*, 1987).

Embora EAEC tenha sido inicialmente descrita como causa de diarreia aguda (NATARO *et al.*, 1987), sua associação epidemiológica com essa patologia é controversa (BUERIS *et al.*, 2007; CRAVIOTO *et al.*, 1991; GOMES *et al.*, 1998; NATARO *et al.*, 2006; SPANO *et al.*, 2008; ZAMBONI *et al.*, 2004). Por outro lado em países em desenvolvimento EAEC tem sido fortemente associada à diarreia persistente, ou seja, com duração igual ou superior a 14 dias (CRAVIOTO *et al.*, 1991; FANG *et al.*, 1995; LIMA *et al.*, 1992). Também tem sido reportado o envolvimento de EAEC com casos de diarreia do viajante (HUANG *et al.*, 2007; VILA *et al.*, 2000).

Vários potenciais fatores de virulência foram descritos em EAEC, mas a patogênese da diarreia causada por esse patótipo ainda não foi esclarecida (HARRINGTON *et al.*, 2006). EAEC intensifica a secreção de muco na mucosa intestinal formando um denso biofilme no local. O papel da produção de muco na patogênese de EAEC não está claro, mas a formação de biofilme pode estar envolvida com o caráter persistente da colonização e da diarreia (NATARO; KAPER, 1998).

Além da formação de biofilme, adesinas, toxinas e vários outros fatores de virulência têm sido descritos em EAEC, codificados por genes localizados tanto no plasmídeo quanto no cromossomo de amostras consideradas protótipo (WEINTRAUB, 2006). Dentre elas destaca-se a amostra 042 (sorotipo O44:H18) isolada de um caso de diarreia aguda de uma criança no Peru (NATARO *et al.*, 1985). Essa amostra apresenta

um plasmídeo de alto peso molecular denominado pAA2, o qual alberga vários genes que codificam fatores de virulência (CZECZULIN *et al.*, 1999).

Duas toxinas são codificadas por genes presentes no mesmo locus do cromossomo da amostra 042: Pic, uma serino-protease auto-transportadora com função mucinolítica, e ShET1, uma enterotoxina codificada em uma ilha de patogenicidade inicialmente identificada em *Shigella flexneri* (HENDERSON *et al.*, 1999). Além disso, *irp2*, que codifica uma proteína necessária à biossíntese de yersiniabactina em espécies de *Yersinia*, também é encontrado no cromossomo da EAEC 042 (CZECZULIN *et al.*, 1999).

O plasmídeo de alto peso molecular (cerca de 65 kDa), pAA, encontrado em grande parte das amostras de EAEC codifica uma série de fatores de virulência, como a toxina EAST1, as fímbrias AAF/I, AAF/II e AAF/III, o ativador transcricional AggR e a proteína dispersina (Aap) (BERNIER *et al.*, 2002; CZECZULIN *et al.*, 1997; NATARO *et al.*, 1992; NATARO *et al.*, 1994; SHEIKH *et al.*, 2002). A toxina termo-estável EAST-1 foi um dos primeiros fatores de virulência descritos em EAEC. Trata-se de um peptídeo de 38 aminoácidos originalmente purificado de cultura de EAEC 17-2 (SAVARINO *et al.*, 1993). É certo que EAST-1 contribui para desencadear diarreia aquosa em EAEC, entretanto, o gene *astA*, que codifica esta toxina não é exclusivo deste patótipo, já tendo sido encontrado em EPEC, EHEC O157:H7 e até mesmo em *E. coli* da microbiota intestinal (SAVARINO *et al.*, 1996).

Nataro *et al.* (1992) reportaram a primeira fímbria deste patótipo, descrita na amostra 17-2. Com a transformação do plasmídeo pAA1 em uma *E. coli* K12, foi possível a visualização das fímbrias por microscopia eletrônica, demonstrando que os genes responsáveis pela biogênese desta estrutura estão codificados no plasmídeo. AAF/I está envolvida nos processos de hemaglutinação e formação do fenótipo AA (NATARO *et al.*, 1992). Entretanto, nem todas as amostras de EAEC expressam a fímbria AAF/I (ELIAS *et al.*, 1999). Czeczulin *et al.* (1997) caracterizaram uma segunda fímbria, denominada AAF/II, envolvida com a adesão agregativa da amostra 042 em células HEp-2. A subunidade fimbrial *aafA* apresenta homologia com a subunidade *aggA* de AAF/I. Mutantes em *aafA* não são capazes de aderir às células, sugerindo que esta fímbria esteja envolvida na colonização do intestino (CZECZULIN *et al.*, 1997).

Recentemente, uma nova fímbria, denominada AAF/III, foi identificada na amostra de EAEC típica 55989. AAF/III também está envolvida com a agregação das bactérias e sua adesão às células epiteliais. A sua biogênese é codificada pelo operon *agg-3*, o qual é bastante semelhante ao operon *afa* das adesinas AFA de *E. coli* uropatogênicas (BERNIER *et al.*, 2002).

As fímbrias são algumas das proteínas de superfície que podem estar envolvidas na autoaglutinação e na formação do padrão agregativo das EAEC. Além destas estruturas, algumas proteínas de membrana externa (OMP) já foram descritas com funções relacionadas à adesão desses patógenos. Debroy *et al.* (1995) identificaram uma OMP de 30 kDa, relacionada ao fenótipo AA e à hemaglutinação de eritrócitos humanos. Monteiro-Neto *et al.* (2003) descreveram uma proteína de 58 kDa (Ap58) que, na amostra 236 do sorotipo O111:H12, apresentava as mesmas funções descritas por Debroy *et al.* (1995). O gene que codifica a Ap58 foi localizado no cromossomo da amostra protótipo (MONTEIRO-NETO *et al.*, 2003).

No plasmídeo pAA, também estão localizados os genes *aggR*, que codifica um regulador de virulência (NATARO *et al.*, 1994), *pet*, que codifica uma enterotoxina auto-transportadora (ESLAVA *et al.*, 1998), *shf*, envolvido na formação de biofilme em EAEC 042 (FUJIYAMA *et al.*, 2008) e *aatA*, que codifica uma proteína de membrana externa que faz parte de um complexo transportador de proteínas (NISHI *et al.*, 2003). O fragmento sonda EAEC (CVD432) desenvolvido por Baudry *et al.* (1990), corresponde a uma porção deste último gene.

O regulador AggR está envolvido na regulação da expressão de uma série de genes presentes no plasmídeo pAA, como os que codificam as fímbrias AAF/I e AAF/II, a toxina Pet e a proteína dispersina; por isso é chamado de ativador global de virulência de EAEC. As cepas que apresentam *aggR* são denominadas EAEC típicas e as que não albergam este gene são denominadas EAEC atípicas (HARRINGTON *et al.*, 2006).

A proteína dispersina constitui um importante fator de virulência em EAEC. Czczulin *et al.* (1999) descreveram o gene *aspU* como sendo responsável por codificar uma proteína secretada, localizado no plasmídeo pAA2 da amostra 042, *upstream* ao gene *aggR*. Anos mais tarde, Sheikh *et al.* (2002) identificaram que *aspU* estava sob controle do ativador transcricional *aggR* e alteraram a nomenclatura deste gene para

aap (*anti-aggregation protein*). Embora o gene tenha sido descrito em 1999 e a proteína caracterizada em 2002, Nataro *et al.* (1992) mostraram a reatividade do soro de voluntários que receberam inóculos de amostras de EAEC 17-2 (sorotipo O3:H2) contra uma proteína de massa molecular semelhante à da dispersina em extratos bacterianos dessa mesma amostra. Isso sugere que a dispersina seja imunogênica.

O produto de *aap*, denominado dispersina ou proteína anti-agregação, apresenta 10,2 kDa, possui uma seqüência sinal e é secretado para o meio extracelular, onde permanece ligado ao lipopolissacarídeo da bactéria, neutralizando a carga negativa da superfície externa e permitindo a projeção das fímbrias (VELARDE *et al.*, 2007). Mutantes neste gene possuem uma autoaglutinação muito intensa, indicando que a dispersina atua diminuindo a autoagregação das bactérias, permitindo a dispersão das mesmas. Além disso, as cepas mutantes em *aap* apresentam as fímbrias que medeiam a adesão agregativa (AAF/II) colabadas sobre a superfície da bactéria, ao contrário da amostra selvagem que apresenta as fímbrias projetadas (SHEIKH *et al.* 2002). A translocação da dispersina através da membrana externa está relacionada a um sistema de transporte dependente de ATP (*ATP-binding cassette transporter system*) (NISHI *et al.*, 2003).

Recentemente Velarde *et al.* (2007) descreveram a estrutura da molécula da dispersina. Ela é composta por duas estruturas opostas em folhas- β e duas estruturas em α -hélice em cada pólo. A molécula é estável por uma única ponte dissulfeto e um extenso core hidrofóbico. Até o presente momento a dispersina foi descrita como uma proteína imunogênica exclusiva de EAEC, sendo, desta forma, considerada um promissor antígeno vacinal para esse patótipo (NISHI *et al.*, 2003; SHEIKH *et al.*, 2002).

Como EAEC abrange um grupo bastante heterogêneo de bactérias, torna-se difícil estabelecer técnicas diagnósticas apropriadas. Albert *et al.* (1993) demonstraram a formação de uma película em caldo Müller-Hinton por cepas de EAEC. As amostras não pertencentes ao patótipo EAEC não apresentaram tal película sob as mesmas condições de cultivo e o uso deste método foi sugerido para identificação rápida e barata destes microorganismos. A detecção da formação de biofilme em poliestireno ou vidro também já foi descrita para o diagnóstico de EAEC (BANGAR; MAMATHA, 2008; WAKIMOTO *et al.*, 2004). Com o advento da biologia molecular, técnicas rápidas de

diagnóstico começaram a ser desenvolvidas. Baudry *et al.* (1990) desenvolveram uma sonda molecular, denominada inicialmente CVD432, para identificar cepas deste patótipo. Posteriormente essa sonda passou a ser referida como sonda AA ou sonda EAEC. Esse fragmento sonda foi derivado do plasmídeo da amostra 17-2 e mostrou-se 89% sensível e 99% específico para a detecção de EAEC. Em 1995, Schmidt *et al.* (1995), desenharam um par de iniciadores que amplificam uma região de 630 pb da sonda EAEC e padronizaram um teste de PCR para detecção deste fragmento. Cerna *et al.* (2003) desenvolveram um PCR *multiplex* para detecção simultânea de três genes codificados no plasmídeo pAA: fragmento sonda EAEC, *aggR* e *aap*. Recentemente, Cordeiro *et al.* (2008) avaliaram a técnica descrita por Cerna *et al.* (2003) em amostras isoladas de fezes de pacientes no Rio de Janeiro e obtiveram especificidade de 81% e sensibilidade de 93,5%.

Apesar das tentativas de criar técnicas fenotípicas e moleculares sensíveis e específicas para realizar o diagnóstico de EAEC, o ensaio para detecção do padrão AA em células HEp-2 continua sendo o teste padrão para a identificação deste patótipo. Torna-se cada vez mais evidente que nenhum dos fatores de virulência descritos até o momento para EAEC é encontrado em todos os isolados desse patótipo, o que dificulta o desenvolvimento de provas moleculares baseadas em genes plasmidiais ou cromossômicos. O ensaio em células HEp-2 requer tempo e profissionais especializados, podendo ser feito, com caráter diagnóstico, em apenas alguns laboratórios no mundo, mas continua sendo a técnica mais confiável e reprodutível para a identificação correta deste patótipo (HARRINGTON *et al.*, 2006).

O ensaio de PCR descrito por Cerna *et al.* (2003) demonstrou ser sensível para a detecção de amostras de EAEC típicas. Entretanto, tão importante quanto determinar a sensibilidade de uma técnica diagnóstica, é verificar a especificidade da mesma, assegurando que amostras negativas não reajam aos marcadores utilizados. Desta forma, a presença dos três marcadores de EAEC (*aatA*, *aap* e *aggR*) foi pesquisada neste estudo em amostras de *E. coli* pertencentes aos diversos patótipos de ECD, no intuito de determinar a especificidade dos mesmos na detecção de amostras de EAEC.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Pesquisar a presença de três marcadores de virulência de EAEC (*aatA*, *aggR* e *aap*) em amostras de outros patótipos de *E. coli* diarreiogênica;
2. Caracterizar o gene *aap* encontrados nas amostras pesquisadas;
3. Avaliar a expressão da proteína Dispersina nas amostras que albergam o gene *aap* e seu possível envolvimento na adesão *in vitro* dessas bactérias.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meios de cultura e soluções

Todos os meios de cultura utilizados para o cultivo e manutenção das amostras bacterianas, assim como as soluções utilizadas nas diversas técnicas descritas a seguir, exceto quando indicado, foram preparados de acordo com Sambrook *et al.* (1989).

3.2 Amostras bacterianas

A pesquisa dos genes *aap*, *aatA* e *aggR* em outros patótipos de *E. coli* diarreiogênica foi realizada em 149 amostras de EPEC atípica, 26 amostras de EPEC típica, 7 amostras de EHEC, 14 amostras de EIEC, 23 amostras de DAEC e 24 amostras de ETEC. O isolamento e caracterização dessas amostras foram descritos previamente (BUERIS *et al.*, 2007; MAIRENA *et al.*, 2004; MARTINEZ *et al.*, 1999; MENEZES *et al.*, 2006; TADDEI *et al.*, 2003).

As amostras utilizadas como controles positivos nos experimentos de PCR estão listadas na tabela 1. Como controle negativo foi empregada a amostra de *E. coli* DH5 α (HANAHAHAN, 1983).

Nos experimentos de clonagem foram empregadas as amostras *E. coli* JM109, como hospedeira do vetor pGEM-T Easy (Promega, EUA) e *E. coli* BL21(DE), como hospedeira do vetor pET28a (Novagen, EUA).

As amostras E2348/69 e 042, descritas na tabela 1, e as amostras C1845 / sorotipo O78:HNM (BILGE *et al.*, 1989) e 29-HSP-147 / sorotipo O111ab:H9 (PELAYO *et al.*, 1999) foram empregadas como controles na determinação dos padrões de adesão em células HEp-2 das amostras deste estudo.

Tabela 1 - Amostras utilizadas como controle positivo nas reações de PCR deste estudo

Amostra	Sorotipo ou sorogrupo	Controle positivo para detecção dos genes	Referência
E2348/69	O127:H6	<i>eae</i>	LEVINE <i>et al.</i> , 1978
042	O44:H18	<i>aatA</i> , <i>aap</i> , <i>aggR</i> , <i>aafA</i> , <i>aafC</i> , <i>shf</i> , <i>irp2</i> , <i>astA</i> , <i>pet</i> e <i>pic</i>	NATARO <i>et al.</i> , 1985
17-2	O3:H2	<i>aggA</i> e <i>aggC</i>	NATARO <i>et al.</i> , 1987
A30	O75	<i>agg3C</i>	LABIGNE-ROUSSEL; FALKOW, 1988
RN785-1	O1:HNT ^a	<i>agg3A</i>	ZAMBONI <i>et al.</i> , 2004
236	O111:H12	<i>ap58</i>	MONTEIRO-NETO <i>et al.</i> , 2005
C1096	O4:HNT	<i>pilS</i>	COBELJIC <i>et al.</i> , 1996
H10407	O78:H11	<i>lta</i>	EVANS; EVANS, 1973
3950	O6	<i>sta</i>	BUERIS <i>et al.</i> , 2007
FBC124-13	O124:HNM ^b	<i>ipaH</i>	MARTINEZ <i>et al.</i> , 1999
3104-88	O157:H7	<i>stx</i>	WHITTAM; WILSON, 1988

^a HNT, antígeno H não tipável; ^b HNM, amostra imóvel.

3.3 Pesquisa dos genes *aap*, *aggR* e *aatA*

3.3.1 Reação de polimerase em cadeia (PCR)

Os genes *aap*, *aggR* e *aatA* foram pesquisados através da técnica de PCR em uma coleção de 149 amostras de EPEC atípicas, 26 EPEC típicas, 7 EHEC, 24 ETEC, 14 EIEC e 23 DAEC de diversos sorotipos. As amostras 042 e DH5 α foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. Os pares de iniciadores e os ciclos de amplificação utilizados, bem como os tamanhos dos fragmentos amplificados em cada reação, encontram-se descritos na tabela 2.

Os lisados bacterianos utilizados como DNA molde nas reações de amplificação foram obtidos da seguinte forma: uma colônia isolada de uma placa de ágar Luria Bertani (LB) foi transferida para um tubo de polipropileno contendo 300 μ L de água

MilliQ estéril, submetida à fervura por 10 min e imediatamente resfriada em banho de gelo. Para cada reação foram utilizados 0,2 µM de cada um dos iniciadores (*forward* e *reverse*), 2,5 U de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, EUA), 1,5 mM de cloreto de magnésio, tampão de PCR 1X e 0,2 mM da mistura de dNTPs (Invitrogen). Em cada reação foi utilizado 1 µL do DNA molde. Após a amplificação, os produtos obtidos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose.

Tabela 2 - Seqüência dos iniciadores utilizados para detecção dos genes *aap*, *aggR* e *aatA*, ciclos de amplificação e tamanho dos fragmentos amplificados

Genes	Seqüências dos iniciadores	Ciclo	Amplicon	Referência
<i>aap</i>	(F) CTTTTCTGGCATCTTGGGT (R) GTAACAACCCCTTTGGAAGT	30 x (1 min 94 °C, 1 min 51 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	232 pb	CZECZULIN <i>et al.</i> , 1999
<i>aggR</i>	(F) CTAATTGTACAATCGATGTA (R) ATGAAGTAATTCTTGAAT	30 x (1 min 94 °C, 1 min 40 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	308 pb	CZECZULIN <i>et al.</i> , 1999
<i>aatA</i>	(F) CTGGCGAAAGACTGTATCAT (R) CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	30 x (40 s 94 °C, 1 min 53 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	630 pb	SCHMIDT <i>et al.</i> , 1995

(F), iniciador *forward*; (R), iniciador *reverse*.

3.3.2 Eletroforese em gel de agarose

Os géis foram preparados por aquecimento, fundindo-se agarose (Invitrogen) em tampão TBE 0,5x (tris (hidroximetil)aminometano 44,5 mM; ácido bórico 44,5 mM; ácido etilenodiaminotetracético [EDTA] 1mM), na concentração final de 0,8 ou 1%. Os fragmentos de DNA resultantes das PCR foram acrescidos de tampão de amostra 1x (azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol 0,25%; glicerol 30%). Como marcador de peso molecular foi utilizado o 1 *kb DNA Ladder* (Invitrogen) ou o *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen). Após a corrida eletroforética, realizada sob corrente constante de 75 V em tampão TBE 0,5x, os géis foram corados em solução de brometo de etídio na concentração de 10 µg/mL durante 10 min, observados em transiluminador de luz ultravioleta e as imagens foram registradas através do sistema de captação de imagem AlphaImager 2200 (Alpha Innotech, EUA).

3.4 Confirmação da presença do gene *aap*

Inicialmente o gene *aap*, que codifica a dispersina, foi detectado nas amostras deste estudo utilizando os iniciadores descritos por Czczulin *et al.* (1999). Diante dos resultados positivos obtidos, o experimento foi repetido com iniciadores desenhados para este estudo [disp1(F) e disp1(R)]. Estes iniciadores amplificam um fragmento de 347 pb, do nucleotídeo 29, partindo do códon de iniciação, ao nucleotídeo 391, localizado 24 bases *downstream* ao códon de terminação do gene *aap* (número de acesso no GenBank: Z32523). A sequência desses iniciadores está descrita a seguir: disp1(F) CTGGCATCTTGGGTATCAG; disp1(R) TGAAATTTTAGCTAGAGCTCG. A amplificação desse fragmento foi realizada em 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C e 1 min a 72 °C, seguidos de uma extensão de 8 min a 72 °C. As reações de PCR e a eletroforese em gel de agarose foram realizadas conforme descrito nos itens 3.3.1 e 3.3.2.

3.5 Seqüenciamento do gene *aap*

Seis amostras deste estudo, positivas para o gene *aap*, foram selecionadas aleatoriamente para seqüenciamento do amplicon do referido gene. O amplicon *aap* da amostra 042 foi seqüenciado em conjunto a fim de servir como controle para análise dos resultados. O seqüenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano (Universidade de São Paulo). Os produtos de PCR foram obtidos com os iniciadores disp1(F) e disp1(R). Os *amplicons* foram purificados a partir do gel de agarose utilizando-se o *DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, EUA). As duas fitas de DNA foram seqüenciadas para todas as amostras. Para as reações de seqüenciamento foi utilizado o seqüenciador automático *MegaBACE 1000* (Amersham Pharmacia Biotech, EUA). As reações foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando o *kit APBiotec DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* (empregando a *Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase*) e os iniciadores disp1(F) e disp1(R). As seqüências obtidas foram analisadas e alinhadas com auxílio dos *softwares* GeneDoc e ClustalX. Todas as seqüências de aminoácidos deduzidas foram

alinhas com a seqüência de aminoácidos deduzida da proteína Aap da amostra protótipo de EAEC 042 (número de acesso no GenBank: Z32523).

3.6 Amplificação e seqüenciamento do gene *eae*

A presença do gene *eae*, que codifica a proteína intimina, foi pesquisada através da técnica de PCR (item 3.3.1) nas amostras positivas para o gene *aap*. As amostras E2348/69 e DH5 α foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. Essas amostras tiveram os fragmentos amplificados a partir dos iniciadores Int_{FC} e Int_{RC} (BATCHELOR *et al.*, 1999), os quais amplificam a porção conservada da intimina (Int₃₈₈₋₆₆₇). As amostras também foram testadas utilizando um par de iniciadores descritos por Aranda *et al.* (2004) e outro par de iniciadores gentilmente cedidos pelo Dr. Miguel Blanco (Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha). Os iniciadores e ciclos de amplificação utilizados, bem como os fragmentos gerados, encontram-se descritos na tabela 3.

Para o seqüenciamento do amplicon referente ao gene *eae* foram selecionadas aleatoriamente as amostras 84, 179, 227, 251, 268, 300, 427, 901, 1045, 1296, 1437, 1646, 1719 e 1923. Os fragmentos amplificados foram purificados, quantificados e seqüenciados conforme descrito no item 3.5.

3.7 Pesquisa de genes de virulência de outros patótipos de *E. coli*

Foram pesquisados os genes *stx*, *lta*, *sta* e *ipaH* nas amostras positivas para *aap*, previamente caracterizadas como EPEC atípica. As seqüências dos iniciadores, ciclos de amplificação e os fragmentos gerados estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Sequência dos iniciadores utilizados para detecção dos genes *eae*, *lta*, *sta*, *stx* e *ipaH*, ciclos de amplificação e tamanho dos fragmentos amplificados

Gene	Sequências dos iniciadores	Ciclo	Amplicon	Referência
<i>eae</i>	(Int _{FC}) CCGGAATTCGGGATCGATTACCGTCAT (Int _{RC}) CCCAAGCTTTTATTTATCAGCCTTAATCTC	30 x (20 s 94 °C, 1 min 45 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	840 pb	BATCHELOR <i>et al.</i> , 1999
<i>eae</i> ^a	(EAE-V3F) CATTGATCAGGATTTTTCTGGT (EAE-MBR) TCCAGAATAATATTGTTATTACG	35 x (1 min 94 °C, 40 s 55 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	510 pb	Nº de acesso no GenBank: AF453441
<i>eae</i>	(EAE1) CTGAACGGCGATTACGCGAA (EAE2) CCAGACGATACGATCCAG	50 °C 2 min, 95 °C 5 min, 40 x (1 min 95 °C, 1 min 50 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	917 pb	ARANDA <i>et al.</i> , 2004
<i>lta</i>	(F) GGCGACAGATTATACCGTGC (R) CCGAATTCTGTTATATATGTC	30 x (1 min 94 °C, 1 min 50 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	696 pb	SCHULTSZ <i>et al.</i> , 1994
<i>sta</i>	(F) TCCCTCAGGATGCTAAAC (R) GCAACAGGTACATACGTCAT	30 x (40 s 94 °C, 1 min 57 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	240 pb	MOSELEY <i>et al.</i> , 1983
<i>stx</i>	(F) GAACGAAATAATTTATATGT (R) TTTGATTGTTACAGTCAT	30 x (1 min 94 °C, 1 min 43 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	500 pb	YAMASAKI <i>et al.</i> , 1996
<i>ipaH</i>	(F) GTTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC (R) GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	30 x (40 s 94 °C, 1 min 60 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	620 pb	HARTMAN <i>et al.</i> , 1990

^a Sequência dos iniciadores e condições de amplificação gentilmente cedidas pelo Dr. Miguel Blanco (Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha).

Int_{FC}, iniciador *forward*; Int_{FR}, iniciador *reverse*; EAE-V3F, iniciador *forward*; EAE-MBR, iniciador *reverse*; (F), iniciador *forward*; (R), iniciador *reverse*.

3.8 Ensaio de adesão em células HEp-2

3.8.1 Preparo das células e das amostras bacterianas

Células HEp-2 foram cultivadas em garrafas de 50 mL (Nunc, EUA) contendo 12 mL de Meio Mínimo Essencial de Eagle, modificado por Dulbecco (DMEM; Cultilab, Brasil) contendo antibióticos (penicilina, 1000 U/mL; estreptomicina, 1 mg/mL), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab), e mantidas por 2 a 3 dias a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂. Após o período de incubação, as células foram

transferidas para placas de 24 orifícios contendo lamínulas de vidro, em uma concentração de 5×10^4 células/mL, e incubadas por 48h sob as mesmas condições. As amostras bacterianas foram inoculadas em 3 mL de caldo tripticase de soja (TSB) e incubadas a 37 °C por 18h.

3.8.2 Ensaio de adesão

O teste foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Cravioto *et al* (1979). Uma alíquota de 40 µL da cultura bacteriana foi adicionada a cada orifício da placa contendo a cultura de células, previamente lavadas por 5 vezes com tampão salina-fosfato (PBS) 1x (cloreto de sódio 137 mM; cloreto de potássio 2,7 mM; fosfato de sódio dibásico 8,1 mM; fosfato de potássio monobásico 1,5 mM; pH 7,4), e acrescidas de 960 µL de meio DMEM sem antibiótico, contendo 2% de SFB e 1% de D-manose. Após incubação por 3 ou 6h a 37 °C, as placas foram novamente lavadas por 5 vezes com PBS 1x, a fim de remover as bactérias que não aderiram às células. Nos os ensaios de 3h, as células foram fixadas com metanol absoluto durante 30 min à temperatura ambiente. Nos ensaios de 6h, após as 3 primeiras horas de incubação, as placas foram lavadas por 5 vezes com PBS 1x, acrescidas de 1 mL de meio DMEM sem antibiótico (2% de SFB e 1% de D-manose), e incubadas por mais 3h a 37 °C em atmosfera de CO₂. Em seguida, foram novamente lavadas por 5 vezes com PBS 1x e fixadas com metanol absoluto durante 30 min à temperatura ambiente.

Após a fixação, as células foram coradas por 5 min com o corante eosina-azul de metileno em solução segundo May-Grünwald (Merck, Alemanha), diluído na razão 1:2 em tampão Sørensen (fosfato de potássio monobásico 8,6 mM; fosfato de sódio dibásico 28,6 mM). Em seguida, esse corante foi desprezado sendo então acrescentada a solução corante de azur-eosina-azul de metileno segundo Giemsa (Merck) diluída na razão 1:3 em tampão Sørensen, por 20 min. Após lavagem para retirada do excesso de corante, as lamínulas foram secas à temperatura ambiente e montadas em lâminas para microscopia com Entellan (Merck). As lâminas foram analisadas através de microscopia óptica, em aumento de 1.000 vezes.

Os padrões de adesão foram determinados em comparação aos apresentados pelas amostras padrão E2348/69 (adesão localizada), 042 (adesão agregativa), C1845 (adesão difusa) e 29-HSP-147 (adesão localizada-*like*), segundo as definições de Scaletsky *et al.* (1984), Nataro *et al.* (1987) e Scaletsky *et al.* (1999).

3.9 Sorotipagem das amostras

A sorotipagem das amostras foi realizada em colaboração com o Dr. Jorge Blanco Alvarez (Laboratório de Referência de *Escherichia coli*, Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha), utilizando a metodologia descrita por Guinée *et al.* (1981) e anti-soros específicos para os antígenos O (O1 a O185) e H (H1 a H56).

3.10 Detecção de genes de virulência de EAEC

Os genes *aagA*, *aggC*, *aafA*, *aafC*, *agg3A*, *agg3C*, *astA*, *pet*, *pic*, *irp2*, *shf*, *pilS* e *ap58* foram pesquisados através da técnica de PCR, utilizando-se iniciadores descritos na literatura ou construídos para este estudo. As seqüências, ciclos de amplificação, tamanho dos fragmentos obtidos e referências estão listados na tabela 4. As reações de PCR e corrida eletroforética foram realizadas conforme descrito nos itens 3.3.1. e 3.3.2. Os controles positivos para cada uma das reações estão descritos na tabela 1.

Tabela 4 - Sequência dos iniciadores, ciclos de amplificação e tamanho dos fragmentos amplificados nas reações de PCR utilizados para a pesquisa de fatores de virulência de EAEC

Gene	Sequências dos iniciadores	Ciclo	Amplicon	Referência
<i>aggA</i>	(F) TTAGTCTTCTATCTAGGG (R) AAATTAATTCCGGCATGG	30 x (1 min 94 °C, 1 min 55 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	450 pb	CZECZULIN <i>et al.</i> , 1999
<i>aggC</i>	(F) TATTAAACCATGGTAAGC (R) ACCAAGATCCGAGATTGA	30 x (1 min 94 °C, 1 min 45 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	538 pb	GIOPPO <i>et al.</i> , 2000
<i>aafA</i>	(F) TCAGAATGTTTGCGATTGCT (R) ATTTGTCACAAGCTCAGCAT	30 x (1 min 94 °C, 1 min 59 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	470 pb	Este estudo (Nº de acesso no GenBank: AF012835)
<i>aafC</i>	(F) GTTATAGCTCGCACATATTC (R) TGCAGACTGATAATGCTC	30 x (1 min 94 °C, 1 min 48 °C, 1min 72 °C), 8 min 72 °C	1.144 pb	ELIAS <i>et al.</i> , 2002
<i>agg3A</i>	(F) GTATCATTGCGAGTCTGGTATTGAG (R) GGGCTGTTATAGAGTAACTTCCAG	30 x (1 min 94 °C, 1 min 68 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	462 pb	BERNIER <i>et al.</i> , 2002
<i>agg3C</i>	(F) GTTTGGAACCGGGAATTAACATTG (R) ATACTTTAGATACCCCTCACGCAG	30 x (1 min 94 °C, 1 min 65 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	485 pb	BERNIER <i>et al.</i> , 2002
<i>astA</i>	(F) CCATCAACACAGTATATCCGA (R) GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	30 x (1 min 94 °C, 1 min 58 °C, 1 min e 30 s 72 °C), 8 min 72 °C	111 pb	YAMAMOTO <i>et al.</i> , 1997
<i>pet</i>	(F) GTGTTTCAACCAGGTTCAACA (R) CCTTCACCAATTTTATGCAGT	30 x (1 min 94 °C, 1 min 52 °C, 1 min e 30 s 72 °C), 8 min 72 °C	1.037 pb	GIOPPO <i>et al.</i> , 2000
<i>pic</i>	(F) GGGTATTGTCCGTTCCGAT (R) ACAACGATACCGTCTCCCG	30 x (45 seg 94 °C, 1 min 55 °C, 1 min e 30 s 72 °C), 8 min 72 °C	1.175 pb	HENDERSON <i>et al.</i> , 1999
<i>irp2</i>	(F) AAGGATTCGCTGTTACCGGAC (R) TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	30 x (1 min 94 °C, 1 min 55 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	264 pb	CZECZULIN <i>et al.</i> (1999)
<i>shf</i>	(F) ACTTTCTCCCGAGACATTC (R) CTTTAGCGGGAGCATTTCAT	30 x (1 min 94 °C, 1 min 51 °C, 1 min 72 °C), 8 min 72 °C	613 pb	CZECZULIN <i>et al.</i> (1999)
<i>pilS</i>	(F) ATGAGCGTCATAACCTGTTC (R) CTGTTGTTTCCAGTTTGAT	30 x (1 min 94 °C, 1 min 50 °C, 2 min 72 °C), 8 min 72 °C	534 pb	DUDLEY <i>et al.</i> , 2006a
<i>ap58</i>	(F) GGATGGCGCGGGTTTCAGAGG (R) CCGCCCGGGCATTGTGTCAGA	30 x (1 min 94 °C, 1 min 62,8 °C, 2 min 72 °C), 8 min 72 °C	591 pb	MONTEIRO-NETO <i>et al.</i> , 2003

(F), iniciador *forward*; (R), iniciador *reverse*.

3.11 Obtenção do clone para expressão da proteína dispersina

3.11.1 Clonagem do gene *aap* no vetor pGEM-T

3.11.1.1 Obtenção do inserto *aap*

O gene *aap* foi inicialmente clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega). Para isso, a partir do DNA da amostra 042 e utilizando os iniciadores disp4(F) e disp4(R), o gene *aap* foi amplificado através de PCR (item 3.3.1). Estes iniciadores amplificam um fragmento de 343 pb, do códon de iniciação ao códon de terminação do gene *aap*. A sequência desses iniciadores foi baseada na sequência publicada do gene *aap* (número de acesso no GenBank: Z32523) e está descrita a seguir: disp4(F) ATGAAAAAATTAAGTTTGTTATCTTT e disp4(R) AACCCATTCGGTTAGAGCACT. A amplificação desse gene foi realizada em 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 30 seg a 60 °C e 1 min a 72 °C, seguidos de uma extensão de 8 min a 72 °C, utilizando *Taq platinum* (Invitrogen). Após a eletroforese em gel de agarose (item 3.3.2) o fragmento foi purificado a partir do gel, utilizando-se o *DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) e quantificado, comparando-se a intensidade das bandas obtidas com as bandas do marcador *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) em eletroforese em gel de agarose a 1% (item 3.3.2).

3.11.1.2 Ligação do inserto ao vetor pGEM-T

O gene *aap* foi clonado no vetor comercial pGEM-T Easy (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. A quantidade de inserto adicionada à mistura foi calculada de forma que representasse aproximadamente três vezes a concentração do vetor. A reação foi incubada durante 18h a 4 °C.

3.11.1.3 Transformação por eletroporação

Para a eletroporação da reação de ligação descrita anteriormente as células eletrocompetentes foram preparadas conforme descrição a seguir. A amostra de *E. coli* JM109 (Promega) foi cultivada em 3 mL de caldo LB acrescido de ampicilina (100 µg/mL) por 18h a 37 °C sob agitação constante de 300 rpm. Uma alíquota de 2

mL do pré-inóculo foi transferida para 250 mL de LB também acrescidos de ampicilina (100 µg/mL), sendo então cultivada sob as mesmas condições anteriores, até que atingisse a absorbância de 0,5 a 0,6 em comprimento de onda de 600 nm. As células bacterianas foram então incubadas em banho de gelo por 15 min, transferidas para um tubo de centrifugação pré-resfriado e centrifugadas por 20 min a 5.000 g sob refrigeração de 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes com 250 mL de água MilliQ estéril resfriada a 4 °C. As células foram gentilmente ressuspensas em 30 mL de glicerol 10% resfriado a 4 °C e centrifugadas a 5.000 g por 10 min sob refrigeração a 4 °C. Ao sedimento bacteriano foram adicionados 300 µl de glicerol resfriado (4 °C) para ressuspender gentilmente as células bacterianas. A suspensão foi aliquoteada (50 µL) em tubos de polipropileno pré-resfriados e imediatamente congelada a -80 °C.

Para a eletroporação, 1 µL da reação de ligação foi adicionado a 50 µL de células JM109 eletrocompetentes descongeladas em banho de gelo. O eletroporador *GenePulser* (Biorad, EUA) foi ajustado para 2,5 kV, 25 µF e pulso de 200 Ω. Após o pulso foram adicionados 950 µL de meio de cultivo SOC (cloreto de sódio 10 mM; cloreto de potássio 2,5 mM; cloreto de magnésio 10 mM; sulfato de magnésio 20 mM; glicose 20 mM; triptona 2%; extrato de levedura 0,5%) e essa suspensão foi incubada a 37 °C sob agitação de 250 rpm durante 1h. A suspensão foi semeada em volumes de 50, 100 e 200 µL em ágar LB acrescido de 40 µg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo (X-Gal), 1 mM de isopropil-β-D-tiogalactosidase (IPTG) e 100 µg/mL de ampicilina e as placas foram incubadas a 37 °C por 24h.

3.11.1.4 Seleção do clone contendo o inserto *aap* no vetor pGEM-T Easy

Dez colônias brancas, indicando a clonagem de um inserto no vetor, foram selecionadas para confirmação da clonagem de *aap*. Lisados bacterianos dessas colônias foram obtidos (item 3.3.1) e utilizados em reações de PCR com os iniciadores *disp4*(F) e *disp4*(R), seguindo-se o procedimento descrito para amplificação do inserto a partir da amostra 042. Após análise através de eletroforese em gel de agarose (item 3.3.2), uma amostra apresentando o amplicon correspondente ao gene *aap* foi selecionada para cultivo em caldo LB contendo ampicilina (100 µg/mL) e 15% de glicerol e mantida a -80 °C. Essa amostra foi denominada JM109(pBTM1).

Para confirmar a inserção correta do gene *aap* no sítio de clonagem do vetor, o plasmídeo pBTM1 foi extraído da amostra hospedeira para análise. A extração foi realizada com auxílio do *Qiagen Plasmid Midi Kit* (Qiagen, EUA), a partir de um volume de 200 mL de cultura em caldo LB contendo ampicilina (100 µg/mL). O plasmídeo pBTM1 foi digerido com a enzima *EcoRI* (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. O produto da digestão do pBTM1 foi analisado através de eletroforese em gel de agarose (item 3.3.2). Após a confirmação da clonagem, o fragmento liberado pela digestão com a enzima, contendo o gene flanqueado pelas seqüências de restrição para *EcoRI*, foi purificado a partir do gel (item 3.11.1.1) e mantido a -20 °C para posterior clonagem no vetor de expressão pET28a.

3.11.2 Sub-clonagem de *aap* no vetor de expressão pET28a

3.11.2.1 Extração e preparo do vetor pET28a

O plasmídeo pET28a foi extraído da amostra hospedeira BL21(DE3) com auxílio do *Qiagen Plasmid Midi Kit*, a partir de um volume de 200 mL de cultura em caldo LB contendo canamicina (50 µg/mL). O plasmídeo extraído foi digerido com a enzima *EcoRI* (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante e em seguida quantificado em gel de agarose a 0,8%, comparando-se a intensidade da banda obtida com o marcador *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen).

Para aumentar a eficiência da ligação, evitando que o vetor religasse suas duas extremidades coesivas ao invés de se ligar ao inserto desejado, aproximadamente 1 pmol de pET28a linearizado foi tratado com fosfatase alcalina (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Para inativar a ação da enzima, o vetor tratado foi purificado através de uma eletroforese em gel de agarose a 0,8% e eluído do gel utilizando-se o *DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare).

3.11.2.2 Ligação do inserto ao vetor pET28a

O inserto flanqueado pela região de restrição para a enzima *EcoRI* foi liberado do vetor pGEM-T Easy (item 3.11.1.4) e ligado ao vetor pET28a utilizando-se T4

DNA ligase (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante. A concentração de inserto utilizada foi cerca de 5 vezes maior que a concentração de vetor. A reação de ligação foi incubada por 18h a 16 °C.

3.11.2.3 Transformação por eletroporação

A amostra de *E. coli* BL21(DE3) foi cultivada em 3 mL de caldo LB acrescido de canamicina (50 µg/mL) por 18h a 37 °C sob agitação constante de 300 rpm. Uma alíquota de 2 mL desse pré-inóculo foi transferida para 250 mL de LB, contendo canamicina (50 µg/mL) e a cultura foi cultivada sob agitação de 300 rpm a 37 °C até que atingisse a absorbância de 0,5 a 0,6 em comprimento de onda de 600 nm. O preparo das células eletrocompetentes ocorreu conforme descrito no item 3.11.1.3.

Para a eletroporação, 1 µL da ligação foi adicionado a 50 µL de células BL21(DE3) eletrocompetentes descongeladas em banho de gelo. O procedimento de eletroporação ocorreu seguindo os parâmetros descritos no item 3.11.1.3.

As bactérias transformadas foram semeadas em placas de ágar LB acrescidas de canamicina (50 µg/mL). Foram utilizadas quatro placas, nas quais foram semeados 50, 100, 200 e 300 µl da cultura das células transformadas e as mesmas foram incubadas por 18h a 37 °C.

3.11.2.4 Seleção do clone contendo o inserto *aap* no vetor pET28a

Cinquenta colônias resistentes à canamicina, indicando a presença do pET28a, foram selecionadas para confirmação da correta clonagem de *aap*. Lisados bacterianos dessas colônias foram obtidos (item 3.3.1) e utilizados em reações de PCR com os iniciadores disp4(F) e disp4(R), seguindo-se o procedimento descrito para amplificação do inserto a partir da amostra 042. Após análise através de eletroforese em gel de agarose (item 3.3.2), dez amostras apresentando o amplicon correspondente ao gene *aap* foram selecionadas para a extração dos seus plasmídeos com auxílio do *Qiagen Plasmid Midi Kit*, conforme descrito no item 3.11.2.1.

Uma vez que a clonagem no vetor pET28a foi realizada no sítio de *EcoRI*, o fragmento contendo o gene *aap* poderia inserir-se em dois sentidos distintos, ou seja, 5'-3' ou 3'-5'. Entretanto, a proteína correta só seria expressa se o gene

estivesse na orientação 5'-3' para transcrição. Para verificar a inserção do fragmento clonado no vetor, os mapas de restrição do plasmídeo e do inserto foram analisados quanto a possíveis enzimas que poderiam indicar, através dos fragmentos gerados, em qual sentido teria ocorrido a inserção. A enzima escolhida foi *Accl*.

Os plasmídeos das amostras positivas para *disp4* foram extraídos, utilizando-se o *Qiagen Plasmid Mini Kit* (Qiagen) e digeridos com a enzima *Accl* (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante.

De acordo com as análises dos perfis de restrição do vetor e inserto, se o sentido da inserção estivesse correto a digestão geraria três fragmentos: um de 225 pb, um de 2.232 pb e outro de 3.255 pb. Após análise através de eletroforese em gel de agarose (item 3.3.2), uma amostra apresentando os fragmentos corretos foi selecionada para cultivo em caldo LB contendo canamicina (50 µg/mL) e 15% de glicerol e mantida a -80 °C. Essa amostra foi denominada BL21(DE3)-pBTM2.

3.12 Expressão e purificação da proteína His₆-Aap

3.12.1 Indução da expressão e localização da proteína recombinante na amostra hospedeira BL21(DE3)-pBTM2

Para que a proteína recombinante pudesse ser purificada foi necessário inicialmente determinar em qual fração His₆-Aap estava sendo liberada. Foi pesquisado se a proteína era secretada no meio de cultura, se estava em corpúsculos insolúveis ou se estava solúvel no citoplasma. Para isso, a primeira etapa deste protocolo consistiu em induzir a expressão da proteína desejada.

A bactéria BL21(DE3)-pBTM2 foi cultivada em 3 mL de caldo LB contendo canamicina (50 µg/mL) por 18h a 37 °C sob agitação constante de 250 rpm. Essa pré-cultura foi inoculada na diluição de 1:10 em 200 mL de caldo LB contendo canamicina (50 µg/mL) e incubada a 37 °C sob agitação de 300 rpm. O crescimento foi acompanhado até que a absorbância estivesse entre 0,6 e 0,8 em comprimento de onda de 600 nm. Um mL desse cultivo foi retirado, centrifugado a 5.000 g por 5 min e armazenado a -20 °C. Essa fração foi denominada “fração não induzida”. Em seguida, para induzir a expressão da proteína recombinante, foi adicionado 1 mM de isopropil-β-D-tiogalactosidase (IPTG) ao restante da cultura e esta foi incubada por

3h a 37 °C sob agitação de 300 rpm. Após este período, uma alíquota de 1 mL foi retirada, centrifugada a 5.000 g por 5 min a 4 °C e armazenada a -20 °C. Essa fração foi denominada “fração induzida”.

O restante da cultura induzida foi centrifugada a 5.000 g por 15 min a 4 °C e o sedimento e sobrenadante foram separados. Para verificar se a proteína estava sendo liberada no meio de cultura foram adicionados 5 volumes de acetona para 1 volume do sobrenadante e a mistura foi incubada a -20 °C por 30 min. A fração foi centrifugada a 11.000 g por 30 min a 4 °C. A acetona foi descartada, o sedimento foi ressuspenso em água e mantido a -20 °C. Essa fração foi denominada “fração secretada”. Para verificar se a proteína estava no interior de corpúsculos insolúveis o sedimento resultante dessa centrifugação foi ressuspenso em 30 mL de tampão de ligação (fosfato de sódio monobásico 20 mM; cloreto de sódio 0,5 M; imidazol 5 mM). As células foram rompidas por pressão em *French Press Cell Disruptor* (Thermo Electron Corporation, EUA) sob pressão de 2.000 ψ e acondicionadas em banho de gelo. Foi adicionado 1 mM do inibidor de protease fluoreto de α -toluenosulfonila (PMSF). Essa suspensão foi então centrifugada a 5.000 g por 30 min a 4 °C. Para determinar se a proteína estava solúvel no citoplasma da bactéria, o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,4 μ m (Millipore, EUA) e resfriado a -20 °C. Essa fração foi denominada “fração solúvel”. Em seguida, o sedimento dessa última centrifugação foi lavado duas vezes com tampão de lise (hipofosfito de sódio 20 mM; cloreto de sódio 500 mM; Triton X-100 0,1%; β -mercaptoetanol 5 mM; uréia 2 M) e centrifugado a 5.000 g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e resfriado a -20 °C. Essa fração foi denominada “fração insolúvel”.

3.12.2 Análise das proteínas através de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Todas as alíquotas reservadas foram analisadas através de SDS-PAGE (20%) em condições desnaturantes, segundo o protocolo descrito por Laemmli *et al.* (1970). Os extratos de proteínas das frações “não-induzida”, “induzida”, “secretada”, “solúvel” e “insolúvel” foram misturadas ao tampão de corrida (tris (hidroximetil)aminometano hidrocloreto 0,25 M; dodecil sulfato de sódio 8%; glicerol 80%; azul de bromofenol 0,04%; pH 6,8) acrescido de β -mercaptoetanol (Sigma, EUA) na proporção de 1:20. Como padrão de massa molecular foi utilizado o Protein

Mixture (GE Healthcare). A corrida eletroforética ocorreu em corrente constante de 60 V por aproximadamente 3h em tampão Tris-Glicina (tris (hidroximetil)aminometano 3%; glicina 14%; dodecil sulfato de sódio 1%). Após a corrida, o gel foi corado com corante *Comassie Brilliant Blue* (Biorad) por cerca de 1h sob leve agitação. Depois de corado, o gel foi incubado com solução descorante (metanol 45%; ácido acético glacial 10%) sob leve agitação, até que as bandas correspondentes às proteínas fossem observadas.

3.12.3 Purificação da proteína His₆-Aap

Depois de determinada a fração onde a proteína recombinante estava sendo expressa, a proteína foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel modelo. A expressão da proteína foi novamente induzida, como descrito no item 3.12.1. Após a lise das células em *French Press* (item 3.12.1), o sobrenadante foi filtrado em membranas de 0,4 µm (Millipore) e homogeneizado com 5 mL da resina *Ni Sepharose High Performance* (GE Healthcare). A suspensão foi transferida para uma coluna de plástico contendo um filtro na extremidade. Após a sedimentação da resina na base da coluna foram feitas sucessivas lavagens com tampão de lavagem (fosfato de sódio monobásico 20 mM; cloreto de sódio 0,5 M; imidazol 20 mM). A proteína foi eluída com 10 mL de tampão de eluição (fosfato de sódio monobásico 20 mM; cloreto de sódio 0,5 M; imidazol 500 mM), coletando-se 1 mL por vez em tubos diferentes. As alíquotas foram armazenadas a -20 °C. Em todas as etapas, a concentração de proteína presente nas frações coletadas foi monitorada visualmente, misturando-se 20 µL da amostra com 100 µL do corante de Bradford (Sigma). As reações foram comparadas ao corante misturado com o tampão de ligação, lavagem ou eluição, conforme a etapa em andamento. Todas as frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE, coradas por *Comassie Brilliant Blue* e descoradas com solução descorante, conforme descrito no item 3.12.2. As frações obtidas da etapa de eluição foram colocadas em sacos de diálise de membrana com poro de 3 µm (Spectrum Laboratories, EUA) e dialisadas em água destilada por 48h a 4 °C, trocando-se a água em intervalos de tempo. A amostra foi concentrada, envolvendo-se a membrana de diálise em polietilenoglicol (Synth, Brasil) a 4 °C durante 18h, ressuspensa em 2 mL de água estéril e armazenada a

-20 °C. A concentração da proteína foi estimada em 1 mg/mL através da leitura de absorbância no comprimento de onda de 280 nm.

3.13 Produção do soro anti-dispersina

Ratos da raça Wistar foram imunizados com a proteína recombinante His₆-Aap para obtenção do soro policlonal anti-dispersina. Anteriormente à imunização foi coletado 0,5 mL de sangue de cada um dos animais para obtenção do soro pré-imune. Em seguida, dez ratos foram imunizados com aproximadamente 10 µg da proteína recombinante purificada. Duzentos microlitros da solução protéica foram diluídas em 800 µL de tampão PBS 1x e misturadas a 1 mL de adjuvante de Marcol-Montanide™ ISA 50V (SEPPIC, França). Cada animal recebeu 100 µL dessa suspensão por via intraperitoneal. Um reforço da imunização foi realizado com a mesma suspensão da proteína 21 dias após a primeira imunização. A concentração e volume do antígeno administrado e o procedimento utilizado foram os mesmos descritos anteriormente. Após sete dias da segunda imunização, foi coletado aproximadamente 1 mL de sangue de cada rato por punção na veia caudal. O sangue foi centrifugado por 15 min a 11.000 g e o soro foi separado para determinação do título através de ELISA.

Após a determinação do título dos soros, procedeu-se a sangria total dos animais. Os ratos foram pré-anestesiados com xilazina (10 mg/kg) e anestesiados com ketamina (90 mg/kg) por via intramuscular. O volume de sangue coletado foi centrifugado por 15 min a 11.000 g e o soro foi separado. Após inativação das proteínas do complemento a 56 °C durante 30 min, o soro foi mantido a -20 °C até o momento do uso.

3.14 *Imunoblotting* para detecção da proteína dispersina

Para detectar a expressão da dispersina nas amostras que albergam o gene *aap* foi realizado um *immunoblotting* empregando o soro anti-Aap obtido neste estudo. Inicialmente, para testar a especificidade do soro produzido foi realizado um ensaio de padronização do *immunoblotting*, utilizando-se as amostra EAEC 042

(controle positivo), *E. coli* DH5 α (controle negativo) e *E. coli* BL21(DE3)-pBTM2 (clone de expressão da proteína His₆-Aap).

As amostras 042 e DH5 α foram cultivadas em caldo LB acrescido de 0,5% de glicose sob agitação constante de 250 rpm a 37 °C, até entrarem em fase log de crescimento, determinada através da leitura da absorbância de 0,5 a 0,6 em comprimento de onda de 600 nm. A amostra BL21(DE3)-pBTM2 foi cultivada em caldo LB acrescido de canamicina (50 μ g/mL) sob agitação constante de 250 rpm a 37 °C até que atingisse a absorbância de 0,7 em comprimento de onda de 600 nm. Em seguida, a expressão da proteína foi induzida com 1 mM de IPTG e o cultivo foi realizado por mais 3h a 37 °C, sob agitação constante de 300 rpm. Um mL do crescimento de cada uma das três amostras foi centrifugado a 11.000 g a 4 °C durante 4 min. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram ressuspensas em 100 μ L de tampão de corrida de SDS-PAGE (3.12.2) acrescido de β -mercaptoetanol na proporção de 1:20. A eletroforese ocorreu conforme descrito no item 3.12.2.

Após a padronização do experimento, as 26 amostras *aap*-positivas deste estudo foram avaliadas quanto à expressão da proteína dispersina. As amostras, juntamente com os controles positivo (EAEC 042) e negativo (*E. coli* DH5 α e EPEC E23), foram cultivadas em caldo LB acrescido de glicose 0,5% nas mesmas condições descritas anteriormente. As amostras foram preparadas para análise em SDS-PAGE conforme descrito acima. Em seguida, sem que fossem coradas com Comassie Blue, as proteínas separadas nos géis foram transferidas para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Millipore), segundo Towbin *et al.* (1970), durante 1h a 60 V, utilizando o aparato de transferência (BioRad) e tampão de transferência (tris (hidroximetil)aminometano hidrocloreto 250 mM pH 8,3; glicina 192 mM; metanol 20%, v/v). A membrana foi bloqueada por 2h com solução de bloqueio (item 3.13.1). Após este período, a membrana foi incubada por 2h com o soro anti-dispersina diluído 1:100 em solução de leite em pó Molico®-PBS 1x. A membrana foi lavada 3 vezes com PBS/Tween 20 a 0,05% e mantida sob agitação durante 1h com o soro anti-imunoglobulina de rato produzida em cabra e conjugada à peroxidase (Zymed, EUA) diluído 1:5.000 em solução de leite em pó Molico®-PBS 1x. Após mais três lavagens com PBS/Tween 20 a 0,05%, as membranas foram reveladas com solução reveladora (3,3-diaminobenzidina, 5 μ g; peróxido de hidrogênio, 150 μ L; PBS/Tween 20 – q.s.p. 30 mL).

3.15 Inibição da adesão em células HEp-2

O teste para verificar se o soro anti-Aap era capaz de inibir a adesão das amostras aderentes foi realizado inicialmente com a amostra 042, a fim de titular a melhor diluição do soro a ser usada.

O soro anti-Aap foi diluído em meio DMEM nas proporções de 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100. A amostra 042 foi cultivada em caldo TSB a 37 °C por 18h. Uma alíquota de 40 µL foi adicionada a 1 mL de cada uma das quatro diluições do soro e pré-incubada durante 1h a 37 °C. As suspensões foram colocadas em contato com células HEp-2 e incubadas por 6h, procedendo-se o teste de adesão conforme descrito no item 3.8.2.

Em seguida à determinação da diluição do soro com a amostra 042, as amostras aderentes 84, 268, 901, 936, 994, 1045, 1056, 1102, 1167, 1923 e 2523 foram pré-incubadas com soro diluído 1:10 em meio DMEM e submetidas ao mesmo procedimento descrito acima.

4 RESULTADOS

4.1 Pesquisa dos genes *aap*, *aggR* e *aatA*

Recentemente foi desenvolvido um ensaio de PCR *multiplex* para a detecção simultânea dos genes *aap*, *aggR* e *aatA*. A técnica foi sugerida como ferramenta molecular para diagnóstico de EAEC (CERNA *et al.*, 2003). No intuito de verificar a possível prevalência dos genes *aap*, *aggR* e *aatA* em outros patótipos de *E. coli*, foi realizada uma pesquisa em uma coleção de 149 amostras de EPEC atípicas, 26 EPEC típicas, 7 EHEC, 24 ETEC, 14 EIEC e 23 DAEC de diversos sorotipos.

Nenhuma das amostras de EPEC típica, EHEC, ETEC, EIEC ou DAEC apresentou amplificação para as seqüências genéticas *aap*, *aggR* e *aatA*. Entretanto, das 149 amostras de EPEC atípica pesquisadas, 26 foram positivas para o gene *aap*. Essas 26 amostras pertenciam ao total de 113 amostras de EPEC atípicas recentemente isoladas de um estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarreia aguda em crianças, realizado na cidade de Salvador, Bahia (BUERIS *et al.*, 2007). Os 26 isolados positivos para *aap* foram negativos para os outros dois genes pesquisados (*aggR* e *aatA*).

4.2 Confirmação da presença do gene *aap*

Com o objetivo de confirmar a amplificação do gene *aap* nas 26 amostras de EPEC atípicas, utilizando o par de iniciadores descritos por Czczulin *et al.* (1999), as reações de PCR foram repetidas utilizando outro par de iniciadores desenhados neste estudo. Essas 26 amostras positivas também apresentaram amplificação nas reações de PCR empregando os iniciadores *disp1(F)* e *disp1(R)*. A figura 1 apresenta a eletroforese em gel de agarose dos fragmentos amplificados por esses iniciadores. Conforme se observa, houve a amplificação do fragmento esperado de 347 pb em todas as amostras, incluindo a amostra protótipo de EAEC 042.

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose a 1%, após coloração com brometo de etídio, dos produtos de PCR amplificados referentes ao gene *aap* empregando os iniciadores disp1(F) e disp1(R). Linhas 1 e 21: marcador de peso molecular 1 kb *ladder* (Invitrogen). Linhas 2 e 22: amostra protótipo de EAEC 042 (controle positivo). Linhas 3 e 23: amostra *E. coli* DH5α (controle negativo). Linha 4: amostra 84. Linha 5: amostra 179. Linha 6: amostra 227. Linha 7: amostra 251. Linha 8: amostra 268. Linha 9: amostra 300. Linha 10: amostra 427. Linha 11: amostra 901. Linha 12: amostra 925. Linha 13: amostra 936. Linha 14: amostra 994. Linha 15: amostra 1045. Linha 16: amostra 1056. Linha 17: amostra 1102. Linha 18: amostra 1160. Linha 19: amostra 1167. Linha 20: amostra 1205. Linha 24: amostra 1296. Linha 25: amostra 1368. Linha 26: amostra 1437. Linha 27: amostra 1467. Linha 28: amostra 1646. Linha 29: amostra 1719. Linha 30: amostra 1923. Linha 31: amostra 1958. Linha 32: amostra 2523.

4.3 Seqüenciamento do gene *aap*

Para confirmar a especificidade do produto amplificado nas reações de detecção do gene *aap*, os amplicons de seis amostras positivas, selecionadas aleatoriamente, foram submetidos ao seqüenciamento de nucleotídeos. O seqüenciamento dessas amostras retornou uma seqüência de 300 nucleotídeos (do nucleotídeo 52 ao 351). A partir das seqüências de DNA, foram obtidas as seqüências deduzidas de aminoácidos. A figura 2 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácidos deduzidos dessas amostras, com relação à seqüência de

aminoácidos da proteína Aap da amostra 042 de EAEC, também seqüenciada neste estudo.

O alinhamento de 99 aminoácidos demonstrou uma identidade de aproximadamente 95% entre a seqüência do gene das amostras deste estudo em comparação com a seqüência da amostra 042. A homologia das seqüências de *aap* também é observada entre as amostras seqüenciadas. Isso confirma a especificidade do produto amplificado e a presença do gene *aap* nessas amostras.

		*	20	*	40	*	60		
EAEC042	:	NAFAGGSGWNADNVDP	SQCIKLSGVQYTYNS	GVVPVCMQGLNEGKVR	GSVSVSGVFFYKDG	TTSN	:	63	
84	:			S.....			:	63	
179	:			S.....			:	63	
227	:			S.....			:	63	
268	:			N.S.....		-	:	62	
901	:			S.....			:	63	
1205	:			S.....			:	63	

		*	80	*	100		
EAEC042	:	FKGVVTPSTPVNTNQ	DINKTNKVG	VQKYSALTEWVK-	:	99	
84	:	.E.....	S.....	N.....	R.....-	99	
179	:	.E.....	S.....	N.....	R.....-	99	
227	:	.E..DY.....	S.....	N.....	R.....-	99	
268	:	.E.....	S.....	N.....	R.....--	97	
901	:	.E.....	S.....	N.....	R.....--	98	
1205	:	.E.....	S.....	N.....	R.....-	99	

Figura 2 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidas a partir do seqüenciamento do produto referente ao gene *aap* amplificado com auxílio dos iniciadores disp1(F) e disp1(R) das amostras 84, 179, 227, 268, 901 e 1205, em comparação com a seqüência deduzida da amostra protótipo de EAEC 042.

4.4 Amplificação e seqüenciamento do gene *eae* das amostras *aap*-positivas

As 26 amostras que albergam o gene *aap* foram previamente caracterizadas como pertencentes ao patótipo EPEC atípica (BUERIS *et al.*, 2007). Mesmo assim, a detecção do gene *eae* foi novamente realizada neste trabalho. Os fragmentos amplificados nas amostras de EPEC atípica, empregando os mesmos iniciadores Int_{FC} e Int_{RC} (BATCHELOR *et al.*, 1999) utilizados por Bueris *et al.* (2007) no isolamento das amostras, apresentaram-se com cerca de 60 pb a menos quando comparados ao amplicon do controle positivo (amostra protótipo de EPEC típica E2348/69). A figura 3 demonstra o perfil de amplificação obtido por PCR para esse marcador genético nas amostras *aap*-positivas. Pode-se notar que esse padrão de amplificação foi similar em todas as amostras pesquisadas.

Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, após coloração com brometo de etídio, dos produtos de PCR amplificados referentes ao gene *eae* empregando os iniciadores Int_{FC} e Int_{RC}. Linhas 1 e 21: marcador de peso molecular *1 kb ladder* (Invitrogen). Linhas 2 e 22: amostra protótipo de EPEC típica E2348/69 (controle positivo). Linhas 3 e 23: amostra *E. coli* DH5 α (controle negativo). Linha 4: amostra 84. Linha 5: amostra 179. Linha 6: amostra 227. Linha 7: amostra 251. Linha 8: amostra 268. Linha 9: amostra 300. Linha 10: amostra 427. Linha 11: amostra 901. Linha 12: amostra 925. Linha 13: amostra 936. Linha 14: amostra 994. Linha 15: amostra 1045. Linha 16: amostra 1056. Linha 17: amostra 1102. Linha 18: amostra 1160. Linha 19: amostra 1167. Linha 20: amostra 1205. Linha 24: amostra 1296. Linha 25: amostra 1368. Linha 26: amostra 1437. Linha 27: amostra 1467. Linha 28: amostra 1646. Linha 29: amostra 1719. Linha 30: amostra 1923. Linha 31: amostra 1958. Linha 32: amostra 2523.

Para verificar se o fragmento amplificado pelos iniciadores utilizados era verdadeiro, ou se havia alguma deleção no gene *eae* dessas amostras, foram selecionadas aleatoriamente as amostras 84, 179, 227, 251, 268, 300, 427, 901, 1045, 1296, 1437, 1646, 1719 e 1923 para análises de seqüenciamento de nucleotídeos. A análise das seqüências *forward* e *reverse* dos produtos amplificados dessas amostras demonstrou a inespecificidade dos amplicons obtidos com os iniciadores descritos por Batchelor *et al.* (1999), ou seja, não houve similaridade com nenhuma das seqüências do gene *eae* depositadas no *GenBank*. Ao contrário, houve uma alta similaridade (95%) com seqüências de inserção (IS21) de algumas enterobactérias, dentre elas *Shigella sonnei* Ss046 (Número de acesso: CP000038),

Shigella sonnei BS523 (Número de acesso: EF473661), plasmídeo p1658/97 de *E. coli* (Número de acesso: AF550679), plasmídeo pU302L de *Salmonella* Typhimurium (Número de acesso: AY333434), plasmídeo pAPEC-01-ColBM de *E. coli* aviária O1 (Número de acesso: DQ381420). A figura 4 mostra o alinhamento entre as seqüências de nucleotídeos das 14 amostras *aap*-positivas e a seqüência de inserção IS21 de *Shigella sonnei* obtida no banco de dados (Número de acesso no *GenBank*: CP000038).

```
gi|1453437 : CGCGAAGATAACCTCGCTATTCCAGACATTC-TCTGCCAGGCGCATGTCTG : 49
84-Int-R : T-TATC.TACT..CNATACC.T...CG...G.....T. : 48
179-Int-R : .....-.....-.....T. : 48
251-Int-R : .ATANTNNCGT..N.TACC.....CGN.A.G.....T..... : 50
227-Int-R : .-TANT.CGCCNGANC.AC.C...NGN.CTGCG.....T. : 48
268-Int-R : A-TACT---CC.--TN..CC....CGTC...--.....T. : 40
300-Int-R : .....-.-.....-.....-.....T. : 46
427-Int-R : .....-.-.....-.....T. : 47
901-Int-R : .....-.-.....-T.....-.....T. : 46
1045-Int-R : .-AACT.CGCTT--GA.ACC.-..CGAT.CT--.....T. : 44
1296-Int-R : .....-.-.....CA.....-.....T. : 47
1437-Int-R : --.....-.-.....-.....T. : 45
1646-Int-R : .....-.-.....-.....T. : 46
1719-Int-R : --.....-.-.....-.....T. : 44
1923-Int-R : .....-.-.....-.....T. : 46
```

```

              60          *          80          *          100
gi|1453437 : ATGTAATCCATAAACGGTTTCAGCTTAACCATTTTGTGGCGGGTCTTTCT : 99
84-Int-R : .....G.....N..A..... : 98
179-Int-R : .....A..... : 98
227-Int-R : .....A..... : 98
251-Int-R : ..... : 100
268-Int-R : .....A..... : 90
300-Int-R : .....A..... : 96
427-Int-R : .....A..... : 97
901-Int-R : .....A..... : 96
1045-Int-R : .....A..... : 94
1296-Int-R : .....A..... : 97
1437-Int-R : .....A..... : 95
1646-Int-R : .....A..... : 96
1719-Int-R : .....A..... : 94
1923-Int-R : .....A..... : 96
```

```

              *          120          *          140          *
gi|1453437 : GGCTGGCGGTTTCAGGGTATTTGAGGTAGCGTCTGACCGTCCGTTTCAGAGC : 149
84-Int-R : ..... : 148
179-Int-R : ..... : 148
227-Int-R : ..... : 148
251-Int-R : .....A..... : 150
268-Int-R : ..... : 140
300-Int-R : ..... : 146
427-Int-R : ..... : 147
901-Int-R : ..... : 146
1045-Int-R : ..... : 144
1296-Int-R : ..... : 147
1437-Int-R : ..... : 145
1646-Int-R : ..... : 146
1719-Int-R : ..... : 144
1923-Int-R : .....-..... : 145
```

	160	*	180	*	200	
gi 1453437	:	AACCAATCTGAGTCGCAATATCGACGATGTACGCGCCCTGCTGGCGCATT	:	199		
84-Int-R	:	A.....	:	198		
179-Int-R	:	A.....	:	198		
227-Int-R	:	A.....	:	198		
251-Int-R	:	C.....A.....	:	200		
268-Int-R	:	A.....	:	190		
300-Int-R	:	A.....	:	196		
427-Int-R	:	A.....	:	197		
901-Int-R	:	...T.....A.....	:	196		
1045-Int-R	:	A.....	:	194		
1296-Int-R	:	A.....	:	197		
1437-Int-R	:	A.....	:	195		
1646-Int-R	:	A.....	:	196		
1719-Int-R	:	A.....	:	194		
1923-Int-R	:	A.....	:	195		

	*	220	*	240	*	
gi 1453437	:	TGCTTTATCATGTAAAAAGTCCTCTCTGCTCAGCATGTTGATGT-CCTTTC	:	248		
84-Int-R	:	-.....	:	247		
179-Int-R	:	TGT....CT	:	248		
227-Int-R	:	AGTG.TC-.....G	:	247		
251-Int-R	:	-.....	:	249		
268-Int-R	:	AGTG.TC-.....G	:	239		
300-Int-R	:	A.....	:	246		
427-Int-R	:	A.....	:	247		
901-Int-R	:	-.....	:	245		
1045-Int-R	:	-.....	:	243		
1296-Int-R	:	C.....-.....	:	246		
1437-Int-R	:	AGTG.TC-.....G	:	244		
1646-Int-R	:	-.....	:	245		
1719-Int-R	:	-.....	:	243		
1923-Int-R	:	-.....	:	244		

	260	*	280	*	300	
gi 1453437	:	TGGTGTGAGAACCTTAAGGAAACAACAT-GTTGGGTGGAGCGGACAATCC	:	297		
84-Int-R	:	G.....-.....	:	296		
179-Int-R	:	G.....CAT..A..AG.....A.A	:	298		
227-Int-R	:	G.....-.....	:	296		
251-Int-R	:	-.....	:	298		
268-Int-R	:	G.....-.....	:	288		
300-Int-R	:	G.....A..A.....	:	296		
427-Int-R	:	G.....-.....	:	296		
901-Int-R	:	G.....-.....	:	294		
1045-Int-R	:	G.....-.....	:	292		
1296-Int-R	:	G.....-.....	:	295		
1437-Int-R	:	G.....-.....	:	293		
1646-Int-R	:	G.....-.....	:	294		
1719-Int-R	:	G.....-.....	:	292		
1923-Int-R	:	G.....-.....	:	293		

	*	320		
gi 1453437	:	AAATGG-CGAATTA-CCGT-CTTATAT	:	321
84-Int-R	:	-.....-.....	:	320
179-Int-R	:	...A.G...A..A.A.AA...A	:	325
227-Int-R	:	-.....-.....	:	320
251-Int-R	:	-T.....-.....	:	322
268-Int-R	:	-.....-.....	:	312
300-Int-R	:	-.....A.C.A..-..A....	:	321
427-Int-R	:	A.....C.-.-.....	:	321
901-Int-R	:	-.....A.A...ACTA....	:	320
1045-Int-R	:	-.....-.....-.....	:	316
1296-Int-R	:	-.....-.....-.....	:	319
1437-Int-R	:	-.....-.....-.....	:	317
1646-Int-R	:	-.....-.....-.....	:	318
1719-Int-R	:	-.....-.....-.....	:	316

Figura 4 - Alinhamento entre a sequência de nucleotídeos da IS21 de *Shigella sonnei* disponível no GenBank e as seqüências dos produtos amplificados referente ao gene *eae* utilizando os iniciadores Int_{FC} e Int_{RC} de 14 amostras *aap*-positivas deste estudo.

Com o intuito de confirmar essa inespecificidade da reação de PCR para detecção do gene *eae*, descrita por Batchelor *et al.* (1999), a amplificação desses fragmentos foi realizada empregando dois outros pares de iniciadores que também amplificam fragmentos correspondentes à região aminoterminal do *eae*. O primeiro par de iniciadores, descritos por Aranda *et al.* (2004), amplificou o fragmento esperado de 917 pb na amostra protótipo de EPEC E2348/69, mas nenhuma amplificação foi obtida em todas as amostras *aap*-positivas. Resultados similares foram obtidos com o par de iniciadores gentilmente cedidos pelo Dr. Miguel Blanco (Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha), onde foi possível amplificar o produto esperado de 510 pb na amostra E2348/69, mas sem amplificação nas amostras *aap*-positivas.

4.5 Pesquisa de genes de virulência associados a outros patótipos de *E. coli* diarreiogênicas

Diante dos resultados obtidos no seqüenciamento do fragmento amplificado por Int_{FC} e Int_{RC}, foram pesquisados genes que caracterizam os patótipos de STEC (gene *stx*), ETEC (gene *lta* e *sta*) e EIEC (gene *ipaH*) nas amostras positivas para *aap*. Tais genes codificam, respectivamente, a toxina Stx de STEC, as toxinas LT e ST de ETEC e uma das proteínas responsáveis pelos eventos de invasão de EIEC. Nenhuma das 26 amostras apresentou amplificação para qualquer um dos genes pesquisados.

4.6 Padrões de adesão e sorotipos

Os padrões de adesão das amostras *aap*-positivas foram avaliados em células HEP-2 em ensaios de 6 h de interação bactéria-células epiteliais. A maioria das amostras (15) não foi capaz de aderir a células HEP-2 (Figura 5). Além de amostras não aderentes (NA), os padrões difuso (AD) e agregativo (AA) também foram encontrados em um menor número de amostras (cinco e três, respectivamente) e três amostras apresentaram um padrão de adesão com bactérias aderidas de forma não característica (NC). Os padrões de adesão AA, AD e NC, além de um ensaio com uma amostra não aderente, estão representados na figura 6.

Figura 5 - Distribuição percentual das amostras *aap*-positivas deste estudo quanto ao padrão de adesão a células HEP-2 em ensaios de 6h de interação bactérias-células epiteliais.

Figura 6 - Padrões de interação com células HEp-2 representativos dos padrões encontrados nas amostras deste estudo após 6h de interação bactérias-células epiteliais. As células foram coradas com solução de May-Grünwald/Giemsa. A, padrão agregativo (amostra 268); B, padrão difuso (amostra 84); C, padrão não característico (amostra 901); D, padrão não aderente (amostra 427). Aumento: 1.000 vezes.

A determinação sorológica dos antígenos somático (O) e flagelar (H) das amostras positivas para o gene *aap* mostrou que as mesmas pertencem a sorotipos diversos. Não houve predomínio de nenhum antígeno O ou mesmo de antígeno H. Seis amostras não puderam ter seus antígenos O tipados pelos soros disponíveis e duas amostras apresentaram-se não-móveis. O resultado da sorotipagem das 26 amostras e dos padrões de adesão a células HEp-2 observados estão listados na tabela 5. Também não houve associação entre sorogrupo e/ou sorotipo com qualquer um dos padrões de adesão determinados.

Tabela 5 - Sorotipos e padrões de adesão em células HEp-2 determinados nas amostras positivas para o gene *aap*

Nº da amostra	Sorotipo (O:H)	Padrão de adesão em ensaios de 6h em células HEp-2
84	O86:H11	DA
179	O23:H16	NA
227	O155:H10	NA
251	O11:H10	NA
268	O49:H6	AA
300	O1:H10	NA
427	O73:H19	NA
901	ONT:H15	NC
925	O163:H19	NA
936	O1:H45	NC
994	ONT:H18	NC
1045	O153:H7	AA
1056	O36:HNM	DA
1102	O142:HNM	AA
1160	O23:H15	NA
1167	O86:H11	DA
1205	O9:H11	NA
1296	ONT:H6	NA
1368	ONT:H18	NA
1437	O34:H45	NA
1467	ONT:H21	NA
1646	O23:H38	NA
1719	O1:H45	NA
1923	O21:H38	DA
1958	O120:H48	NA
2523	ONT:H11	DA

ONT, antígeno O não tipável.

HNM, amostra imóvel.

NA, amostra não aderente.

DA, padrão de adesão difuso.

AA, padrão de adesão agregativo.

NC, padrão de adesão não característico.

4.7 Análise da presença de outros genes de EAEC

Uma vez que a dispersina é uma proteína descrita no patótipo EAEC, a pesquisa de outros fatores de virulência de EAEC foi realizada nas amostras *aap*-positivas deste estudo. Nenhuma delas apresentou amplificação para os seguintes genes: *pet*, *pic*, *aggA*, *aggC*, *aafA*, *aafC*, *agg3A* e *ap58*. Esses genes codificam os seguintes fatores de virulência associados a EAEC: enterotoxina *Pet*, proteína mucinolítica *Pic*, pilina e *usher* da fímbria AAF/I, pilina e *usher* da fímbria AAF/II,

pilina da fímbria AAF/III e a adesina não fimbrial Ap58, respectivamente (BERNIER *et al.*, 2003; CZECHULIN *et al.*, 1999; ELIAS *et al.*, 1999; ESLAVA *et al.*, 1998; MONTEIRO-NETO *et al.*, 2003).

Em contrapartida, houve amplificação dos genes *astA* em 18 (69,2%) amostras, de *shf* em 9 (30,7%) amostras, de *agg3C* em 5 (19,2%) amostras e de *irp2* em 2 (7,7%) amostras. Tais genes codificam a toxina termoestável EAST-1, a proteína Shf, envolvida na formação de biofilme, o *usher* da fímbria AAF/III e uma proteína envolvida na biossíntese de yersiniabactina, respectivamente (BERNIER *et al.*, 2003; CZECHULIN *et al.*, 1999; FUJIYAMA *et al.*, 2008; SAVARINO *et al.*, 1993). Além dos genes citados anteriormente, as amostras também foram avaliadas para a presença da subunidade principal (*pilS*) do pili tipo IV de EAEC atípica (DUDLEY *et al.*, 2006a), o qual foi detectado em 7 (27%) amostras.

A tabela 6 apresenta as diversas combinações de marcadores de virulência de EAEC determinados em cada uma das amostras em associação com os padrões de adesão em células HEP-2. As seqüências *astA* e *pilS* ocorreram em amostras AA, AD, NC e NA, *shf* ocorreu em amostras DA e NA, *irp2* ocorreu em amostras DA e NC e *agg3C* ocorreu em amostras DA e NC. Cinco amostras (4 NA e 1 DA) foram desprovidas de todos os marcadores pesquisados. Não houve associação entre as combinações de marcadores com algum dos padrões de adesão em células HEP-2.

Tabela 6 – Combinações dos marcadores de virulência de EAEC detectado em 21 amostras *aap*-positivas em associação com o padrão de adesão em células HEP-2

Padrão de adesão em células HEP-2	Marcadores de virulência de EAEC (Nº de amostras)
AA	<i>astA</i> (2) <i>astA</i> e <i>pilS</i> (1)
DA	<i>shf</i> e <i>agg3C</i> (1) <i>astA</i> , <i>shf</i> e <i>agg3C</i> (1) <i>astA</i> , <i>shf</i> , <i>agg3C</i> e <i>pilS</i> (1) <i>astA</i> , <i>irp2</i> , <i>shf</i> e <i>agg3C</i> (1)
NC	<i>astA</i> (1) <i>astA</i> e <i>pilS</i> (1) <i>astA</i> , <i>irp2</i> , <i>agg3C</i> e <i>pilS</i> (1)
NA	<i>astA</i> (5) <i>pilS</i> (1) <i>astA</i> e <i>shf</i> (3) <i>shf</i> e <i>pilS</i> (1) <i>astA</i> , <i>shf</i> e <i>pilS</i> (1)

4.8 Obtenção do clone de expressão da proteína recombinante His₆-Aap

Para a obtenção da proteína dispersina recombinante, com o objetivo de produzir um soro policlonal anti-dispersina, foi utilizada a estratégia de clonagem do gene *aap* no vetor pGEM-T Easy seguida da subclonagem no vetor pET-28a.

Na clonagem em pGEM-T Easy foram selecionadas dez colônias brancas e resistentes à ampicilina em meio de cultura contendo X-Gal e ampicilina para confirmação da clonagem de *aap*. Esses transformantes apresentaram *amplicons* referentes ao gene *aap* quando testadas por PCR utilizando os iniciadores disp4. Um desses transformantes foi selecionado para a continuação dos experimentos e confirmação da correta clonagem. Para isso, o plasmídeo desse transformante foi extraído e digerido com a enzima *EcoR*I. A figura 7 mostra a confirmação da inserção de *aap* no vetor pGEM-T Easy através da liberação do inserto *aap* de 343 pb do vetor. Esse plasmídeo foi denominado pBTM1 e a amostra que o alberga foi denominada JM109(pBTM1).

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, após coloração com brometo de etídio, caracterizando o inserto *aap* amplificado pelos iniciadores disp4(F) e disp4(R) clonado no vetor pGEM-T Easy. Linha 1: marcador de peso molecular *1 kb ladder* (Invitrogen). Linha 2: amplicon *aap* da amostra protótipo de EAEC 042 utilizado para a clonagem. Linha 3: fragmento na amostra JM109(pBTM1). Linha 4: extração do plasmídeo pBTM1. Linha 5: plasmídeo pBTM1 digerido com a enzima *EcoR*I.

Em seguida, o inserto clonado em pBTM1 foi subclonado no vetor pET-28a. O vetor pGEM-T Easy apresenta dois sítios de restrição para a enzima *EcoR1*, o que permitem a sub-clonagem do inserto em outros vetores contendo os mesmos sítios. Na clonagem em pET-28a não há diferenciação por cor da colônia, como no caso dos transformantes com o vetor pGEM-T. Desta forma, 50 transformantes apresentando resistência à canamicina foram selecionadas. Todos foram avaliados por PCR utilizando-se o par de iniciadores disp4 (F e R). Em 11 desses transformantes houve amplificação de *aap*. Dois desses transformantes (14 e 16) foram selecionados para a extração dos seus plasmídeos para a digestão com a enzima *AccI*. A digestão do plasmídio do transformante 16 originou os três fragmentos esperados (225, 2.232 e 3.255 pb), indicando a clonagem do inserto no sentido 5'-3', e foi então denominado pBMT2. A amostra que alberga esse plasmídeo foi denominada BL21(DE3)-pBTM2. Na figura 8 os perfis de restrição com a enzima *AccI* dos plasmídeos dos transformantes 14 e 16 são mostrados.

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose a 0,8%, após coloração com brometo de etídio, dos fragmentos gerados pela digestão dos plasmídios dos transformantes 14 e 16 com a enzima *AccI*. Linha 1: marcador de peso molecular *1 kb ladder* (Invitrogen). Linha 2: digestão do plasmídeo do transformante 14. Linha 3: digestão do plasmídeo do transformante 16.

4.9 Expressão e purificação da proteína recombinante His₆-Aap

Os extratos de proteínas das frações “não-induzida”, “induzida”, “secretada”, “solúvel” e “insolúvel” foram analisados através de SDS-PAGE. A figura 9 mostra essas análises, onde se observa que após a indução, a proteína recombinante His₆-Aap foi localizada na “fração solúvel”.

Figura 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida, na concentração de 20%, com dodecil sulfato de sódio das frações protéicas obtidas antes e após a indução do cultivo da amostra BL21(DE3)-pBTM2 com isopropil- β -D-tiogalactosidase, seguida da coloração com Comassie Brilliant Blue. Linha 1: marcador de massa molecular *Protein Mixture* (GE Healthcare). Linha 2: componentes protéicos da fração não induzida. Linha 3: componentes protéicos da fração induzida. Linha 4: componentes protéicos da fração secretada. Linha 5: componentes protéicos da fração correspondente insolúvel (após a primeira lavagem com o tampão de lavagem). Linha 6: componentes protéicos da fração insolúvel (após a segunda lavagem com o tampão de lavagem). Linha 7: componentes protéicos da fração solúvel.

A proteína Dispersina foi descrita na literatura como apresentando massa molecular de 10,2 kDa (SHEIKH *et al.*, 2002). Curiosamente, após a eluição e diálise da “fração solúvel” a análise em SDS-PAGE revelou um peptídeo com aproximadamente o dobro da massa molecular esperada para a proteína recombinante, ou seja, aproximadamente 20 kDa. A figura 10 mostra tal análise em SDS-PAGE.

A indução de expressão e a purificação da proteína Dispersina foram repetidas, utilizando-se concentrações crescentes de imidazol nos tampões da

lavagem (5 mM, 50 mM e 100 mM) e eluindo-se com tampão de imidazol a 1 M e os resultados foram semelhantes aos obtidos na primeira purificação.

Figura 10 - Eletroforese em gel de poli-acrilamida, na concentração de 20%, com dodecil sulfato de sódio da proteína isolada na fração solúvel da amostra BL21(DE3)-pBTM2 após indução com isopropil- β -D-tiogalactosidase, purificação em colunas de níquel, diálise e concentração, seguida de coloração com Coomassie Brilliant Blue. Linha 1: marcador de massa molecular *Protein Mixture* (GE Healthcare). Linha 2: proteína Dispersina purificada.

4.10 *Immunoblotting* para detecção de Dispersina nas amostras que albergam o gene *aap*

Após a sangria total dos animais imunizados com a proteína His₆-Aap, os soros obtidos foram titulados por ELISA e agrupados em um *pool* de aproximadamente 18 mL. Após a inativação das proteínas do sistema complemento, o soro anti-Aap foi empregado em experimentos de imunodeteção da expressão de Dispersina.

Com o intuito de verificar a especificidade do soro anti-Dispersina, o soro pré-imune dos animais imunizados foi utilizado na imunodeteção de extratos protéicos totais da amostra protótipo de EAEC 042 e da *E. coli* DH5 α . Não houve reatividade do *pool* de soros pré-imune com nenhuma das proteínas presentes nos extratos avaliados (Figura 11).

Figura 11 – Reatividade dos soros pré-imune dos ratos imunizados com a proteína His₆-Aap contra os extratos protéicos das amostras 042 e DH5α. Os extratos foram obtidos após cultivo das amostras em caldo LB contendo 0,5% de glicose, separados em eletroforese em gel de poliacrilamida, na concentração de 20%, com dodecil sulfato de sódio e transferidos para membrana de PVDF. A imunodeteção foi realizada com o soro pré-imune (1:100) e o anticorpo secundário anti-imunoglobulina de rato produzida em cabra conjugada à peroxidase (1:5.000), seguida da revelação com 3,3-diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio. Linha 1: marcador de massa molecular *Full Range RainbowTM Recombinant Protein Molecular Weight Marker* (GE Healthcare). Linha 2: reatividade do extrato protéico da amostra protótipo de EAEC 042 (controle positivo). Linha 3: reatividade do extrato protéico da amostra de *E. coli* DH5α (controle negativo).

Após a constatação de que o soro dos ratos antes da imunização não identificava proteínas inespecíficas nos extratos bacterianos, foi realizada uma padronização do experimento de *immunoblotting* utilizando amostras controle. A figura 12 mostra a reatividade do soro com um peptídeo de massa molecular de aproximadamente 10 kDa nas amostras que expressam a dispersina (protótipo de EAEC 042 e clone que expressa a proteína His₆-Aap BL21(DE3)-pBTM2) e a ausência da expressão na amostra de *E. coli* K12 (DH5α).

Figura 12 - Padronização do ensaio de imunodeteção da proteína dispersina com o soro anti-Dispersina. Reatividade dos extratos protéicos obtidos após cultivo das amostras em caldo LB contendo 0,5% de glicose, separados em eletroforese em gel de poliacrilamida, na concentração de 20%, com dodecil sulfato de sódio e transferidos para membrana de PVDF. A imunodeteção foi realizada com o soro anti-dispersina (1:100) e o anticorpo secundário anti-imunoglobulina de rato produzida em cabra conjugada à peroxidase (1:5.000), seguida da revelação com 3,3-diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio. Linha 1: marcador de massa molecular *Full Range Rainbow™ Recombinant Protein Molecular Weight Marker* (GE Healthcare). Linha 2: reatividade do extrato protéico da amostra protótipo de EAEC 042 (controle positivo). Linha 3: reatividade do extrato protéico da amostra de *E. coli* DH5α (controle negativo). Linha 4: reatividade do extrato protéico da amostra BL21(DE3)-pBTM2 (clone que expressa a proteína recombinante His₆-Aap).

Após essa padronização, a expressão da dispersina foi verificada nas 26 amostras deste estudo. A expressão da proteína dispersina foi detectada apenas em sete amostras. Na figura 13 observa-se a reatividade do soro anti-Dispersina com um peptídeo de massa molecular de aproximadamente 10 kDa nas amostras que expressaram a dispersina (84, 179, 227, 268, 901, 1205 e 1958) e na amostra EAEC 042.

Figura 13 - Imunodeteção da proteína dispersina com soro anti-Dispersina. Reatividade dos extratos protéicos obtidos após cultivo das amostras em caldo LB contendo 0,5% de glicose, separados em eletroforese em gel de poliacrilamida, na concentração de 20%, com dodecil sulfato de sódio e transferidos para uma membrana de PVDF. A imunodeteção foi realizada com o soro anti-dispersina (1:100) e o anticorpo secundário anti-imunoglobulina de rato produzida em cabra conjugada à peroxidase (1:5.000), seguida da revelação com 3,3-diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio. Linhas 1 e 12: marcador de massa molecular *Full Range Rainbow™ Recombinant Protein Molecular Weight Marker* (GE Healthcare, EUA). Linhas 2 e 10: reatividade do extrato protéico da amostra protótipo de EAEC 042 (controle positivo). Linha 3: reatividade do extrato protéico da amostra 84. Linha 4: reatividade do extrato protéico da amostra 179. Linha 5: reatividade do extrato protéico da amostra 227. Linha 6: reatividade do extrato protéico da amostra 268. Linha 7: reatividade do extrato protéico da amostra 901. Linha 8: reatividade do extrato protéico da amostra 1205. Linha 9: reatividade do extrato protéico da amostra 1958. Linha 11: reatividade do extrato protéico da amostra de *E. coli* DH5α (controle negativo).

4.11 Inibição da adesão

Inicialmente foi realizada uma titulação do soro anti-Dispersina com o intuito de determinar a melhor diluição a ser usada nos ensaios de inibição da adesão com todas as amostras aderentes (AA, AD e NC). Foram realizados ensaios de adesão em células HEP-2 com a amostra protótipo 042 pré-incubada com diferentes diluições do anti-soro obtido neste estudo. Na diluição 1:10 houve inibição de 100% da adesão da amostra 042 (Figura 13). Nas demais diluições avaliadas a inibição também ocorreu, mas não totalmente.

A fim de facilitar a comparação entre a amostra 042 e as demais amostras aderentes, a diluição do soro 1:10 foi selecionada para a continuação dos

experimentos. Ensaio de adesão dessas mesmas amostras foram realizados simultaneamente servindo como controle dos fenótipos de adesão.

Não houve inibição nem alteração do padrão de adesão de nenhuma das 11 amostras aderentes, inclusive das três amostras que apresentaram o padrão AA. A figura 13 apresenta a adesão da amostra protótipo 042 e de um representante de cada um dos padrões de adesão encontrados (AA, AD e NC) em comparação aos ensaios de inibição da adesão (pré-incubação do inóculo bacteriano com o soro anti-Dispersina antes da interação com as células HEp-2). Embora não mostrados, os resultados das inibições das outras 8 amostras aderentes foram similares aos resultados das amostras 268 (AA), 84 (AD) e 901 (NC) apresentados na figura 14, sendo então esses resultados representativos.

Figura 14 – Ensaio de adesão e de inibição da adesão com o soro anti-Dispersina (1:10) em células HEp-2 após 6h de interação bactérias-células epiteliais. As células foram coradas com solução de May-Grünwald/Giemsa. A, padrão de adesão da amostra protótipo de EAEC 042; B, inibição da adesão da amostra 042; C, padrão de adesão da amostra 268 (representativa do padrão AA); D, inibição da adesão da amostra 268; E, padrão de adesão da amostra 84 (representativa do padrão AD); F, inibição da adesão da amostra 84; G, padrão de adesão da amostra 901 (representativa do padrão NC); H, inibição da adesão da amostra 901.

5 DISCUSSÃO

Devido a sua importância epidemiológica como agente de diarreia aguda e persistente, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, EAEC é atualmente considerada um enteropatógeno emergente (HARRINGTON *et al.*, 2006; KAPER *et al.*, 2004; NATARO; KAPER, 1998). Levando-se esse dado em consideração, aliado ao fato de que diarreia aguda e persistente ainda são causa de mortalidade infantil, a identificação desse agente etiológico de diarreia pode ajudar na conduta terapêutica, bem como na intervenção em ações de prevenção (CLARKE, 2001; PETRI *et al.*, 2008).

O diagnóstico de EAEC considerado *gold-standard* baseia-se no achado do padrão AA em ensaios de adesão em células epiteliais cultivadas, geralmente HEp-2 ou HeLa (NATARO; KAPER, 1998). Entretanto, esse ensaio demanda uma infraestrutura laboratorial específica, além de ser demorado e oneroso, limitando a sua aplicação a laboratórios de referência. Neste sentido, diagnósticos moleculares têm sido desenvolvidos na tentativa de substituir o ensaio de adesão em células epiteliais. Dentre eles, vários testes de PCR que se fundamentam na detecção de fatores de virulência associados a EAEC foram elaborados e vêm sendo empregados no diagnóstico desse patótipo (CERNA *et al.*, 2003; CORDEIRO *et al.*, 2008; JENKINS *et al.*, 2006b; RÜTTLER *et al.*, 2006; SCHIMIDT *et al.*, 1995). Alguns desses testes baseiam-se na detecção simultânea de dois ou três marcadores de virulência de EAEC (CERNA *et al.*, 2003; JENKINS *et al.*, 2006b; RÜTTLER *et al.*, 2006), ou seja, na técnica de PCR *multiplex*.

Desta forma, o objetivo inicial deste estudo foi avaliar a especificidade do ensaio de PCR *multiplex* descrito por Cerna *et al.* (2003), verificando a presença dos genes *aatA*, *aap* e *aggR* em amostras de *E. coli* pertencentes aos diversos patótipos de ECD isoladas em nosso meio. Esta pesquisa fundamentou-se no fato de que esses autores avaliaram um pequeno número de amostras não caracterizadas como EAEC para a padronização desse ensaio.

Nenhuma das amostras de EPEC típica, EHEC, ETEC, EIEC ou DAEC avaliadas neste estudo apresentou amplificação para as seqüências genéticas *aap*, *aggR* e *aatA*. Entretanto, o gene *aap* foi detectado em 26 amostras inicialmente classificadas como EPEC atípica.

No relato de Cerna *et al.* (2003), nenhuma das 12 cepas de ECD (3 EPEC, 3 ETEC, 3 STEC e 3 EIEC) apresentou amplificação dos genes pesquisados. Contudo, esse número de amostras é bastante inferior ao avaliado no presente estudo.

Jenkins *et al.* (2006a) determinaram através da genotipagem que dentre os 9 genes plasmidiais de EAEC avaliados, *aatA*, *aap* e *aggR* foram apropriados para a detecção de EAEC típica. Embora nem todos os patótipos de ECD tenham sido incluídos, um número maior de amostras de EPEC e DAEC (29 amostras de cada) foi avaliado. Os três marcadores também não foram detectados nessas amostras.

O mesmo PCR *multiplex* descrito por Cerna *et al.* (2003) apresentou alta especificidade e sensibilidade na detecção de EAEC caracterizadas pelo padrão AA em células HEp-2, embora essas amostras não tenham sido avaliadas quanto à presença de marcadores de virulência dos outros patótipos de ECD (CORDEIRO *et al.*, 2008).

Com exceção do gene *aap*, os dados obtidos neste trabalho estão de acordo com os relatados por esses autores, ou seja, *aggR* e *aatA* parecem ser exclusivos e bem característicos de EAEC e representam bons marcadores de virulência para ensaios diagnósticos.

Os genes escolhidos por Cerna *et al.* (2003) para o diagnóstico no *multiplex* são adequados para a detecção de EAEC típica, uma vez que os três marcadores detectados estão localizados no plasmídeo pAA (CZECZULIN *et al.*, 1999). No entanto, amostras de EAEC que não apresentam o gene que codifica o regulador global de virulência AggR foram descritas em vários estudos (COBELJIC *et al.*, 1996; ELIAS *et al.*, 2002; GIOPPO *et al.*, 2000; ZAMBONI *et al.*, 2004). Estas amostras foram recentemente denominadas EAEC atípicas e representam um subgrupo de EAEC pouco caracterizado em termos de virulência (HARRINGTON *et al.*, 2006).

Jenkins *et al.* (2006b) desenvolveram um PCR *multiplex* para a detecção de EAEC baseada na pesquisa dos genes *aatA*, *aaiA* e *astA*. *aaiA* faz parte de um *operon* regulado por AggR localizado em uma ilha de patogenicidade inserida no cromossomo da amostra protótipo de EAEC 042 (DUDLEY *et al.*, 2006b). Desta forma, a sua detecção isolada indicaria que a amostra de EAEC não alberga o plasmídeo pAA, pertencendo ao subgrupo de EAEC atípicas. O PCR *multiplex* com a combinação desses três genes detectaria, então, EAEC típicas e atípicas. Por outro

lado detecção isolada do gene *astA*, já demonstrado presente em outros patótipos de ECD, em outras enterobactérias e mesmo em *E. coli* da microbiota, pode aumentar a detecção de amostras não EAEC.

O gene que codifica a proteína dispersina é bastante prevalente em amostras de EAEC. *aap*, geralmente está associado a outros marcadores de virulência, principalmente *aggR* e *aatA* (CZECZULIN *et al.*, 1999; SARANTUYA *et al.*, 2004; SUZART *et al.*, 2001; ZAMBONI *et al.*, 2004). Entretanto, já houve descrição de amostras que apresentavam o gene *aap* isoladamente ou em associação com genes menos específicos de EAEC. No estudo realizado por Cerna *et al.* (2003), uma das amostras testadas no desenvolvimento do PCR *multiplex* apresentou amplificação apenas para *aap*. Czeczulin *et al.* (1999), Jenkins *et al.* (2006a) e Huang *et al.* (2007) também detectaram amostras nas quais o gene *aap* não estava associado à presença *aggR* ou *aatA*.

As 26 amostras positivas para o gene *aap* identificadas no presente estudo foram isoladas de um estudo epidemiológico realizado na cidade de Salvador, Bahia (BUERIS *et al.*, 2007) e haviam sido descritas como pertencentes ao patótipo EPEC atípica, por possuírem o gene *eae*, mas não o plasmídeo EAF.

Após o achado do gene *aap* nessas amostras, a segunda etapa deste trabalho foi a caracterização dessas amostras de EPEC atípica, iniciada pela análise da presença do gene *eae* que codifica a adesina intimina. Os iniciadores utilizados para a pesquisa do gene *eae* no trabalho de Bueris *et al.* (2007) foram descritos por Batchelor *et al.* (1999) e amplificam a porção Int₃₈₈₋₆₆₇, descrita como a região conservada da molécula da intimina.

A observação de que os fragmentos amplificados com estes mesmos iniciadores apresentavam-se com cerca de 60 pb a menos quando comparados ao *amplicon* do controle positivo (amostra protótipo de EPEC típica), motivou a investigação mais detalhada dessa reação. A hipótese inicialmente levantada foi a de que poderia haver uma deleção em parte do gene *eae*, fenômeno que explicaria o *amplicon* menor e a ausência de expressão da proteína intimina nestas amostras (Dra. Roxane M. F. Piazza, Instituto Butantan – dados não publicados). Por esse motivo o fragmento amplificado de 14 das 26 amostras foi submetido ao seqüenciamento de DNA.

O resultado dessas análises demonstrou a total inespecificidade dos fragmentos amplificados, correspondentes à seqüência de inserção IS21 de algumas

enterobactérias, dentre elas *Shigella sonnei* (Número de acesso no GenBank: EF473661). Os iniciadores desenhados por Batchelor *et al.* (1999) foram descritos como “universais” para detecção de todos os subtipos de intimina e têm sido amplamente empregados na literatura para a detecção do gene *eae*. A análise da sequência desses iniciadores revelou a presença de seqüências para a enzima de restrição *EcoRI*, incluindo 9 e 6 nucleotídeos extras nas seqüências *forward* e *reverse*, respectivamente. Essas seqüências foram incluídas pelos autores para a clonagem do fragmento amplificado em um vetor de expressão para obtenção da proteína intimina recombinante. A presença desses nucleotídeos permite que os iniciadores anelem em regiões do DNA na ausência do gene *eae*. De fato, nestas amostras, a amplificação do fragmento referente à IS21 ocorre exatamente pela hibridização dos iniciadores ao genoma bacteriano através da seqüência para a enzima de restrição. Esses achados demonstram que os iniciadores descritos por Batchelor *et al.* (1999) são inespecíficos, uma vez que podem anelar em seqüências que não o gene *eae*.

Tomando por base que os iniciadores de todas as 26 amostras apresentaram-se menores em relação ao da amostra E2348/69, pôde-se deduzir que as outras 12 amostras não seqüenciadas também apresentaram *amplicons* inespecíficos. Além disso, todas as 26 amostras foram avaliadas em reações de PCR para detecção do gene *eae* utilizando outros iniciadores descritos na literatura. Os iniciadores empregados foram descritos por Aranda *et al.* (2004) e pelo Dr. Miguel Blanco (comunicação pessoal) e amplificam fragmentos de 917 e 510 pb, respectivamente. As regiões que ambos os iniciadores amplificam correspondem à porção conservada da intimina, mesma região que os iniciadores de Batchelor *et al.* (1999) amplificam. Entretanto, esses outros iniciadores não apresentam seqüências para enzimas de restrição. As reações com os novos pares de iniciadores confirmaram a ausência do gene *eae* em todas as 26 amostras *aap*-positivas deste estudo.

Além da ausência do gene *eae*, as amostras *aap*-positivas não apresentaram amplificação para nenhum dos marcadores genéticos dos patótipos ETEC, EHEC e EIEC. Esses dados nos levaram a reclassificação das amostras deste estudo como não portadoras de marcadores de virulência que caracterizam os patótipos de *E. coli* diarreiogênica não sendo, portanto, EPEC atípica.

Todas as amostras classificadas como EPEC atípica, isoladas no estudo epidemiológico de Salvador (BUERIS *et al.*, 2007) foram reavaliadas quanto à

amplificação do gene *eae*. Pode-se dizer que em algumas amostras os fragmentos amplificados são semelhantes ao *amplicon* da EPEC típica E2348/69, sendo, portanto, específicos. Estes fragmentos apresentaram homologia com o gene *eae* em análises de seqüenciamento (Dra. Silvia Y. Bando, Instituto Butantan – dados não publicados).

Batchelor *et al.* (1999) pesquisaram o gene *eae* através desses iniciadores em 75 amostras isoladas de humanos (todas pertencentes aos sorogrupos clássicos de EPEC) e em 42 amostras isoladas de animais. Embora os autores relatem que amostras pertencentes a outros patótipos que não EPEC ou pertencentes a outras espécies bacterianas foram negativas para a pesquisa do gene *eae*, não é revelada a quantidade testada dessas amostras. O sucesso do emprego de uma técnica molecular como o PCR na detecção de um gene de virulência não depende só da quantidade de amostras verdadeiramente positivas que amplificam o fragmento esperado. É preciso garantir também, que amostras negativas não reajam inespecificamente com os iniciadores utilizados. Essa garantia só é conseguida mediante o teste em uma grande quantidade de isolados, tanto positivos quanto negativos para o gene em questão. A quantidade de amostras utilizadas no estudo conduzido por Batchelor *et al.* (1999) não parece ser suficiente para classificar tais iniciadores como “universais”. Os estudos conduzidos em nosso laboratório indicam que quando as amostras apresentam o gene *eae*, os iniciadores anelam no local correto, mas na sua ausência o anelamento pode ocorrer em uma seqüência de inserção (IS), gerando um fragmento falso positivo.

A ausência do gene *eae* e de marcadores genéticos de outros patótipos de ECD nas amostras *aap*-positivas dificulta sua classificação nos patótipos descritos até o momento. Entretanto, alguns patótipos de ECD são classificados de acordo com o padrão de adesão apresentado em células epiteliais cultivadas.

Pela definição, o patótipo EAEC é constituído por amostras de *E. coli* que não secretam as toxinas LT e ST de ETEC e que aderem no padrão AA em células HEp-2 (NATARO *et al.*, 1987). A definição de DAEC também leva em conta o tipo de interação das bactérias com as células epiteliais. Neste caso, o padrão característico refere-se à adesão bacteriana sobre toda a superfície das células de forma difusa (NATARO *et al.*, 1987). Tomando-se por base essas definições, três das 26 amostras *aap*-positivas podem ser classificadas como pertencentes ao patótipo EAEC, já que apresentam o padrão de adesão AA, característico deste patótipo.

As cinco amostras que apresentaram padrão de adesão difuso podem ser classificadas como DAEC, levando-se em conta este fenótipo observado *in vitro*. Entretanto, genes que codificam adesinas ou outras proteínas envolvidas na virulência de DAEC não foram pesquisados neste estudo. Observar apenas o fenótipo de adesão difusa pode levar à classificação equivocada dessas amostras. Scaletsky *et al.* (1984) relataram a presença de *E. coli* uropatogênica (UPEC) e ETEC que aderiam de forma difusa em células epiteliais. Também já houve descrição de amostras de EPEC atípica apresentando o padrão AD de adesão (DULGUER *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2004; IDE *et al.*, 2003). A ausência de marcadores de outros patótipos de ECD foi confirmada, mas somente uma pesquisa mais apurada com relação aos genes de virulência de DAEC poderá esclarecer se essas amostras pertencem realmente a esta categoria. As amostras com padrão não característico de adesão em células HEP-2 e aquelas que se mostraram não aderentes (três e 15, respectivamente) representam amostras de *E. coli* não pertencentes aos patótipos descritos até o momento.

Não há relatos na literatura de amostras com padrão de adesão difuso que albergassem o gene *aap*, sendo as amostras aqui descritas, as primeiras a apresentarem tal característica. Cordeiro *et al.* (2008) descreveram o achado de amostras de *E. coli* *aap*-positivas não aderentes e apresentando padrão de adesão não característico. Duas cepas não aderentes, positivas apenas para o gene *aap* também foram descritas por Jiang *et al.* (2002). Entretanto, esses últimos autores não discutem este dado, classificando tais amostras como EAEC apesar da ausência da adesão agregativa que define o patótipo.

Independente da classificação adotada para essas bactérias, o gene *aap* encontrado mostrou-se bastante conservado neste estudo. As 26 amostras apresentaram amplificação nas reações de PCR empregando os iniciadores descritos por Czczulin *et al.* (1999) e os desenhados neste estudo (*disp1 forward* e *reverse*). A combinação desses novos iniciadores permitiu a amplificação de um fragmento de 347 pb, o que abrange 113 nucleotídeos a mais que a região amplificada pelos iniciadores descritos por Czczulin *et al.* (1999). O *amplicon* obtido engloba o códon de terminação, além de 24 nucleotídeos *downstream* ao gene. Quando submetidos ao seqüenciamento, os fragmentos amplificados pelos iniciadores *disp1* apresentaram alta homologia entre as seis amostras seqüenciadas e em relação ao fragmento derivado da amostra protótipo 042. O mesmo grau de

similaridade foi observado com relação à proteína deduzida das seqüências de nucleotídeos. Estes resultados confirmam a presença do gene *aap* e refletem sua elevada conservação nessas amostras.

A sorotipagem das amostras *aap*-positivas mostrou uma grande diversidade de antígenos O e H. Não houve associação entre sorotipo e padrão de adesão, o que é uma característica de EAEC (PIVA *et al.*, 2003; UBER *et al.*, 2006; ZAMBONI *et al.*, 2004) e EPEC atípica (DULGUER *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2004; VIEIRA *et al.*, 2001).

As três amostras classificadas como EAEC no presente estudo apresentam o gene *aap* sem associação com *aggR*, semelhante ao encontrado por outros autores (CERNA *et al.*, 2003; CZECHULIN *et al.*, 1999; JENKINS *et al.*, 2006a).

O gene *aggR* codifica uma proteína da família AraC de ativadores transcricionais que foi descrita como reguladora global dos genes de virulência da amostra protótipo de EAEC 042 (HARRINGTON *et al.*, 2006). Entretanto essa amostra é uma EAEC típica e a presença de *aap* em amostras de EAEC atípicas (CZECHULIN *et al.*, 1999; ELIAS *et al.*, 2002; ZAMBONI *et al.*, 2004) sugere que a dispersina não seja regulada apenas por AggR.

Com o intuito de verificar se o gene *aap* detectado nessas amostras estava sendo expresso, foi obtida uma proteína recombinante His₆-Aap para a produção de um soro polivalente específico para a dispersina.

A análise da proteína recombinante purificada através de eletroforese em gel de poliacrilamida demonstrou a presença de uma proteína de massa molecular de aproximadamente 20 kDa, ou seja, o dobro da massa molecular esperada para a molécula da dispersina (SHEIKH *et al.*, 2002). Não houve descrição até o momento, de que a proteína Aap pudesse formar dímeros, o que poderia explicar a presença da proteína com o dobro da massa molecular esperada. Entretanto, há descrição deste tipo de fenômeno na literatura para outras proteínas. EibG, uma proteína com função de adesina em algumas amostras de STEC LEE-negativas, foi descrita recentemente como capaz de formar multímeros (LU *et al.*, 2006). Ela é revelada nos *immunoblottings* com cerca de cinco vezes o tamanho da proteína esperada. Esta capacidade de agregar e formar multímeros já havia sido descrita para algumas proteínas de *Yersinia enterocolitica* (ZALESKA *et al.*, 1985; BLISKA *et al.*, 1993; TAMM *et al.*, 1993). Como o produto eluído nas duas purificações realizadas

correspondeu a uma proteína de cerca de 20 kDa, sugere-se que possa ter ocorrido a formação de dímeros da proteína Aap.

Foi realizado um experimento de RT-PCR, para verificar a transcrição do RNA mensageiro correspondente ao gene *aap* clonado em pET28a. Esse experimento foi realizado como RNA extraído da amostra BL21(DE3)-pBTM2 e houve a detecção do cDNA correspondente (dados não apresentados).

O soro produzido a partir da proteína purificada revelou em ensaios de *immunoblotting* que sete das 26 amostras expressaram a proteína dispersina. Muitos genes de virulência de EAEC estão sob controle do regulador AggR. Este regulador é responsável pela expressão de vários genes, cromossômicos e plasmidiais, inclusive o gene que codifica a proteína dispersina (HARRINGTON *et al.*, 2006). O gene que codifica este regulador, *aggR*, não está presente em nenhuma das amostras deste estudo, como descrito previamente. É possível que, neste caso, haja um outro regulador atuando no controle da expressão da proteína dispersina nestas sete amostras. No restante das amostras, embora presente, o gene *aap* não está sendo expresso.

O soro produzido também revelou informações sobre a interação da dispersina no fenótipo de adesão em célula HEp-2. Não houve inibição ou alteração do padrão observado em nenhuma das amostras aderentes quando estas foram submetidas à incubação com soro anti-Dispersina, inclusive nas três amostras cuja expressão da proteína se mostrou positiva na análise por *immunoblotting*. Por outro lado, na amostras protótipo 042 a inibição da adesão foi total. Esta bactéria apresenta a fímbria AAF/II (CZECZULIN *et al.*, 1997), enquanto em nenhuma das amostras deste estudo essa fímbria foi detectada. A diferença nos resultados observados pode ter ocorrido devido à interação entre a dispersina e a fímbria da amostra 042.

Sheikh *et al.* (2002) avaliaram o comportamento de mutantes no gene *aap* quando em contato com células epiteliais. As bactérias formaram grandes agregados, maiores do que os visualizados na amostra selvagem. A microscopia eletrônica mostrou que essa agregação acontecia porque, na ausência de dispersina, as fímbrias encontravam-se colabadas no corpo da bactéria, impedindo sua dispersão pela superfície das células.

Diferente do observado nos mutantes de Sheikh *et al.* (2002), quando em contato com soro anti-Dispersina, ao invés de formar agregados maiores a amostra

042 não aderiu às células epiteliais. O mecanismo nessas duas técnicas não é o mesmo. Enquanto na mutagênese Aap não é formada, na inibição da adesão, Aap é expressa e secretada, estando covalentemente ligada ao LPS da bactéria no momento da incubação com o soro. A ligação da dispersina com seu anti-soro pode ter ocasionado alguma mudança conformacional na fímbria AAF/II que interferiu não só na sua interação com as outras bactérias, mas também na interação com as células HEp-2. Como as 11 amostras aderentes não apresentam os genes que codificam AAF/II, a presença ou ausência de dispersina não interferiu no padrão de adesão observado. A mutagênese no gene *aap* poderá esclarecer melhor o papel da dispersina na interação dessas bactérias com as células epiteliais.

Além de *aap*, *aggR* e *aatA*, outros genes são relacionados ao patótipo EAEC. Para verificar se as 26 amostras *aap*-positivas possuíam outros marcadores de virulência de EAEC, foram pesquisados os genes *aagA*, *aggC*, *aafA*, *aafC*, *agg3A*, *agg3C*, *astA*, *pet*, *pic*, *irp2*, *shf*, *pilS* e *ap58*. Em algumas amostras houve amplificação de *astA*, *agg3C*, *irp2*, *shf* ou *pilS* em diferentes combinações.

Alguns desses genes, embora frequentemente detectados em EAEC, não são exclusivos deste patótipo. O gene *astA* tem sido descrito em amostras pertencentes a vários patótipos de ECD. Savarino *et al.* (1996) reconheceu que *astA* era encontrado em cepas de EHEC, ETEC, EPEC e até mesmo em *E. coli* isoladas de pacientes assintomáticos. Em um estudo realizado por Dulguer *et al.* (2003), 45% das amostras de EPEC atípica estudadas foram positivas para o gene *astA*. Outros estudos também relataram a presença de cepas de EPEC que albergam a sequência *astA* (GOMES *et al.* 2004; VIEIRA *et al.* 2001; YATSUYANAGUI *et al.*, 2003). Os genes *shf* e *irp2* também já foram encontrados em outros microorganismos. Bach *et al.* (2000) descreveram que a ilha de patogenicidade de *Yersinia* spp., responsável pela aquisição de ferro, é encontrada em vários membros da família Enterobacteriaceae; o gene *irp2* faz parte dessa ilha. Murinda *et al.* (2004) descreveram amostras de STEC O26 que albergavam o gene *irp2*. Gomes *et al.* (2004) descreveram amostras de EPEC atípica, isoladas em São Paulo e no Rio de Janeiro, positivas para os genes *irp2* e *shf*. A ORF *shf* também é encontrada em *Shigella flexneri* e no plasmídeo pO157 de EHEC (BURLAND *et al.*, 1998; LUCK *et al.*, 2001). Entretanto, a função desses genes em amostras não EAEC não está estabelecida.

Um dos marcadores intimamente associados a EAEC detectado nas amostras *aap*-positivas foi *agg3C*. Curiosamente, as cinco amostras positivas para este gene que codifica o *usher* da fímbria AAF/III (BERNIER *et al.*, 2002) não apresentaram amplificação para a unidade de pilina correspondente, *agg3A*. Jenkins *et al.* (2005) reportaram em seu estudo duas amostras positivas para *agg3C*, mas negativas para *agg3A*. Os autores especulam que nessas cepas de EAEC pode ter havido recombinação entre os alelos de AAF. Entretanto, no presente estudo, quatro das cinco amostras positivas para *agg3C* apresentam o padrão difuso de adesão em células HEP-2. A fímbria AAF/III pertence à família das adesinas Afa/Dr que engloba adesinas presentes em DAEC e UPEC (SERVIN, 2005). Uma vez que *ushers* de diversas adesinas de *E. coli* da família Afa/Dr são extremamente conservados entre si, *agg3C* pode estar reagindo de forma cruzada com o *usher* de outra adesina da mesma família. Amostras que carregam o *operon afa* comumente hibridizam com sondas AAF. Bernier *et al.* (2002) obtiveram resultados positivos na hibridização de *agg3C* com as amostras C1845, AL845 e AL851 que albergam, respectivamente, os *operons daa* (pertencente à família dos *operons afa*), *afa-3* e *afa-5*. A amostra A30 utilizada como controle positivo neste estudo para a detecção de *agg3C* possui o *operon afa-3* e hibridiza corretamente com o gene do *usher* de AAF/III. Estes dados reforçam a idéia de que nas quatro amostras *agg3C*-positivas, que apresentam o padrão difuso de adesão, pode ter ocorrido reação cruzada com algum *usher* da família Afa/Dr.

Outro gene relacionado a EAEC encontrado nas amostras deste estudo foi *pilS*, que codifica a pilina correspondente à subunidade principal do pili tipo IV descrita em uma amostra de EAEC atípica (DUDLEY *et al.*, 2006a). Embora recentemente tenham sido identificadas cepas de *E. coli* uropatogênica que carregam o gene *pilS* (ABE *et al.*, 2008), a prevalência desse pili em outros patótipos de *E. coli* diarreiogênica ainda não foi investigada.

As amostras *aap*-positivas do presente estudo foram isoladas de crianças com diarreia aguda (BUERIS *et al.*, 2007). Entretanto é difícil estabelecer se essas bactérias eram realmente os enteropatógenos ou se eram habitantes da flora intestinal desses pacientes. A análise das amostras de fezes das crianças revelou, em alguns casos, associação entre as *E. coli aap*-positivas com outros patógenos intestinais (BUERIS *et al.*, 2007). Amostras de oito crianças apresentaram associação com rotavírus, duas crianças apresentaram EAEC em suas fezes e uma

estava infectada por *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* (Dra. Márcia R. Franzolin, Instituto Butantan – comunicação pessoal). Nesses casos é difícil determinar qual patógeno estava de fato causando a doença diarréica nos pacientes.

A fim de melhor avaliar o potencial patogênico dessas amostras, foi realizada uma análise filogenética baseada no PCR *multiplex* descrito por Clermont *et al.* (2000), que possibilita a classificação de amostras de *E. coli* nos grupos filogenéticos A, B1, B2 e D (HERZER *et al.*, 1990; SELANDER *et al.*, 1987), estabelecidos previamente com base em análises de *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE). Os grupos B2 e D compreendem diversas linhagens de *E. coli* chamadas de clones virulentos devido a sua freqüente associação com infecções intestinais e extra-intestinais. A maior parte das *E. coli* extra-intestinais pertence ao grupo B2, embora algumas pertençam ao grupo D (CLERMONT *et al.*, 2000; JOHNSON; STELL, 2000). Os verdadeiros enteropatógenos, como as EHEC O157:H7, pertencem ao grupo D (CLERMONT *et al.*, 2000) e as *E. coli* comensais pertencem ao grupo filogenético A (HERZER *et al.*, 1990).

Clermont *et al.* (2000) desenvolveram um método rápido de classificação filogenética que substitui a análise das amostras por MLEE ou ribotipagem. A técnica de PCR *multiplex* analisa a presença ou ausência dos genes *chuA* de *E. coli* O157:H7, *yjaA* de *E. coli* K-12 e de um fragmento anônimo de DNA, denominado TSPE4.C2. A combinação entre esses três marcadores classifica as amostras nos grupos filogenéticos descritos.

Catorze das 26 amostras *aap*-positivas do presente trabalho, pertencem ao grupo D, enquanto apenas 2, 6 e 4 pertencem aos grupos A, B1 e B2, respectivamente (dados não apresentados). Entre as amostras do grupo D, 9 não estavam associadas a outros patógenos. Segundo Afset *et al.* (2008), as amostras classificadas no grupo D apresentavam maior quantidade de genes de virulência do que as representantes dos grupos A, B1 e B2 e houve associação entre essas amostras e o desenvolvimento de diarréia na criança. Poucos estudos determinam se a análise dos grupos filogenéticos feita por PCR corresponde aos dados encontrados pelas técnicas clássicas. Entretanto, os dados aqui discutidos sugerem que as amostras do presente estudo, pertencentes ao grupo D, apresentam potencial patogênico e possivelmente foram causadoras do quadro diarréico nos pacientes.

Grande parte das 26 amostras apresentou altos índices de resistência *in vitro* a diversos antimicrobianos (Dra. Márcia R. Franzolin, Instituto Butantan - dados não publicados). A maior taxa de resistência ocorreu para cotrimoxazol (sulfametoxazol associado à trimetoprima), onde 80,8% das amostras se mostraram resistentes. Também houve resistência à ampicilina, estreptomicina, tetraciclina, cefalotina e clorafenicol. Resistência a antimicrobianos é comum em enterobactérias, inclusive em habitantes da flora intestinal. Genes de resistência a antimicrobianos geralmente estão associados a plasmídeos conjugativos ou *transposons* que codificam as proteínas necessárias para iniciar e completar sua transferência para o novo hospedeiro (KARAMI *et al.*, 2007).

Um estudo conduzido com indivíduos saudáveis, pacientes e idosos hospitalizados há mais de um ano, revelou cepas de *E. coli* altamente resistentes a antibióticos. Nesse estudo, 12% das amostras apresentaram resistência à ampicilina, 18% à estreptomicina, 4% ao clorafenicol, 14% à tetraciclina, 16% ao sulfametoxazol, 9% ao trimetoprim e 8% ao cotrimoxazol. A resistência foi presente mesmo entre as pessoas saudáveis (ÖSTERBLAD *et al.*, 2000).

A ausência do gene *aatA*, que corresponde ao fragmento sonda AA ou EAEC (BAUDRY *et al.*, 1990; NISHI *et al.*, 2003) pode ser indicativo da ausência do plasmídeo pAA nas amostras aqui estudadas. Porém, Czczulin *et al.* (1999) inferem que, apesar da ausência da sequência relativa ao fragmento sonda AA, algumas amostras evidenciam a presença de pAA por albergarem outros genes codificados no mesmo plasmídeo. Entretanto, seqüências responsáveis pelas fímbrias AAF/I, AAF/II e AAF/III, pelo regulador AggR e pela toxina Pet, codificados no plasmídeo pAA também não foram encontradas nas 26 amostras *aap*-positivas deste estudo, sugerindo que tal plasmídeo deva estar realmente ausente nestas amostras. Segundo análises das seqüências de nucleotídeos dos plasmídeos pAA1 e pAA2 das amostras 17-2 e 042, respectivamente, entre os genes *aap* e *aggR* há uma seqüência de inserção (SHEIKH *et al.*, 2002). A possível presença de outra IS *upstream* ao gene *aap* poderia conferir a habilidade de transposição deste fragmento para outros locais do genoma, inclusive plasmídeos e *transposons* conjugativos. Associações entre genes de resistência à ampicilina, tetraciclina, sulfametoxazol, trimetoprim, estreptomicina e clorafenicol (multiresistência a drogas) são freqüentemente encontradas em elementos transponíveis como Tn21 e *transposons* correlatos (MARTINEZ; DE LA CRUZ, 1990; ÖSTERBLAD *et al.*, 2000). Uma vez

que grande parte das amostras *aap*-positivas deste estudo apresentou resistência a uma ou mais dessas drogas, é possível que haja a presença de elementos transponíveis integrados ao genoma dessas bactérias. A aquisição do gene *aap* pode ter ocorrido junto com a aquisição dos genes de resistência por meio desses *transposons*. Determinar se *aap* está integrado no cromossomo ou está presente em outro plasmídeo que não pAA merece investigação. Este estudo está em andamento em nosso laboratório.

A proteína dispersina foi descrita como sendo altamente imunogênica. Nataro *et al.* (1992) descreveram uma proteína críptica contra a qual voluntários apresentaram resposta imunológica. Mais tarde, constatou-se que esta proteína era a dispersina (SHEIKH *et al.*; 2002). Zamboni *et al.* (2004), em seu estudo, relataram que o gene *aap* estava presente na maioria das amostras relacionadas aos casos de diarreia. Para Huang *et al.* (2007) esta associação também é verdadeira. Recentemente, Huang *et al.* (2008), em um estudo realizado com viajantes americanos que visitaram o México, determinaram que a taxa de soro conversão para a proteína dispersina foi elevada tanto em pessoas que desenvolveram diarreia, quanto nas que se mantiveram assintomáticas. Esses dados sustentam a idéia de que a dispersina tem alto potencial imunogênico sendo, portanto, um promissor antígeno vacinal. Entretanto, segundo os resultados aqui apresentados, sua utilização como fator único para diagnóstico deve ser evitada, uma vez que o gene que a codifica foi encontrado em amostras que não apresentam nem o padrão agregativo de adesão em células HEp-2, nem o gene *aatA*, correspondente ao fragmento sonda AA.

Até o presente momento a dispersina foi descrita como uma proteína exclusiva de EAEC, mas os achados aqui relatados indicam que a dispersina não é exclusiva deste patótipo e, diferente do que foi descrito para EAEC, o gene *aap* encontrado nas amostras deste estudo não está sob regulação de *aggR*.

Genes comuns a todas as EAEC não foram relatados até o momento, visto a heterogeneidade deste grupo (HARRINGTON *et al.*, 2006). A combinação de marcadores genéticos cromossômicos e plasmidiais em um PCR *multiplex* parece unir sensibilidade e especificidade, sendo mais adequado para detectar amostras desse patótipo. Os dados obtidos no presente estudo aliados aos da literatura permitem propor a elaboração de um PCR *multiplex* que detecte simultaneamente *aatA*, *aggR* e *aaiA*, para a detecção de EAEC típicas e atípicas.

6 CONCLUSÕES

1. O gene *aap* não é exclusivo de EAEC, tendo sido encontrado em amostras de DAEC e de *E. coli* desprovidas de marcadores de virulência de *E. coli* diarreiogênicas, enquanto *aggR* e *aatA* parecem ser bem específicos deste patótipo;
2. Uma vez que o gene *aggR* está ausente em todas as 26 amostras *aap*-positivas, deve haver outro regulador gênico atuando nas amostras que expressam a proteína dispersina;
3. A ausência de marcadores como *aatA*, *aagR*, *pet* e de genes que codificam as fímbrias AAF, sugere a ausência do plasmídeo de virulência de EAEC (pAA) nessas amostras, indicando que o gene *aap* deve estar inserido em outro plasmídeo ou no cromossomo dessas bactérias;
4. A dispersina não está envolvida na adesão in vitro, possivelmente devido à ausência das fímbrias AAF nessas bactérias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABE, C. M.; SALVADOR, F. A.; FALSETTI, I. N.; VIEIRA, M. A. M.; BLANCO, J.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; MACHADO, A. M. O.; ELIAS, W. P.; HERNANDES, R. T.; GOMES, T. A. T. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 52, p. 397-406, 2008.

AFSET, J. E.; ANDERSSSEN, E.; BRUANT, G.; HAREL, J.; WIELER, L.; BERGHI, K. Phylogenetic background and virulence profile of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* from a case control study using multilocus sequence typing and DNA microarray. **J. Clin. Microbiol.**, 2008. In press.

ALBERT, M. J.; QADRI, F.; HAQUE, A.; BHUIYAM, N. A. Bacterial clump formation at the surface of liquid culture as a rapid test for identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 1397-1399, 1993.

ARANDA, K. R. S.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 5849-5853, 2004.

BACH, S.; ALMEIDA, A.; CARNIEL, E. The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family Enterobacteriaceae. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 183, p. 289-294, 2000.

BATCHELOR, M.; KNUTTON, S.; CAPRIOLI, A.; HUTER, V.; ZANIAL, M.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. Development of a universal intimin antiserum and PCR primers. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 3822-3827, 1999.

BANGAR, R.; MAMATHA, B. Identification of enteroaggregative *Escherichia coli* in infants with acute diarrhea based on biofilm production in Manipal, South India. **Indian J. Med. Sci.**, v. 62, p. 8-12, 2008.

BAUDRY, B.; SAVARINO, S. J.; VIAL, P.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. **J. Infect. Dis.**, v. 161, p. 1249-1251, 1990.

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

BENZ, I.; SCHMIDT, A. Isolation and serological characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of diarrhea-associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27). **Infect. Immun.**, v. 60, p. 13-18, 1992.

BERNIER, C.; GOUNON, P.; LE BOUGUÉNEC, C. Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 4302-4311, 2002.

BILGE, S. S.; CLAUSEN, C. R.; LAU, W.; MOSELEY, S. T. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 4281-4289, 1989.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; DAHBI, G.; MORA, A.; ALONSO, M. P.; VARELA, G.; GADEA, M. P.; SCHELOTTO, F.; GONZÁLEZ E. A.; BLANCO, J. Typing of intimin (*eae*) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants (μ B and ξ R/ β 2B). **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 1165-1174, 2006.

BLISKA, J. B.; COPASS, M. C.; FALKOW, S. The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEp-2 cells. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 3914-3924, 1993.

BUERIS, V.; SIRCILLI, M. P.; TADDEI, C. R.; SANTOS, M. F.; FRANZOLIN, M. R.; MARTINEZ, M. B.; FERRER, S. R.; BARRETO, M. L.; TRABULSI, L. R. Detection of *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 839-844, 2007.

BURLAND, V.; SHAO, Y.; PERNA, N. T.; PLUNKETT, G.; SOFIA, H. J.; BLATTNER, F. R. The complete DNA sequence and analysis of the virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. **Nucleic Acids Res.**, v. 26, p. 4196-4204, 1998.

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.

CERNA, J. F.; NATARO, J. P.; ESTRADA-GARCIA, T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 2138-2140, 2003.

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

CLARKE, S. C.. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* - an emerging problem? **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 41, p. 93-98, 2001.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl. Environ Microbiol.**, v. 66, p. 4555-4558, 2000.

COBELJIC, M.; MILJKOVIC-SELIMOVIC, B.; PAUNOVIC-TODOSIJEVIC, D.; VELICKOVIC, Z.; LEPSANOVIC, Z.; ZEC, N.; SAVIC, D.; ILIC, R.; KONSTANTINOVIC, S.; JOVANOVIĆ, B.; KOSTIC, V. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhea in a neonatal nursery ward. **Epidemiol. Infect.**, v. 117, p. 11-16, 1996.

COOKSON, S. T.; NATARO, J. P. Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli*. **Microb. Pathog.**, v. 21, p. 421-434, 1996.

CORDEIRO, F.; PEREIRA, D. S. G.; ROCHA, M.; ASENSI, M. D.; ELIAS, W. P.; CAMPOS, L. C. Evaluation of a multiplex PCR for identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 828-829, 2008.

COSSART, P.; SANSONETTI, P. J. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. **Science**, v. 304, p. 242-248, 2004.

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

CRAVIOTO, A.; TELLO, A.; NAVARRO, A.; RUIZ, J.; VILLAFÁN, H.; URIBE, F.; ESLAVA, C. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. **Lancet**, v. 337, p. 262-264, 1991.

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, p. 4135-4145, 1997.

CZECZULIN, J. R.; WHITTAM, T. S.; HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2692-2699, 1999.

DEBROY, C.; YEALY, J.; WILSON, R. A. BHAN, M. K.; KUMAR, R. Antibodies raised against the outer membrane protein interrupt adherence of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 2873-2879, 1995.

DUDLEY, E. G.; ABE, C.; GHIGO, J. M.; LATOUR-LAMBERT, P.; HORMAZABAL, J. C.; NATARO, J. P. An IncI1 plasmid contributes for the adherence of atypical Enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 2102-2114, 2006a.

DUDLEY, E. G.; THOMSON, N. R.; PARKHILL, J.; MORIN, N. P.; NATARO, J. P. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a *pheU* pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 61; n. 5; p. 1267-82, 2006b.

DULGUER, M. V.; FABBRICOTTI, S. H.; BANDO, S. Y.; MOREIRA-FILHO, C. A.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. **J. Infect. Dis.**, v. 188, p. 1685-1694, 2003.

ELIAS, W. P.; SUZART, S.; TRABULSI, L. R.; NATARO, J. P.; GOMES, T. A. Distribution of *aggA* and *aafA* gene sequences among *Escherichia coli* isolates with genotypic or phenotypic characteristics, or both, of enteroaggregative *E. coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, p. 597-599, 1999.

ELIAS, W. P.; UBER, A. P.; TOMITA, S. K.; TRABULSI, L. R.; GOMES, T. A. T. Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhoea. **Epidemiol. Infect.**, v. 129, p. 49-55, 2002.

ESLAVA, C.; NAVARRO-GARCIA, F.; CZECZULIN, J. R.; HENDERSON, I. R.; CRAVIOTO, A.; NATARO, J. P. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 3155-3163, 1998.

EVANS, D. J.; EVANS, D. G. Three characteristics associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. **Infect. Immun.**, v. 8, p. 322-328, 1973.

FANG, G. D.; LIMA, A. A.; MARTINS, C. V.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L. Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 21, p. 137-144, 1995.

FRANZOLIN, M. R.; ALVES, R. C. B.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T.; BEUTIN, L.; BARRETO, M. L.; MILROY, C. A.; 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.

FUJIYAMA, R.; NISHI, J.; IMUTA, N.; TOKUDA, K.; MANAGO, K.; KAWANO, Y. The shf gene of *Shigella flexneri* homologue on the virulent plasmid pAA2 of enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation. **Curr. Microbiol.**, v. 56, p. 474-480, 2008.

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN, V. P. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2573-2585, 2005.

GIOPPO, N. M., ELIAS, W. P., VIDOTTO, M. C., LINHARES, R. E., SARIDAKIS, H. O., GOMES, T. A., TRABULSI, L. R., PELAYO, J. S. Prevalence of HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* and characterisation of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 190, p. 293-298, 2000.

GIRÓN, J. A.; JONES, T.; MILLÁN-VELASCO, F.; CASTRO-MUNOZ, E.; ZARATE, L.; FRY, J.; FRANKEL, G.; MOSELEY, S. L.; BAUDRY, B.; KAPER, J. B.; SCHOOLNIK, G. K.; RILEY, L. W. Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. **J. Infect Dis.**, v. 163, p. 507-513, 1991.

GOMES, T. A.; BLAKE, P. A.; TRABULSI, L. R. Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse, and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, p. 266-269, 1989.

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

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, p. 3609-3613, 1998.

GOMES, T. A.; IRINO, K.; GIRÃO, D. M.; GIRÃO, V. B.; GUTH, B. E.; VAZ, T. M.; MOREIRA, F. C.; CHINARELLI, S. H.; VIEIRA, M. A. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, p. 1851-1855, 2004.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 360, p. 512-519, 2003.

GUINÉE, P. A. M.; JANSEN, W. H.; WADSTRÖM, T.; SELLWOOD, R. *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. In: LEEW, P. W.; GUINÉE, P.A.M. (Ed.). **Current Topics in Veterinary and Animal Science**. The Hague, Netherlands: Martinus-Nijhoff, 1981. p. 126-162.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, v. 166, p. 557-80, 1983.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 254, p. 12-18, 2006.

HARTMAN, A. B., VENKATESAN, M., OAKS, E. V., BUYSSE, J. M. Sequence and molecular characterization of a multicopy invasion plasmid antigen gene, *ipaH*, of *Shigella flexneri*. **J. Bacteriol.**, v. 172, p. 1905-1915, 1990.

HENDERSON, I. R.; CZECZULIN, J.; ESLAVA, C.; NORIEGA, F.; NATARO, J. P. Characterization of *pic*, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 5587-5596, 1999.

HERNANDES, R. T.; VIEIRA, M. A. M.; CARNEIRO, S. M.; SALVADOR, F. A.; GOMES, T. A. T. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains that express typical localized adherence in HeLa cells in the absence of the bundle-forming pilus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 4214-4217, 2006.

HERZER, P. J.; INOUE, S.; INOUE, M.; WHITTAM, T. S. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 172, p. 6175-6181, 1990.

HUANG, D. B.; MOHAMED, J. A.; NATARO, J. P.; DUPONT, H. L.; JIANG, Z. D.; OKHUYSEN, P. C. Virulence characteristics and molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from travelers to developing countries. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p. 1386-1392, 2007.

HUANG, D. B.; BROWN, E. L.; DUPONT, H. L.; CERF, J.; CARLIN, L.; FLORES, J.; BELKIND-GERSON, J.; NATARO, J. P.; OKHUYSEN, P. C. Seroprevalence of the enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factor dispersin among USA travellers to Cuernavaca, Mexico: a pilot study. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, p. 476-479, 2008.

HOPKINS, M. J.; MACFARLANE, G. T. Changes in predominant bacterial population in human faeces with age and with *Clostridium difficile* infection. **J. Med. Microbiol.**, v. 51, p. 448-454, 2002.

IDE, T.; MICHGEHL, S.; KNAPPSTEIN, S.; HEUSIPP, G.; SCHMIDT, M. A. Differential modulation by Ca²⁺ of type III secretion of diffusely adhering of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 1725-1732, 2003.

JENKINS, C.; VAN IJPEREN, C.; DUDLEY, E. G.; CHART, H.; WILLSHAW, G. A.; CHEASTY, T.; SMITH, H. R.; NATARO, J. P. Use of a microarray to assess the distributions of plasmid and chromosomal virulence genes in strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 253, p. 119-124, 2005.

JENKINS, C.; CHART, H.; WILLSHAW, G. A.; CHEASTY, T.; SMITH, H. R. Genotyping of enteroaggregative *Escherichia coli* and identification of target genes for the detection of both typical and atypical strains. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 55, p. 13-19, 2006a.

JENKINS, C.; TEMBO, M.; CHART, H.; CHEASTY, T.; WILLSHAW, G. A.; PHILLIPS, A. D.; TOMPKINS, D.; SMITH, H. Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* in faecal samples from patients in the community with diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 1493-1497, 2006b.

JIANG, Z. D.; GREENBERG, D.; NATARO, J. P.; STEFFEN, R.; DUPONT, H. L. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 4185-4190, 2002.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 261-272, 2000.

KAPER, J. B. Defining EPEC. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 130-133, 1996.

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

KARAMI, N.; MARTNER, A.; ENNE, V. I.; SWERKERSSON, S.; ADLERBERTH, I.; WOLD, A. E. Transfer of an ampicillin resistance gene between two *Escherichia coli* strains in the bowel microbiota of an infant treated with antibiotics. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 60, p. 1142-1145, 2007.

LABIGNE-ROUSSEL, A.; FALKOW, S. Distribution and degree of heterogeneity of the afimbrial-adhesin-encoding operon (afa) among uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 640-648, 1988.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEVINE, M. M.; BERQUIST, E. J.; NALIN, D. R.; WATERMAN, D. H.; HORNICK, R. B.; YOUNG, C. R.; SOTMAN, S. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxin and are non-invasive. **Lancet**, v. 27, p. 1119-1122, 1978.

LIMA, A. A.; FANG, G.; SCHORLING, J. B.; DE ALBUQUERQUE, L.; MCAULIFFE, J. F.; MOTA, S.; LEITE, R.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Paediatr. Suppl.**, v. 381, p. 39-44, 1992.

LU, Y.; IYODA, S.; SATOU, H.; SATOU, H.; ITOH, K.; SAITOH, T.; WATANABE, H. A new immunoglobulin-binding protein, EibG, is responsible for the chain-like adhesion phenotype of locus of enterocyte effacement-negative, Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 5747-5755, 2006.

LUCK, S. N.; TURNER, S. A.; RAJAKUMAR, K.; SAKELLARIS, H.; ADLER, B. Ferric dicitrate transport system (Fec) of *Shigella flexneri* 2a YSH6000 is encoded on a novel pathogenicity island carrying multiple antibiotic resistance genes. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 6012-6021, 2001.

MAIRENA, E. C.; NEVES B. C.; TRABULSI L. R.; ELIAS, W. P. Detection of LEE 4 region-encoded genes from different enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. **Curr. Microbiol.**, v. 48, p. 412-418, 2004.

MARTINEZ, E.; DE LA CRUZ, F. Genetic elements involved in Tn21 site-specific integration, a novel mechanism for the dissemination of antibiotic resistance genes. **EMBO J.**, v. 9, p. 1275-1281, 1990.

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

McDANIEL, J. 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. U. S. A.**, v. 92, p. 1664-1668, 1995.

MEDEIROS, M. I.; NEME, S. N.; DA SILVA, P.; CAPUANO, P. M.; ERRERA, M. C.; FERNANDES, S. A.; DO VALLE, G. R.; DE ALVILA, F. A. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto-SP, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 43, p. 21-24, 2001.

MENEZES, C. A.; IMAMURA, S. Y.; TRABULSI, L. R.; FERNANDES-FILHO, A.; MARTINEZ, M. B.; GUTH, B. E. C.; GIRÃO, D. M.; PIAZZA, R. M. F. Production, characterization, and application of antibodies against heat-labile type-I toxin (LT-I) for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 875-880, 2006.

MONTEIRO-NETO, V.; BANDO, S. Y.; MOREIRA-FILHO, C. A. GIRÓN, J. A. Characterization of an outer membrane protein associated with hemagglutination and adhesive properties of enteroaggregative *Escherichia coli* O111:H12. **Cell. Microbiol.**, v. 5, p. 533-547, 2003.

MOON, H. W.; WHIPP, S. C.; ARGENZIO, R. A.; LEVINE, M. M.; GIANNELLA, R. A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infect. Immun.**, v. 41, p. 1340-1351, 1983.

MOSELEY, S. T.; HARDY, J. W.; HUG, M. I.; ECHEVERIA, P.; FALKOW, S. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 39, p. 1167-1174, 1983.

MURINDA, S. E.; BATSON, S. D.; NGUYEN, L. T.; GILLESPIE, B. E.; OLIVER, S. P. Phenotypic and genetic markers for serotype-specific detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains from North America. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 1, p. 125-135, 2004.

NATARO, J. P.; BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; BLACK, R. E.; BRAVO, N.; LEVINE, M. M. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. **J. Infect. Dis.**, v. 152, p. 560-565, 1985.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V.; VIAL, P. A.; LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.** v. 16, p. 829-831, 1987.

NATARO, J. P.; DENG, Y.; MANEVAL, D. R.; GERMAN, A. L.; MARTIN, W. C.; LEVINE, M. M.; Aggregative adherence fimbria I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2297-2304, 1992.

NATARO, J. P.; YIKANG, D.; YINGKANG, D.; WALKER, K. AggR, a transcriptional activator of enteroaggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 4691-4699, 1994.

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

NATARO, J. P.; MAI, V.; JOHNSON, J.; BLACKWELDER, W. C.; HEIMER, R.; TIRRELL, S.; EDBERG, S. C.; BRADEN, C. R.; MORRIS, J. G.; HIRSHON, J. M. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New-Haven, Connecticut. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p. 402-407, 2006.

NISHI, J.; SHEIKH, J.; MIZUGUCHI, K.; LUISI, B.; BURLAND, V.; BOUTIN, A.; ROSE, D.J.; BLATTNER, F.R.; NATARO, J.P. The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP-binding cassette transporter system. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 45680-45689, 2003.

NOVERR, C. M.; HUFFNAGLE, G. B. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? **TRENDS Microbiol.**, v. 12, p. 562-568, 2004.

NOWROUZIAN, F.; HESSELMAR, B.; SAALMAN, R.; STRANNEGARD, I.; ABERG, N.; WOLD, A. E.; ADLERBERTH, I. *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover and virulence gene carriage. **Pediatr. Res.**, v. 54, p. 8-14. 2003.

ODUM, E. P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 434 p.

ÖSTERBLAD, M.; HAKANEN, A.; MANNINEN, R.; LEISTEVUO, T.; PELTONEN, R.; MEURNAN, O.; HUOVINEN, P.; KOTILAINEN, P. A between-species comparison of antimicrobial resistance in enterobacteria en fecal flora. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 1479-1484, 2000.

PARSOT, C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 252, p. 11-18, 2005.

PELAYO, J. S.; SCALETSKY, I. C. A.; PEDROSO, M. Z.; SPERANDIO, V.; GIRÓN, J. A.; FRANKEL, G.; TRABULSI, L. R. Virulence properties of atypical EPEC strains. **J. Med. Microbiol.**, v. 48, p. 41-49, 1999.

PENDERS, J.; VINK, C.; DRIESSEN, C.; LONDON, N.; THIJS, C.; STOBBERINGH, E. E. Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 243, p. 141-147, 2005.

PENDERS, J.; THIJS, C.; VINK, C.; STELMA, F. F.; SNIJDERS, B.; KUMMENLING, I.; VAN DEN BRANDT, P. A.; STOBBERINGH, E. E. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics**, v. 118, p. 511-521, 2006.

PETRI, W. A.; MILLER, M.; BINDER, H. J.; LEVINE, M. M.; DILLINGHAM, R.; GUERRANT, R. L. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. **J. Clin. Invest.**, v. 118, p. 1277-1290. 2008.

PIVA, I. C.; PEREIRA, A. L.; FERRAZ, L. R.; SILVA, R. S. N.; VIEIRA, A. C.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; GIUGLIANO, L. G. Virulence markers of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children and adults with diarrhea in Brasília, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1827-1832, 2003.

QADRI, F.; SVENNERHOLM, A. M.; FARUQUE, A. S. G.; SACK, R. B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment and prevention. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, p. 465-483, 2005.

RAZZAG, S. Hemolytic uremic syndrome: an emerging health risk. **Am. Fam. Physician**, v. 74, p. 991-996, 2006.

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D.; MCGEE, H. B.; WELLS, J. G. DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T; BLAKE, P. A.; COHEN, M. L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N. Engl. J. Med.**, v. 308, p. 681-685, 1983.

RIVERO, M. A.; PADOLA, N. L.; ETCHEVERRÍA, A. I.; PARMA, A. E. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and hemolytic-uremic syndrome in Argentina. **Medicina**, B. Aires, v. 64, p. 352-356, 2004.

RODRIGUES, J. ACOSTA, V. C.; CANDEIAS, J. M.; SOUZA, L. O.; FILHO, F. J. Prevalence of diarrheogenic *Escherichia coli* and rotavirus among children from Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 1311-1318, 2002.

RÜTTLER, M. E.; YANZÓN, C. S.; CUITIÑO, M. J.; RENNA, N. F.; PIZARRO, M. A.; ORTIZ, A. M. Evaluation of a multiplex PCR method to detect enteroaggregative *Escherichia coli*. **Biocell.**, v. 30, p. 301-308, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**: a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

SARANTUYA, J.; NISHI, J.; WAKIMOTO, N.; ERDENE, S.; NATARO, J. P.; SHEIHK, J.; IWASHITA, M.; MANAGO, K.; TOKUDA, K.; YOSHINAGA, M.; MIYATA, K; KAWANO, Y. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 133-139, 2004.

SAVARINO, S. J.; FASANO, A.; WATSON, J.; MARTIN, B. M.; LEVINE, M. M.; GUANDALINI, S.; GUERRY, P. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 90, p. 3093-3097, 1993.

SAVARINO, S. J.; MCVEIGH, A.; WATSON, J.; CRAVIOTO, A.; MOLINA, J.; ECHEVERRIA, P.; BHAN, M. K.; LEVINE, M. M.; FASANO, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 173, p. 1019-1022, 1996.

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

SCALETISKY, I. C.; PEDROSO, M. Z.; OLIVA, C. A.; CARVALHO, R. L.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. A localized adherence pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 3410-3415, 1999.

SCALETISKY, I. C.; FABBRICOTTI, S. H.; CARVALHO, R. L.; NUNES, C. R.; MARANHÃO, S. H.; 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, p. 645-648, 2002.

SCHIMIDT, H.; KNOP, C.; FRANKE, S.; ALEKSIE, S.; HEESEMAN, J.; KARCH, H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 701-705, 1995.

SCHULTSZ, C.; POOL, G. J.; VAN KETEL, R.; DE WEVER, B.; SPEELMAN, P.; DANKERT, J. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 2393-2397, 1994.

SELANDER, R. K.; CAUGANT, D. A.; WHITTAM, T. S. Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*. In: NEIDHARDT, J. L.; INGRAHAM, K. B.; MAGASANIK, B.; SCHAECHTER, M.; UMBAGER, H. E. (Ed.), ***Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: cellular and molecular biology**. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1987. p. 1625-1648.

SERVIN, A. L. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, p. 264-292, 2005.

SHEIKH, J.; CZECZULIN, J. R.; HARRINGTON, S.; HICKS, S.; HENDERTON, I. R.; Le BOUGUÉNEC, C.; GOUNON, P.; PHILLIPS, A.; NATARO, J. P. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Invest.**, v. 110, p. 1329-1337, 2002.

SPANIO, L. C.; SADOVSKY, A. D. I.; SEGUI, P. N.; SAICK, K. W.; KITAGAWA, S. M. S.; PEREIRA, F. E. L.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETISKY, I. C. A. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, p. 359-363, 2008.

SUZART, S.; GUTH, B. E. C.; PEDROSO, M. Z.; OKAFOR, U. M.; GOMES, T. A. T. Diversity of surface structure and virulence genetic markers among enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains with or without the EAEC DNA probe sequence. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 201, p. 163-168, 2001.

TADDEI, C. R.; MORENO A. C. R.; FERNANDES-FILHO A.; MONTEMOR L. P. G.; MARTINEZ, M. B. Prevalence of secreted autotransporter toxin gene among diffusely adhering *Escherichia coli* isolated from stools of children. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 227, p. 249-253, 2003.

TAMM, A.; TARKKANEN, A. M.; KORHONEN, T. K.; KUUSELA, P.; TOIVANEN, P.; SKURNIK, M. Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. **Mol. Microbiol.**, v. 10, p. 995-1011, 1993.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

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

TRAGER, W. **Symbiosis**. New York, U.S.A.: Van Nostrand Reinhold Company, 1970. 100 p.

TURNER, S. M.; SCOTT-TUCKER, A.; COOPER, L. M.; HENDERSON, I. R. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escheichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 263, p. 10-20, 2006.

UBER, A. P.; TRABULSI, L. R.; IRINO, K.; BEUTIN, L.; GHILARDI, A. C. R.; GOMES, T. A. T.; LIBERATORE, A. M. A.; CASTRO, A. F. P.; ELIAS, W. P. Enteroaggregative *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 256, p. 251-257, 2006.

VELARDE, J. J.; VARNEY, K. M.; INMAN, K. G.; FARFAN, M.; DUDLEY, E.; FLETCHER, J.; WEBER, D. J.; NATARO, J. P. Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 66, p. 1123-1135, 2007.

VIEIRA, M. A.; ANDRADE, J. R.; TRABULSI, L. R.; ROSA, A. C.; DIAS, A. M.; RAMOS, S. R.; FRANKEL, G.; GOMES, T. A. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry EAE and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 762-772, 2001.

VILA, J.; VARGAS, M.; HENDERSON, I. R.; GASCÓN, J.; NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors on traveler's diarrhea strains. **J. Infect. Dis.**, v. 182, p. 1780-1783, 2000.

WAKIMOTO, N.; NISHI, N.; SHEIKH, J.; NATARO, J. P.; SATANTUYA, J.; IWASHITA, M.; MANAGO, K.; TOKUDA, K.; YOSHINAGA, M.; KAWANO, Y. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 71, p. 687-690, 2004.

WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p. 4-8, 2006.

WHITTAM, T. S.; WILSON, R. A. Genetic relationships among pathogenic *Escherichia coli* of serogroup O157. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 2467-2473, 1988.

YAMAMOTO, T.; WAKISAKA, N.; SATO, F.; KATO, A. Comparasion of the nucleotide sequence of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 genes among diarrhea-associated *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 147, p. 89-95, 1997.

YAMAZAKI, S.; LIN, Z.; SHIRAI, H.; TERA, A.; OKU, Y.; ITO, H.; OHMURA, M.; KARASAWA, T.; TSUKAMOTO, T.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y. Typing of verotoxins by DNA colony hybridization with poly and oligonucleotide probes, a bead-enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction. **Microbiol. Immunol.**, v. 40, p. 345-352, 1996.

YATSUYANAGUI, J.; SAITO, S.; MIYAJIMA, Y.; AMANO, K.; ENOMOTO, K. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 2033-2039, 2003.

ZALESKA, M.; LOUNATMAA, K.; NURMINEN, M.; WAHLSTRÖM, E.; MÄKELÄ, P. H. A novel virulence-associated cell surface structure composed of 47-kd protein subunits in *Yersinia enterocolitica*. **EMBO J.**, v. 4, p. 1013-1018, 1985.

ZAMBONI, A.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p.1058-1063, 2004.