UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Caracterização molecular do gene *fliC* de *Escherichia coli*
enterotoxigênica pela análise de seu polimorfismo de
restrição**

Ana Carolina Ramos Moreno

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Assoc. Marina Baquerizo Martinez

São Paulo
2004

Ana Carolina Ramos Moreno

Caracterização molecular do gene *fliC* de *Escherichia coli*
enterotoxigênica pela análise de seu polimorfismo de restrição

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Associada Marina Baquerizo Martinez
orientador/presidente

Profa. Doutora Tânia Tardelli Gomes do Amaral
1º. examinador

Prof. Titular Antônio Fernando Pestana de Castro
2º. examinador

São Paulo, 21 de maio de 2004.

Aos meus pais, Marilda (in memorian) e Vicente,

*...que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade,
...que se doaram por inteiro, muitas vezes renunciando aos seus sonhos
para que eu pudesse realizar os meus.*

*Faço da minha conquista o instrumento de gratidão por tudo que recebi
de vocês.*

*Aos meus irmãos, Alex, Artur e André, amigos e companheiros que amo
muito.*

*À minha amada avó Maria (in memorian), pelo infinito amor, carinho,
confiança e amizade. Meu exemplo de coragem, no qual me espelho para dar
continuidade aos meus ideais.*

*Aos meus queridos avós, Vicente, Mário e Cybeles, pelo carinho, amor e
confiança; por se orgulharem de mim e como pessoa, neta e profissional.*

Dedico com muito amor este trabalho.

*À Profa. Assoc. Marina Baquerizo Martinez,
orientadora e amiga a quem serei eternamente
grata pela oportunidade de trabalhar em seu
laboratório, pelos ensinamentos e disciplina
transmitidos, pelo carinho e amizade concedidos.*

À Profa. Dra. Beatriz Ernestina Cabilho Guth, por ter aberto as portas de seu laboratório, pelas orientações constantes, pela dedicação e amizade dispensadas.

*"Sei que meu trabalho é uma gota no oceano, mas sem ele, o
oceano seria menor"*

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

Às queridas amigas Juliana Mota Khalil Amhaz e Carla Taddei de Castro Neves, pela amizade, carinho, companheirismo e ensinamentos dispensados.

Aos amigos Antônio Fernandes Filho e John Anthony McCulloch, por estarem sempre ao meu lado, pela amizade e carinho.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia Clínica Andréa Bernardes, Diogo Ogawa, Cristina Reinert, Nilton Lincopan, José Antônio Albuquerque, Liana Montemor, Vanessa Tavares, Anna Paula Horwath e Marco Avianello, agradeço por todo o carinho, ajuda, amizade e companheirismo.

Às queridas amigas Solange E. Souza e Renata Albuquerque, pela amizade sincera, pela ajuda, por estarem comigo nas horas boas e ruins e por me acolherem sempre que necessário com muito carinho.

À Evanilde Maria Gonçalves, técnica do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Microbiologia da UNIFESP, pelo carinho, apoio e ajuda a mim dispensados.

Às minhas amigas Gabriela Becker, Adriana Lima e Simone Bastos, pelo carinho, companheirismo e confiança.

À Dra. Kinue Irino, do Instituto Adolf Lutz, por sua colaboração, atenção e disponibilidade.

À Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka pelo apoio e carinho.

Aos funcionários e docentes do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela cooperação técnica e carinho.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPESP, pelo apoio financeiro concedido para a realização desta pesquisa.

À Universidade de São Paulo, fonte inesgotável da sabedoria, da qual tive a honra de ter sido aluna.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização do presente trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIÇÕES

LISTA DE SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

1. Introdução.....	01
1.1. <i>Escherichia coli</i> - generalidades.....	01
1.2. <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica.....	02
1.3. Importância do antígeno flagelar.....	04
1.4. Estrutura flagelar.....	06
1.5. Detecção e identificação de bactérias utilizando-se PCR-RFLP.....	09
1.5.1. Polimorfismo de restrição do gene <i>fliC</i>	09
2. Objetivos.....	12
3. Materiais e métodos.....	13
3.1. Cepas bacterianas.....	13
3.2. Obtenção do DNA genômico.....	14
3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	14
3.4. Eletroforese em gel de agarose.....	15
3.5. Estudo do polimorfismo de restrição do gene <i>fliC</i> com enzima de restrição.....	16
3.5.1. Digestão do produto amplificado.....	16
3.6. Determinação do tamanho dos fragmentos do DNA.....	17
3.7. Determinação do antígeno flagelar por sorotipagem.....	17
4. Resultados.....	20
4.1. Cepas padrão de <i>Escherichia coli</i> para pesquisa do antígeno flagelar.....	20
4.1.1. Amplificação de <i>fliC</i> pela reação em cadeia da polimerase.....	20
4.1.2. Análise do gene <i>fliC</i> por RFLP.....	21
4.2. Cepas de ETEC móveis com antígenos O e H conhecidos.....	26
4.2.1. Amplificação de <i>fliC</i> pela reação em cadeia da polimerase.....	26
4.2.2. Estudo do polimorfismo de restrição do gene <i>fliC</i> com a endonuclease <i>RsaI</i>	26

4.3. Cepas de ETEC imóveis.....	30
4.3.1. Amplificação de <i>fliC</i> pela reação em cadeia da polimerase.....	30
4.3.2. Estudo do polimorfismo de restrição do gene <i>fliC</i> com a endonuclease <i>RsaI</i>	30
4.4. Caracterização do <i>fliC</i> pela técnica de PCR-RFLP em amostras de <i>E. coli</i> com antígenos O e H previamente desconhecidos.....	33
5. Discussão.....	35
6. Conclusão.....	42
7. Referências Bibliográficas.....	43
8. Anexos.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Cepas de ETEC móveis, com AgO e AgH conhecidos18

Tabela 2- Cepas de ETEC imóveis..... 19

Tabela 3 – Relação entre os antígenos H, perfil de PCR-RFLP (*RsaI*), tamanho do *fliC* amplificado e número de pares de base dos fragmentos de RFLP das cepas padrão.....22

Tabela 4 - Relação entre os antígenos H, perfil de PCR-RFLP (*HhaI*), tamanho do *fliC* amplificado e número de pares de base dos fragmentos de RFLP das cepas padrão pertencentes aos sorotipos H1, H3, H5, H11, H12, H16, H27 e H55..... 25

Tabela 5 – Relação entre os antígenos H, *fliC* e PCR-RFLP das cepas de ETEC com AgH conhecido.....27

Tabela 6 - Confirmação do antígeno flagelar de amostras de ETEC, com AgH inicialmente conhecido, por sorotipagem.....28

Tabela 7 – Relação entre os AgH, *fliC* e PCR-RFLP das cepas de ETEC imóveis..... 31

Tabela 8- Cepas de *E. coli* com AgO e AgH inicialmente desconhecidos.....34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição de AgO em isolados de ETEC procedentes de diferentes países. (WOLF, M. K., 1997). N – quantidade de amostras analisadas.....05

Figura 2: Distribuição de AgH em isolados de ETEC procedentes de diferentes países. (WOLF, M. K., 1997). N – quantidade de amostras analisadas.....05

Figura 3 – Perfil de restrição do gene *fliC* de 17 AgH de cepas padrão de *E. coli* pela técnica de PCR-RFLP utilizando-se a endonuclease *RsaI*. M2 – padrão molecular de 100pb (Invitrogen®); P1: antígeno H1; P2: antígeno H2; P3: antígeno H3; P4: antígeno H4; P5: antígeno H5; P6: antígeno H6; P7: antígeno H7; P8: antígeno H8; P9: antígeno H9; P10: antígeno H10; P11: antígeno H11; P12: antígeno H12; P13: antígeno H14; P14: antígeno H15; P15: antígeno H16; P16: antígeno H18; P17: antígeno H19..... 23

Figura 4 – Perfil de restrição do gene *fliC* de 16 AgH de cepas padrão de *E. coli* pela técnica de PCR-RFLP utilizando-se a endonuclease *RsaI*. M2 – padrão molecular de 100pb (Invitrogen®); P18: antígeno H20; P19: antígeno H21; P20: antígeno H23; P21: antígeno H24; P22: antígeno H25; P23: antígeno H26; P24: antígeno H27; P25: antígeno H28; P26: antígeno H29; P27: antígeno H30; P28: antígeno H31; P29: antígeno H32; P30: antígeno H33; P31: antígeno H34; P32: antígeno H35; P33: antígeno H37.....23

Figura 5 – Perfil de restrição do gene *fliC* do AgH₃₆ de cepa padrão de *E. coli* pela técnica de PCR-RFLP utilizando-se a endonuclease *RsaI*. M2 – padrão molecular de 100pb (Invitrogen®); P34: antígeno H36.....24

Figura 6 – Perfil de restrição do gene *fliC* de 16 AgH de cepas padrão de *E. coli* pela técnica de PCR-RFLP utilizando-se a endonuclease *RsaI*. M2 – padrão molecular de 100pb (Invitrogen®); P36: antígeno H38; P37: antígeno H39; P38: antígeno H40; P39: antígeno H41; P40: antígeno H42; P41: antígeno H43; P42: antígeno H44; P43: antígeno H45; P44: antígeno H46; P45: antígeno H47; P46: antígeno H48; P47: antígeno H49; P48: antígeno H51; P49: antígeno H52; P50: antígeno H55; P51: antígeno H56..... 24

Figura 7 – Perfil de restrição do gene *fliC* de cepas padrão de antígeno flagelar pela técnica de PCR-RFLP utilizando-se a endonuclease *HhaI*. M2 – padrão molecular de 100pb (Invitrogen®); cepa padrão de H1; cepa padrão de H12; cepa padrão de H11; cepa padrão de H27..... 25

Figura 8 – Produto da PCR do gene *fliC* de amostras móveis de ETEC. M1 – padrão molecular de 1Kb (Invitrogen®); antígeno H2 (Rugosa:H2); antígeno H7 (O128:H7); antígeno H8 (NT:H8); antígeno H9 (O8:H9); antígeno H12 (O78:H12); antígeno H16 (O6:H16); antígeno H18 (NT:H18); antígeno H19 (O62:H19); antígeno H21 (O128:H21); antígeno H21 (O159:H21); antígeno H21 (O60:H21); antígeno H25 (O88:H25); antígeno H27 (O128:H27); antígeno H32 (O8:H32); antígeno H42 (O25:H42); antígeno H45 (O153:H45)..... 28

Figura 9 – Perfil de restrição do gene *fliC* de três amostras de ETEC H21 pela técnica de PCR-RFLP utilizando-se a endonuclease *RsaI*. M2 – padrão molecular de 100pb (Invitrogen®); P17: O128:H21; P17a: O159:H21; P17b: O60:H21..... 29

Figura 10 – Perfil de restrição do gene *fliC* de 16 AgH de ETEC pela técnica de PCR-RFLP utilizando-se a endonuclease *RsaI*. M2 – padrão molecular de 100pb (Invitrogen®); P2: antígeno H2; P7a: antígeno H7; P8: antígeno H8; P9: antígeno H9; P1: antígeno H12; P3: antígeno H16; P14: antígeno H18; P15a: antígeno H19; P17: antígeno H21; P17a: antígeno H21; P17b: antígeno H21; P20: antígeno H25; P11: antígeno H27; P26: antígeno H32; P36: antígeno H42; P39: antígeno H45..... 29

Figura 11 – Produto da PCR do gene *fliC* de amostras imóveis de ETEC. M1 – padrão molecular de 1Kb (Invitrogen®); linha 2: NM-a (O27:NM); linha 3: NM-b (O112:NM); linha 4: NM-c (NT:NM); linha 5: NM-d (O154:NM); linha 6: NM-e (O114:NM); linha 7: NM-i (NT:NM); linha 8: NM-j (O6:NM); linha 9: NM-k (O77:NM); linha 10: NM-l (NT:NM); linha 11: NM-m (O128:NM); linha 12: NM-n (O88:NM); linha 13: NM-o (O86:NM)..... 30

Figura 12 – Comparação do perfil de RFLP do gene *fliC* entre cepas móveis e imóveis de ETEC. M2 – padrão molecular de 100pb (Invitrogen®); NM-i: (NT:NM); P1 (O128:H12); NM-j: (O6:NM e O23:NM); P3: (O6:H16); NM-k: (O77:NM); P14: (NT:H18); NM-l: (R:NM); P15: (O62:H19); NM-m: (O128:NM); P17: (O128:H21); NM-n: (O88:NM); P20: (O88:H25); NM-o: (O86:NM); P26: (O8:H32)..... 32

Figura 13 – Comparação do perfil de RFLP do gene *fliC*, após digestão com *HhaI*, de cepas que não apresentaram sítios de restrição para *RsaI*. M2 – padrão molecular de 100pb (Invitrogen®); 1- NM-c: (NT:NM) (P5/A); 2- cepa padrão de H5 (P5/A); 3- cepa padrão de H55 (P5/A)..... 32

Figura 14 – Perfil de restrição do gene *fliC* de amostras imóveis de ETEC pela técnica de PCR-RFLP utilizando-se a endonuclease *RsaI*. M2 – padrão molecular de 100pb (Invitrogen®); P47: NM-d (NT:NM, O64:NM, O154:NM); P48: NM-f (NT:NM, O104:NM)..... 33

LISTA DE ABREVIACÕES

AgH - antígeno flagelar

AgO - antígeno somático

CF - fator de colonização

CT - toxina colérica

DAEC - *Escherichia coli* que adere difusamente ("diffusely adhering *Escherichia coli*")

DNA - ácido desoxirribonucléico

E. coli - *Escherichia coli*

EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa ("enteroaggregative *Escherichia coli*")

EAST - toxina produzida por cepas de *E. coli* enteriagregativa ("EAggEC heat-stable enterotoxin")

EDTA - ácido etileno diamino tetra-acético

EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica ("enterohemorrhagic *Escherichia coli*")

EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasora ("enteroinvasive *Escherichia coli*")

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica ("enteropathogenic *Escherichia coli*")

ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica ("enterotoxigenic *Escherichia coli*")

LT I - toxina termo-lábil I ("labile toxin")

LT II - toxina termo-lábil variante II

NM - não móvel

PCR - "polymarese chain reaction"

RFLP - "Restriction Fragment Lenght Polymorfism"

rpm - rotações por minuto

ST I - toxina termo estável variante I ("stable toxin")

ST II - toxina termo estável variante I ("stable toxin")

TBE - Trizma-base, borato, EDTA

Tris - tris [hidroximetil] aminometano

TSB - Tryptic Soy Broth

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - graus Celsius

g - aceleração gravitacional

h - hora(s)

HCl - ácido clorídrico

Kb – kilo pares de bases

KCl - cloreto de potássio

MgCl₂ - cloreto de magnésio

min - minuto(s)

mL - mililitro(s)

mM - milimolar

µg/mL - micrograma (s) por mililitro

µL - microlitro(s)

µm - micrometro

µM - micromolar(es)

ng - nanograma(s)

ng/µL - nanograma(s) por microlitro(s)

nm - nanometros

pb – pares de bases

s - segundo(s)

RESUMO

Neste estudo, mostramos a possibilidade de identificação dos AgH de ETEC pela caracterização molecular do gene *fliC* pela análise de seu polimorfismo de restrição. Um único alelo de *fliC* de ETEC foi encontrado para cada antígeno flagelar, utilizando-se a endonuclease *RsaI*, com exceção do H21. Além de cepas móveis, isolados imóveis também puderam ser caracterizados por essa técnica molecular.

A alta tipabilidade da PCR-RFLP foi comprovada por meio de sua aplicação não só a amostras de ETEC com AgH previamente desconhecidos, mas também a outras linhagens de *E. coli*. Observamos que após identificação do antígeno flagelar das amostras de ETEC pela PCR-RFLP, a determinação do antígeno somático pôde ser direcionada, diminuindo assim, o número de anti-soros utilizados para a pesquisa do AgO.

A técnica de PCR-RFLP, em nosso estudo, mostrou uma sensibilidade de 83% e 100% de especificidade. Esta técnica foi mais rápida na identificação do AgH de *E. coli* (2 dias) em comparação à sorologia clássica (7 ou mais dias, dependendo da motilidade da cepa).

Acreditamos que o método de soroaglutinação para determinação do AgH será substituído rapidamente pela PCR-RFLP. Contudo, a soroaglutinação não poderá ser totalmente dispensada em curto prazo. No futuro, com o perfil molecular obtido dos alelos de cepas procedentes de estudos epidemiológicos, novos padrões serão definidos para as cepas diarreiogênicas de *E. coli*, permitindo o abandono da sorologia para AgH.

ABSTRACT

In this study, we showed that the H antigens of ETEC can be characterised by restriction analysis of the polymorphism of the *fliC* gene. Only one allele of the *fliC* gene of ETEC was found for each flagellar antigen when restriction endonuclease *RsaI* was used, with the exception of H21. Additionally, non-motile strains could also be characterised using this molecular technique. The high typeability of this technique was demonstrated by the fact that it can not only be applied to ETEC samples with previously unknown H antigens but also to all other lineages belonging to the *E. coli* species. Moreover, the determination of the somatic antigen was guided by the identification of the flagellar antigen of ETEC strains by PCR-RFLP, thus reducing the number of anti-AgO sera used.

In this study, the PCR-RFLP technique showed a sensitivity of 83% and a specificity of 100%. This technique proved to be quicker for the identification of the *E. coli* AgH, taking 2 days to complete, in comparison to the 7 or more days necessary when using classic serotyping.

We believe that the determination of the AgH by seroagglutination will soon be substituted by the PCR-RFLP technique. However, serotyping will still have to be used in the short run, for further studies involving PCR-RFLP must be carried out. In the future, with the determination of the molecular profiles of alleles of strains obtained in epidemiological studies, new patterns will have been described for the diarrhoeagenic strains of *E. coli*, thus permitting the abandonment of AgH serotyping for good.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Escherichia coli* - GENERALIDADES

A diarreia é definida segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) como o quadro com mais de três evacuações líquidas, ou semilíquidas, ou uma única semilíquida, contendo muco e sangue no período de 12 horas. As manifestações clínicas seguem o curso desde discretas a extremamente graves, podendo levar ao óbito (CAMPOS, 1993).

A diarreia infecciosa é uma das principais causas de mortalidade infantil nos países em desenvolvimento, onde é considerada endêmica (W.H.O., 2003). Entre os grupos de microrganismos potencialmente causadores dessa síndrome, *Escherichia coli* foi descrita como um importante agente etiológico (GOMES et al., 1991; ALBERT et al., 1995, ALMEIDA et al., 1998; SOUZA et al., 2002; SCALETSKY et al., 2002, FERNANDES-FILHO et al., 2003).

E. coli é o anaeróbio facultativo mais predominante da flora fecal humana. Esse microrganismo caracteristicamente coloniza o trato gastrointestinal infantil dentro de poucas horas após o nascimento (NATARO & KAPER, 1998). É um bacilo Gram-negativo pertencente à família Enterobacteriaceae, que exerce um importante papel na manutenção da fisiologia intestinal tanto humana quanto animal (DRASAR et al., 1974).

A espécie *E. coli* é formada por diferentes linhagens que diferem entre si quanto às características biológicas e quanto aos fatores de virulência. Cada grupo é classificado de acordo com seu modo de ação (LEVINE, 1987). Esse microrganismo compreende tanto amostras comensais quanto patogênicas, sendo que as primeiras predominam na microbiota anaeróbia facultativa do cólon de mamíferos (NATARO & KAPER, 1998).

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

(NATARO & KAPER, 1998). As amostras patogênicas se distinguem pelas suas características sorológicas, fatores de virulência e síndromes clínicas.

Atualmente, analisando-se os tipos de interação com linhagens celulares, a produção de fatores de virulência e a patogenicidade para animais de laboratório, as amostras de *E. coli* associadas à diarreia podem ser classificadas em seis categorias: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e a *E. coli* que adere difusamente (DAEC) (NATARO & KAPER, 1998).

Nos países em desenvolvimento, em crianças de faixa etária menor do que 5 anos, a carga anual de diarreia é estimada em 1,5 bilhões de episódios, com cerca de 3 milhões de mortes. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, em estudos realizados em crianças pertencentes às comunidades carentes desses países, ETEC foi o enteropatógeno mais isolado, acometendo aproximadamente 210 milhões de episódios diarreicos e 380.000 mortes, anualmente (W.H.O., 2003).

1.2. *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÊNICA

ETEC foi primeiramente identificada como agente etiológico de diarreia em 1970 e considerada como a maior causadora desta síndrome associada a *E. coli* ao redor do mundo (HART et al., 1993; SCHMIDT et al., 1997; W.H.O., 2003).

As amostras de ETEC podem produzir dois tipos de toxinas, uma termolábil (LT) e outra termoestável (ST), codificadas por plasmídeo, que são diferentes em estrutura, antigenicidade e mecanismos de ação. Existem amostras que produzem ao mesmo tempo as duas toxinas e outras que produzem apenas uma delas (WOLF, M. K., 1997; NATARO & KAPER, 1998).

As toxinas LT constituem uma família de proteínas oligoméricas que possuem semelhanças tanto estruturais quanto funcionais com a enterotoxina colérica (CT), expressa pelo *Vibrio cholerae* (SIXMA et al., 1993). Nessa família de toxinas, duas classes distintas de LT foram descritas, LT-I e LT-II. LT-I é expressa por cepas de *E. coli* patogênicas tanto para o homem quanto para animais. LT-II foi primeiramente encontrada em cepas de *E. coli* isoladas de animais, raramente é encontrada em cepas isoladas de seres humanos e sua associação como agente de doença ainda não foi estabelecida (NATARO & KAPER, 1998).

As toxinas ST são pequenas e monoméricas, contendo múltiplos resíduos de cisteína, sendo suas pontes de dissulfeto importantes para a estabilidade térmica da toxina. Existem duas classes não relacionadas de ST que diferem tanto em estrutura quanto em mecanismos de ação (NATARO & KAPER, 1998). STa, também chamada de ST-I, são produzidas por ETEC e por outras bactérias Gram-negativas, entre elas: *Yersinia enterocolítica* e *V. cholerae* não-O1. EAST1 de *E. coli* enteroagregativa tem cerca de 50% de identidade protéica com a STa. Algumas cepas de ETEC podem expressar EAST além de STa (SAVARINO et al., 1996; YAMAMOTO et al., 1996). Ao contrário, STb tem sido encontrada apenas em ETEC. Esta enterotoxina induz danos histológicos ao epitélio intestinal que consiste na perda das vilosidades das células epiteliais e atrofia parcial das vilosidades (CHAO et al., 1997).

ETEC apresenta capacidade de colonizar as células da mucosa do intestino delgado e elaborar suas enterotoxinas, proporcionando uma diarreia aquosa (NATARO & KAPER, 1998). A adesão às células do intestino delgado não provoca qualquer alteração nas microvilosidades. Deve-se notar que a infecção intestinal por esse microrganismo é superficial, uma vez que estas são bactérias aderentes superficiais e não penetram no epitélio intestinal. Por esta razão, geralmente as fezes dos pacientes afetados não apresentam leucócitos, sangue ou muco.

Os mecanismos pelos quais ETEC adere e coloniza a mucosa intestinal têm sido intensamente investigados. A adesão da bactéria ao enterócito é mediada por adesinas denominadas de fator de colonização (CF), que reconhecem receptores específicos na superfície do epitélio intestinal. Uma grande variedade de CFs tem sido descrita em cepas de ETEC de origem humana, podendo se apresentar como fímbrias, adesinas não fimbriais ou estruturas fibrilares (NATARO & KAPER, 1998; GUTH, 2000).

Os genes dos CFs estão frequentemente localizados em um plasmídeo de alto peso molecular, que também codifica as enterotoxinas ST e/ou LT (NATARO & KAPER, 1998).

Diarreia por ETEC é uma infecção característica de países pobres e está associada com duas síndromes clínicas: diarreia em crianças recém desmamadas, em países em desenvolvimento e a diarreia do viajante. Durante os três primeiros anos de vida as crianças desenvolvem múltiplas infecções por ETEC; a doença em adultos é menos freqüente, porém muito associada a viajantes provenientes de países desenvolvidos que visitam as áreas tropicais e subtropicais no mundo (GUTH, 2000). Caracteristicamente, cepas de ETEC produtoras de ST causam a maioria dos casos endêmicos (LEVINE et al., 1993; ALBERT et al., 1995; WOLF, M. K., 1997).

A gastroenterite por ETEC tem como quadro clínico diarreia líquida, dor abdominal, febre baixa, náuseas e mal-estar. A doença é usualmente auto-limitada, durando não mais que 5 dias, exigindo contudo, em crianças e idosos debilitados, reposição hidro-eletrolítica (LEVINE, et al., 1987). A diarreia também pode resultar em uma severa secreção, similar às infecções por *V. cholerae* (LEVINE et al., 1977).

ALBERT et al. (1995) encontraram uma forte associação entre ETEC e diarreia em seu estudo, realizado com crianças até 5 anos de idade em Bangladesh, estando em concordância com outros estudos realizados em países em desenvolvimento (BHAN et al., 1989; ECHEVERRIA et al., 1989; KIM et al., 1989).

GUERRANT et al. (1983) descreveu ETEC como a categoria de *E. coli* diarreiogênica com maior frequência de isolamento em fezes diarreicas de crianças entre faixa etária de 6 a 11 meses em Fortaleza, Ceará. Porém, estudos realizados em São Paulo, São José do Rio Preto, Porto Velho e João Pessoa não mostraram ETEC como principal agente etiológico de diarreia em crianças na mesma faixa etária (TRABULSI et al., 1985; ALMEIDA et al., 1998; ORLANDI et al., 2001; FERNANDES-FILHO et al., 2003).

1.3. IMPORTÂNCIA DO ANTÍGENO FLAGELAR

Identificação de cepas de *E. coli* diarreiogênicas requer que esses microrganismos sejam diferenciados de membros não patogênicos da flora normal intestinal. A combinação dos antígenos O e H define o sorotipo dos membros da família Enterobacteriaceae. Sorotipos específicos de *E. coli* podem estar associados com certas síndromes clínicas, mas não são, em geral, os antígenos O e H que conferem a virulência, mas sim, os sorotipos e sorogrupos servem como uma marca cromossomal facilmente identificável que está correlacionada com clones específicos de virulência (NATARO & KAPER, 1998). De acordo com o esquema de Kauffmann modificado, *E. coli* são sorotipadas com base em seus antígenos de superfície O (somático), H (flagelar) e K (capsular) (Ewing, 1986; LIOR, 1996).

Os antígenos somáticos associados à ETEC são mais variados do que os antígenos flagelares relacionados à essa categoria de *E. coli* diarreiogênica (figuras 1 e 2, respectivamente) (WOLF, M. K., 1997).

Figura 1: Distribuição de AgO em isolados de ETEC procedentes de diferentes países. (WOLF, M. K., 1997). N – quantidade de amostras analisadas

Figura 2: Distribuição de AgH em isolados de ETEC procedentes de diferentes países. (WOLF, M. K., 1997). N – quantidade de amostras analisadas

Os sorogrupos mais comuns incluem O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O114, O115, O128ac, O148, O153, O159 e O167. A exemplo do que ocorre em outros grupos enteropatogênicos de *E. coli*, ETEC pertence a sorotipos específicos, alguns de ocorrência universal, como O6:H16, O8:H9, O25:H42, O27:H7, O29:H21, O78:H12, O128:H12, O148:H28 e O153:H45; enquanto que outros estão restritos a determinadas regiões geográficas. Contudo, uma maior diversidade de sorotipos tem sido observada em amostras produtoras apenas de LT-I (WOLF, 1997).

É interessante mencionar que apesar da diversidade de sorotipos de ETEC, alguns antígenos flagelares são característicos de alguns poucos sorogrupos, os quais geralmente estão associados aos fenótipos toxigênicos LT-I/ST-I e ST-I, encontrados em associação significativa com diarreia. Portanto, a identificação do antígeno flagelar de amostras de ETEC, auxilia e orienta em muitos casos a identificação do sorogrupo dessas amostras (GUTH et al., 1985, 1989; WOLF, 1997).

O método clássico de soroaglutinação utilizado na determinação do antígeno H é trabalhoso e demanda muito tempo, sendo realizado apenas em um pequeno número de laboratórios de referência. Esses isolados clínicos requerem inúmeras passagens através de ágar semi-sólido para induzir suas motilidades e, desta forma, expressar o antígeno H imunorreativo para poder proceder a soroaglutinação. Tal fato aumenta muito o tempo necessário para a determinação do antígeno flagelar, resultando um atraso em investigações epidemiológicas. Outro obstáculo do método clássico de soroaglutinação são as reações cruzadas entre determinados antígenos H que compartilham os mesmos epítomos (EWING, 1986). Todavia, alguns isolados de *E. coli* não são reativos com os antisoros de AgH disponíveis, impossibilitando a determinação desses antígenos flagelares. Além disso, um obstáculo considerável associado a sorotipagem convencional é o fato da proporção substancial de cepas de *E. coli* diarreiogênicas imóveis.

1.4. ESTRUTURA FLAGELAR

A motilidade bacteriana está associada à capacidade do microrganismo de produzir apêndices filamentosos na sua superfície. O flagelo tem origem na membrana da célula, estendendo-se de 15 a 20 µm da superfície celular. O arranjo e o número de flagelos na superfície da bactéria variam de espécie para espécie e podem depender das condições do crescimento bacteriano. A maioria das bactérias flageladas tem o seu flagelo localizado

extracelularmente, mas em espiroquetas, ele se localiza no espaço periplasmático, sendo constituído de um pacote ou feixe de fibrilas que se originam nos pólos da célula, abaixo de uma bainha externa, dando origem a um espiral ao redor da célula (MOENS et al., 1996; NORRIS et al., 1993).

Os flagelos extracelulares podem ser classificados em quatro categorias, quanto ao número e localização: monotríqueo (um flagelo polar), anfitríqueo (um flagelo em cada um dos polos), lofotríqueo (dois a seis flagelos em um ou ambos os polos) e peritríqueo (flagelos distribuídos por toda a superfície da membrana celular bacteriana). O flagelo consiste de um longo filamento helicoidal, dirigido por um motor giratório ancorado na membrana celular. Na maioria das bactérias, a estrutura básica do flagelo pode ser dividida em três partes morfológicamente distintas: corpo basal, gancho e filamento. A motilidade de cepas bacterianas flageladas provém da rotação do filamento flagelar externo (IINO, 1977; SILVERMAN & SIMON, 1977).

O sistema de genes flagelares é constituído de mais de 40 genes para a montagem, estrutura e função do flagelo. Eles estão organizados em vários *operons*, de acordo com sua função. Os genes são chamados de *flg*, *flh*, *fli* ou *flj*, de acordo com a região do cromossomo onde se encontram. A designação "fl" deve-se ao seu envolvimento na montagem e na função do flagelo (MacNab, 1992).

A expressão dos genes flagelares é controlada por um sistema regulatório hierárquico, composto de três níveis. No nível 1 há dois genes, *flhC* e *flhD*, necessários para a expressão dos genes do nível 2, que por sua vez, regulam a expressão dos genes do nível 3. Esse sistema hierárquico regulatório ocorre concomitantemente aos eventos de montagem do flagelo. Muitos genes do nível 2 codificam os componentes do corpo basal que são utilizados no início da montagem, enquanto os genes do nível 3 codificam os componentes do filamento (KOMEDA et al., 1986; KUTSUKAKE et al., 1990).

A proteína do filamento é codificada pelo gene *fliC* e o produto do gene *fliD* é responsável pela polimerização do filamento. Esses dois genes fazem parte do nível 3 (HUGHES et al., 1993).

Devido às porções terminais 5' e 3' dos genes que codificam a flagelina serem muito conservadas, elas são bons alvos para uma genérica reação em cadeia da polimerase (PCR). As seqüências conservadas de cada porção terminal do gene permitem a amplificação de uma extensão da cadeia dos alelos com um simples conjunto de iniciadores (REID et al., 1999).

O filamento é a porção externa do flagelo e funciona como um propulsor. Estruturalmente, é constituído por um tubo helicoidal delgado, de comprimento variável,

sendo em média dez vezes maior que o comprimento da célula (SILVERMAN & SIMON, 1977). Em muitas bactérias, o filamento é composto de repetidas subunidades de uma única proteína, a flagelina, que se polimeriza para formá-lo. Entretanto, existem algumas bactérias, como *Vibrio anguillarum* e *Bacillus thuringiensis*, em que o filamento é formado pela polimerização de múltiplas flagelinas (McGEE et al, 1996; LÖVGREN et al, 1993). Em *Helicobacter* sp e *Campylobacter* sp, duas subunidades distintas de flagelina (FlaA e FlaB) são requeridas para a sua motilidade (JOSENHANS et al., 1995).

O filamento cresce de forma polar, sendo alongado pela adição de flagelinas em sua extremidade. Esse tipo de crescimento pode ser explicado pelo fato dessas subunidades protéicas serem sintetizadas dentro da célula e depois transportadas ao longo do filamento por meio de uma cavidade central (ASAKURA et al., 1968). A estrutura normal do filamento tem 20nm de diâmetro e seu comprimento máximo depende das condições de cultura (geralmente é em torno de 16 a 22µm). Além das condições do meio, a forma do filamento depende da estrutura primária da flagelina (LINO et al., 1974).

A comparação das seqüências de aminoácidos de flagelinas de diferentes espécies bacterianas tem revelado um domínio estrutural peculiar. As regiões N-terminal e C-terminal dessas moléculas são muito conservadas em contraste com a região central heteróloga, que pode variar consideravelmente tanto na sua seqüência de aminoácidos quanto no seu tamanho (JOYS, 1988; MACNAB, 1992; WINSTANLEY, 1997). O domínio central é responsável pela variabilidade antigênica do flagelo enquanto que as regiões N e C-terminais pela estrutura do filamento (WEI & JOYS, 1985). O filamento do flagelo de *E. coli* é formado pela polimerização de uma única subunidade protéica (flagelina), codificada pelo gene *fliC* (MACNAB, 1992).

A flagelina da *E. coli* K12 é composta por 497 resíduos de aminoácidos (KUWAJIMA et al., 1986). Estudos genéticos com *Salmonella* sp (HOMMA et al., 1987; HORIGUCHI et al., 1975; YAMAGUCHI et al., 1984) e a análise da homologia padrão da seqüência de aminoácidos (GILL & AGABIAN, 1983; JOYS, 1985) sugerem que tanto a região N-terminal quanto a C-terminal da flagelina são importantes para a formação do filamento.

KUWAJIMA (1988) demonstrou que a construção de flagelinas menores pode formar filamentos, mesmo após sofrerem grandes deleções em suas regiões centrais. Verificou-se, nesse estudo, que variadas deleções introduzidas na região central da flagelina de *E. coli* não destruiu a capacidade de formação do filamento. Uma mutante cuja flagelina conservou somente a região N-terminal com 193 resíduos e a região C-terminal com 117 resíduos

conseguiu montar o filamento, sugerindo que essas regiões são domínios essenciais para a formação do mesmo.

1.5. DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS UTILIZANDO-SE PCR-RFLP

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

1.5.1. Polimorfismo de restrição do gene *fliC*

Uma técnica molecular muito utilizada para caracterizar o gene da flagelina é o polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Por essa técnica, o DNA de diferentes organismos pode ser diferenciado pela análise do tamanho dos fragmentos de DNA obtidos após digestão enzimática com endonucleases de restrição. Estas atuam em sequências específicas da dupla fita do DNA, chamadas sítios de restrição. A diferença das distâncias entre cada sítio de restrição para uma mesma endonuclease, em fitas de DNA distintas, gera a formação de diferentes tamanhos de DNA, chamados de fragmentos de restrição. Estes podem ser analisados após separação eletroforética em gel de agarose.

Diversas são as publicações científicas que relatam o uso do gene da flagelina para caracterizar e/ou identificar determinadas espécies bacterianas (AKOPYANZ et al., 1992; ALM et al., 1993; KILGER & GRIMONT, 1993; OYOFO & ROLLINS, 1993; RASMUSSEN et al., 1996; WINSTANLEY et al., 1996; FIELDS et al., 1997; DENNING et al., 1997; MACHADO et al., 1997; DAUGA et al., 1998; ZHANG et al., 2000; AMHAZ et al., 2001; COIMBRA et al., 2001; ANDRADE et al., 2002; SHI et al., 2002; BOTELHO et al., 2003)

OYOFO & ROLLINS (1993) utilizaram a região do gene *flaA* de *Campylobacter* para a detecção de *C. coli* e *C. jejuni* em amostras de água. A detecção foi possível com um alto grau de especificidade e sensibilidade em amostras de água em que a cultura dessas bactérias não foi possível. A amplificação pela técnica de PCR dos genes *flaA* e *flaB* foi usada para a detecção de *C. coli* e *C. jejuni* em amostras de fezes de galinha antes e após enriquecimento seletivo (RASMUSSEN et al., 1996).

Apesar da soroaglutinação ser o teste clássico para tipagem de *Salmonella*, todos os soros necessários para completar a sorotipagem não estão comercialmente disponíveis. Tal fato limita a tipagem completa deste gênero bacteriano, sendo esta possível apenas em Centros de Referências Nacionais. DAUGA et al. (1998) demonstraram que importantes antígenos flagelares do gênero *Salmonella* puderam ser deduzidos por PCR-RFLP.

DENNING et al. (1997) estudaram o gene da flagelina de *Pseudomonas fluorescens* com o propósito de obter um marcador estável para a detecção dessa bactéria. Os estudos realizados demonstraram que existe variação tanto no tamanho do gene da flagelina como nos sítios de restrição. Os autores acreditam que esta variação pode ser considerada uma boa marca para detecção de linhagens.

A análise da restrição do gene *fliC* foi utilizada para caracterizar cepas móveis ou imóveis de O157:H7. Utilizando o método de PCR-RFLP, FIELDS et al. (1997) mostraram que cepas STEC sorotipo O157:H⁻ possuíam o mesmo perfil de restrição do gene *fliC* de cepas STEC O157:H7. Além disso, demonstraram que a maioria das amostras investigadas; pertencentes a outros antígenos flagelares, que não H7; possuía perfis diferentes após digestão com a enzima *RsaI*, sugerindo a capacidade da PCR-RFLP em diferenciar molecularmente os diferentes sorotipos flagelares.

ZHANG et al. (2000), em seu estudo, submeteram 57 cepas de *E. coli* O26 à análise por PCR-RFLP, fazendo uso da enzima *RsaI*. As 57 cepas puderam ser agrupadas em dois perfis diferentes, sendo que 54 apresentaram perfil semelhante à cepa de referência H11 (inclusive cepas que anteriormente haviam sido determinadas por sorotipagem como pertencentes aos sorotipos H2, H8 e H21) e 3 apresentarem perfil semelhante à cepa de referência H32 (estas haviam sido determinadas anteriormente por sorotipagem como realmente pertencentes ao sorotipo H32). Para explicar a discrepância obtida entre os dois métodos, foi realizada uma nova sorotipagem e os resultados confirmaram o da tipagem molecular, mostrando um erro na primeira tipagem.

Em nosso laboratório, foi demonstrada a presença do gene da flagelina em sorotipos imóveis de EIEC pela reação da PCR (ANDRADE et al., 2002). Por PCR-RFLP, foram

observados diferentes polimorfismos de restrição, utilizando a endonuclease *RsaI*, que apresentou vantagens em relação a outras enzimas utilizadas. A confirmação da existência do polimorfismo para a flagelina de EIEC consiste em uma importante ferramenta para a tipagem desse grupo de bactérias, cujo gene que codifica a flagelina está presente, apesar de muitas vezes não ser funcional (ANDRADE et al., 2002; AMHAZ et al., 2001).

BOTELHO et al. (2003) demonstraram que a análise do gene *fliC* de *E. coli* pelo PCR-RFLP, utilizando-se a endonuclease *RsaI*, é uma boa ferramenta para a identificação do AgH de EPEC e não EPEC pertencentes a sorogrupos "O" de EPEC. Este estudo também mostrou que o PCR-RFLP é um bom método para a pesquisa e tipagem dos antígenos H de cepas imóveis de *E. coli* que possuem o gene para a flagelina mas não podem ser identificadas por sorotipagem.

Em vista da dificuldade encontrada na determinação de antígenos flagelares pela metodologia clássica de soroaglutinação, o desenvolvimento de técnicas moleculares para a identificação do antígeno H se faz necessário.

Este projeto tem então como objetivos identificar marcadores moleculares a partir do gene da flagelina de ETEC, pelo método de PCR-RFLP e avaliar a viabilidade desta técnica molecular na detecção e identificação de antígenos flagelares de *E. coli*. Os resultados obtidos deverão gerar conhecimentos que permitam auxiliar a identificação dos sorotipos de amostras de ETEC, além de outras linhagens de *E. coli*, pela caracterização molecular do gene *fliC* pela análise de seu polimorfismo de restrição.

Objetivos

2. OBJETIVOS

- ◆ Estudar a variação dos genes da flagelina entre os sorotipos móveis e imóveis de ETEC pelo seu polimorfismo de restrição.
- ◆ Identificar marcadores moleculares a partir do gene da flagelina para ETEC, pelo método de PCR-RFLP.
- ◆ Avaliar a viabilidade da técnica de PCR-RFLP na detecção e identificação de antígenos flagelares de *E. coli*.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CEPAS BACTERIANAS

Foram utilizadas 128 cepas de ETEC, dentre elas 102 pertencentes à coleção de culturas da Profa. Dra. Beatriz Ernestina Cabilio Guth (Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, Departamento de Microbiologia) e 26 pertencentes à coleção de culturas da Profa. Assoc. Marina Baquerizo Martinez (Universidade de São Paulo - FCF, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Laboratório de Microbiologia). Dentre essas cepas, 91 eram móveis e 37 eram imóveis. As características dessas cepas estão descritas nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Com a intenção de verificar a especificidade da PCR-RFLP na identificação de antígenos flagelares de *E. coli*, foram adicionadas ao estudo 100 cepas de *E. coli* (tabela 8), isoladas tanto de fezes diarreicas quanto normais, obtidas no Complexo Pediátrico Arlinda Marques, localizado na cidade de João Pessoa, Estado da Paraíba. Entre essas cepas, 22 eram ETEC e 78 pertenciam a outras categorias de *E. coli* diarreiogênicas, sendo EPEC e EAEC.

Para determinar os perfis de RFLP dos antígenos flagelares conhecidos (H1 a H56), foram estudadas cepas padrões de antígenos flagelares de *E. coli*, provenientes do Laboratório de Referência de *E. coli*, situado no Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Faculdade de Veterinária, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha e algumas cepas (H1, H3, H4, H12, H16, H17, H19, H21, H24, H33, H36, H39, H40, H41, H48, H53 e H54) provenientes do Instituto Adolf Lutz, São Paulo.

3.2. OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO

Colônias puras de cepas bacterianas foram cultivadas em 3mL de meio TSB (*Tryptone Soya Broth* - OXOID®) e incubadas por 18 horas sob agitação constante de 200rpm. Para a obtenção do DNA genômico, utilizou-se 1mL da cultura, que foi submetido ao protocolo de extração *Easy DNA Kit* (Invitrogen™). A quantificação do DNA e sua integridade foram verificadas através de eletroforese em gel de agarose 0,8% (item 3.4), comparando-se com um padrão de massa molecular conhecido (*High DNA Mass™ Ladder* - Invitrogen™). O gel foi corado com solução de brometo de etídio (Invitrogen™) na concentração final de 0,5µg/mL e as bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV).

3.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

O fragmento do gene *fliC* de *E. coli* foi amplificado por PCR de acordo com o protocolo desenvolvido por FIELDS *et al.* (1997), com algumas modificações. Os iniciadores empregados nesta reação foram os seguintes:

- Sense F-FLIC1, 5' ATG GCA CAA GTC ATT AAT ACC CAA C 3'
- Anti-sense R- FLIC2, 5' CTA ACC CTG CAG CAG AGA CA 3'

Utilizou-se um volume final de reação de 100µL, contendo, a princípio:

- 84ng de DNA genômico
- 0,3µM de cada iniciador
- 50µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 6,66 unidades de Taq DNA polymerase
- 10µL de 10X-PCR Buffer
- 2mM de MgCl₂

Todos os reagentes utilizados na preparação da PCR foram da Invitrogen™.

As reações foram amplificadas no termociclador Perkin-Elmer Gene Amp 2400 e suas condições foram as seguintes: um ciclo de 4 minutos a 95°C seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 2 minutos a 72°C. A reação foi concluída com um ciclo de

7 minutos a 72°C. O produto da reação foi armazenado a 4°C para a posterior análise de restrição.

Para as amostras nas quais o fragmento do gene *fliC* não foi amplificado com os iniciadores F-FLIC1 e R-FLIC2, utilizou-se o protocolo desenvolvido por MACHADO et al. (2000). Os iniciadores empregados nesta reação foram os seguintes:

- Sense F-1, 5' CAA GTC ATT AAT AC(A/C) AAC AGC C 3'
- Anti-sense R- 2, 5' GAC AT(A/G) TT(A/G) GA(G/A/C) ACT TC(G/C) GT 3'

Para um volume final de reação de 100µL, utilizou-se, a princípio:

- 84ng de DNA genômico
- 0,3µM de cada iniciador
- 200µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 6,66 unidades de Taq DNA polymerase
- 10µL de 10X-PCR Buffer
- 1,5mM de MgCl₂

As condições utilizadas para proceder a amplificação do gene foram as seguintes: um ciclo de 5 minutos a 94°C seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 2 minutos a 72°C. A reação foi concluída com um ciclo de 7 minutos a 72°C. O produto da reação foi armazenado a 4°C para a posterior análise de restrição.

3.4. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Para a visualização e análise do fragmento de DNA amplificado na reação da PCR, um gel de agarose foi preparado a 0,8% em tampão 0,5 X TBE (Trizma base - 890mM, EDTA - 25mM, ac. Bórico - 89mM). Para a verificação dos tamanhos dos produtos da PCR, alíquotas destas amostras, assim como um padrão de massa molecular conhecido (1Kb *DNA Ladder* - InvitrogenTM), misturados a uma solução tampão (azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol FF 0,25%; glicerol 30%) foram submetidas à separação eletroforética por cerca de 45 minutos a 100 volts. O gel foi corado e visualizado como descrito no item 3.2. A obtenção da imagem do gel está descrita no item 3.6.

3.5. ESTUDO DO POLIMORFISMO DE RESTRIÇÃO DO GENE *fliC* COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO

O estudo do polimorfismo do gene *fliC* foi realizado por meio da técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*), utilizando-se a enzima de restrição *RsaI* (InvitrogenTM), conforme instruções do fabricante (FIELDS et al., 1997).

A endonuclease *RsaI* foi escolhida para esse estudo devido ao seu maior poder de diferenciação entre alelos conhecidos (bandas obtidas da restrição enzimática) e entre os antígenos H1 e H12 (97% de homologia na sequência de DNA) (GenBank).

Para algumas amostras de *fliC*, também foi utilizada a endonuclease *HhaI* (Machado et al., 2000), conforme instruções do fabricante, com a finalidade de discriminar os genes *fliC* das diferentes cepas que obtiveram o mesmo perfil molecular.

3.5.1. Digestão do produto amplificado

O produto da PCR foi submetido à digestão enzimática, conforme o procedimento a seguir. Foram adicionados a 90µL do produto da PCR, 10µL de acetato de sódio 3M, pH 7,0 e 250µL de etanol absoluto gelado, seguido de uma incubação por 18 horas a -20°C. A amostra foi centrifugada a 23100g por 20 minutos, seu sobrenadante desprezado e o DNA sedimentado ressuspendido em 100µL de etanol 70% gelado. Uma nova centrifugação foi realizada a 14800g por 10 minutos, seu sobrenadante desprezado e o tubo contendo o DNA sedimentado foi deixado aberto para secar dentro do fluxo laminar. Após toda a evaporação do etanol, o DNA foi ressuspendido em 50µL de tampão TE (10mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM EDTA) e conservado a -20°C até o momento da digestão com a enzima.

Após esses procedimentos, o DNA foi submetido à digestão única nas seguintes condições:

- H ₂ O MilliQ estéril	- 6,2µL
- tampão da enzima	- 3µL
- endonuclease de restrição (Invitrogen [®])	- 0,8µL
- DNA	- 20µL

A amostra foi incubada durante 18 horas em banho-maria a 37°C e posteriormente submetida a uma separação eletroforética em gel de agarose 3%, por cerca de 3 horas, juntamente com um marcador de massa molecular conhecido (100pb *DNA Ladder* - InvitrogenTM). O gel foi corado e visualizado como descrito no item 3.4. A obtenção da imagem do gel está descrita no item 3.6.

3.6. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS DO DNA

Para a obtenção da imagem do gel de agarose (corado previamente com brometo de etídio) tanto fotográfica quanto digital, foi utilizado o sistema *Photodocumentation System* Modelo: DP-001.FDC Versão 10 (*Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée Cedex 1 - França*). A imagem fotográfica foi impressa pelo sistema *Video Graphic Printer UP-895CE* (SONY).

Após obtenção da imagem digital, os tamanhos dos fragmentos de DNA foram analisados através do programa *PhotoCaptMw* Versão 10.01 *for Windows*.

Dois fragmentos foram considerados idênticos quando o tamanho deles não diferia em 9 pares de bases. Fragmentos menores que 100pb não foram considerados na análise.

3.7. DETERMINAÇÃO DO ANTÍGENO FLAGELAR POR SOROAGLUTINAÇÃO

A determinação do antígeno flagelar pelo método clássico de soroaglutinação foi realizado segundo técnica preconizada por EWING (1986) em amostras de *E. coli* cujos antígenos H eram desconhecidos ou não eram condizentes com o perfil molecular.

O teste foi realizado no laboratório da Profa. Dra. Beatriz E. Cabilio Guth, Disciplina de Microbiologia da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, Departamento de Microbiologia, utilizando-se anti-soros provenientes do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*).

Tabela 1- Cepas de ETEC móveis, com AgO e AgH conhecidos

Antígeno O	Antígeno H	Número de isolados
O6	H16	14
O8	H9	3
	H32	1
O9	H21	2
O23	H16	2
O25	H42	2
O27	H7	4
O29	H21	4
O60	H21	2
O62	H19	1
O78	H12	10
O88	H25	3
O109	H19	1
O114	H21	1
O128	H7	4
	H12	10
	H21	3
	H27	2
O153	H45	3
O159	H4	2
	H21	2
	H45	1
rugosa	H2	1
rugosa	H8	1
rugosa	H9	1
NT	H8	2
NT	H9	2
NT	H12	1
NT	H18	2
NT	H25	2
NT	H42	1
NT	H45	1

NT - não tipável;

Tabela 2- Cepas de ETEC imóveis

Sorotipo	Número de isolados
O6:NM	1
O16:NM	1
O19:NM	1
O21:NM	1
O23:NM	1
O25:NM	1
O27:NM	4
O38:NM	1
O64:NM	1
O77:NM	1
O86:NM	1
O88:NM	2
O104:NM	1
O112:NM	1
O114:NM	1
O128:NM	2
O154:NM	3
rugosa:NM	1
NT:NM	12

NM- cepa imóvel

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. CEPAS PADRÃO DE *Escherichia coli* PARA PESQUISA DO ANTÍGENO FLAGELAR

4.1.1. Amplificação de *fliC* pela Reação em Cadeia da Polimerase

O fragmento de DNA relacionado ao gene *fliC* foi obtido pela técnica da PCR, de acordo com o protocolo descrito no item 3.3. O gene foi amplificado em 48 das 53 amostras procedentes da Universidade de Santiago de Compostela (USC). Para 5 amostras; H17, H25, H48, H53 e H54; nas quais o *fliC* não foi amplificado, as condições dos ciclos e as concentrações dos reagentes da PCR foram variadas, porém nenhuma amplificação foi observada. O protocolo desenvolvido por MACHADO et al. (2000) foi utilizado na tentativa de amplificar o *fliC* dessas amostras. O gene foi amplificado apenas para a amostra H25.

Cepas H17, H48, H53 e H54, procedentes do Instituto Adolf Lutz (IAL), foram então utilizadas para a obtenção do gene *fliC* por PCR. Os protocolos de FIELDS et al. (1997) e MACHADO et al. (2000) foram realizados, e o *fliC* foi amplificado apenas para o antígeno H48 (FIELDS et al., 1997).

Algumas amostras da USC (H24, H33, H36, H39 e H41) não confirmaram seus antígenos flagelares após sorotipagem, sendo pertencentes a sorotipos distintos daqueles as quais foram classificadas. Portanto, essas cepas foram substituídas por cepas padrão procedentes do IAL.

Os tamanhos dos fragmentos de DNA amplificados variaram aproximadamente de 1127 a 2600pb. Duas cepas apresentaram dois fragmentos amplificados, sendo estas pertencentes aos sorotipos H31 e H44. O tamanho molecular elevado do *fliC*_{H36} sugere uma sequência de inserção (SI) nesse gene.

Na tabela 3 pode ser observada a relação entre os antígenos flagelares e o tamanho do gene *fliC* amplificado pela reação da PCR.

4.1.2. Análise do gene *fliC* por RFLP

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram submetidos à digestão enzimática com a endonuclease *RsaI*. Os perfis moleculares foram designados com a letra "P" seguida de um número decimal, conforme tabela 3.

Nas figuras 3, 4, 5 e 6 encontram-se todos os perfis moleculares dos *fliC* das cepas padrão, utilizando-se a endonuclease *RsaI*.

A maioria dos perfis moleculares obtidos com os diferentes *fliC* apresentou-se único e singular. Entretanto, algumas amostras de diferentes cepas padrão demonstraram o mesmo perfil de restrição após digestão enzimática com *RsaI*. Para essas cepas, foram realizadas novas reações de RFLP utilizando-se a endonuclease *HhaI* (tabela 4).

Foi possível observar que houve discriminação do perfil molecular apenas entre as cepas H11 e H27 e as cepas H1 e H12 (figura 7), após digestão do *fliC* com *HhaI*. (tabela 4).

Tabela 3 – Relação entre os antígenos H, perfil de PCR-RFLP (*RsaI*), tamanho do *fliC* amplificado e número de pares de base dos fragmentos de RFLP das cepas padrão.

Cepa padrão	Perfil Molecular	Número de pares de base do <i>fliC</i> (pb)	Número de pares de bases dos fragmentos obtidos por RFLP (pb)
H1	P1	1785	742/ 421/ 290/ 165/ 136
H2	P2	1500	553/ 406/ 313/ 160/ 122
H3	P3	1616	385/ 336/ 304/ 294/ 160/ 150
H4	P4	1500	486/ 290
H5	P5	1300	1300
H6	P6	1587	513/ 414/ 321/ 218/ 153
H7	P7	1763	540/ 504/ 348/ 227/ 125
H8	P8	1500	714/ 315/ 286/ 170/ 147
H9	P9	1967	1118/ 313/ 296/ 159
H10	P10	1187	523/ 332/ 313
H11	P11	1500	544/ 284/ 171/ 145/ 125
H12	P1	1785	742/ 421/ 290/ 165/ 136
H14	P12	1555	613/ 556/ 422
H15	P13	1587	441/ 318/ 284/ 219
H16	P3	1616	385/ 336/ 304/ 294/ 160/ 150
H17	-	-	-
H18	P14	1677	757/ 561/ 201/ 112
H19	P15	1722	590/ 411/ 279/ 241/ 196
H20	P16	1690	379/ 313/ 286/ 222/ 189
H21	P17	1557	380/ 320/ 290/ 278/ 173/ 149
H23	P18	1619	475/ 285/ 274/ 204/ 132
H24	P19	1479	370/ 320/ 288/ 281/ 162/ 139
H25	P20	1361	930/ 298
H26	P21	1509	519/ 302/ 135
H27	P11	1500	544/ 284/ 171/ 145/ 125
H28	P22	1540	400/ 312/ 182/ 151
H29	P23	1187	375/ 329/ 300/ 167/ 101
H30	P24	1494	547/ 393/ 296/ 288/ 94
H31	P25	1465, 500	542/ 419/ 388/ 218/ 167
H32	P26	1720	749/ 516/ 315/ 121
H33	P27	1500	635, 397
H34	P28	1422	616/ 512/ 393
H35	P29	1255	538/ 388/ 315/ 304
H36	P30	2600	680, 542, 280, 206, 143, 102
H37	P31	1355	817/ 310/ 215/ 127/ 108
H38	P32	1252	307/ 179/ 163/ 148/ 142/ 109
H39	P33	1494	317, 284, 274, 209
H40	P34	1377	290/ 252/ 155
H41	P35	1494	621/ 485/ 258/ 202
H42	P36	1297	617/ 329/ 311
H43	P37	1422	403/ 360/ 305/ 295/ 133
H44	P38	1636, 904	715/ 600/ 500/ 333/ 295/ 212/ 128
H45	P39	1677	415/ 372/ 300/ 203/ 128/ 107/ 77
H46	P40	1584	461/ 310/ 286/ 240/ 192/ 107
H47	P41	1292	551/ 280/ 172/ 150
H48	P42	1300	604/ 456/ 283/ 81
H49	P43	1501	423/ 310/ 291/ 259/ 207/ 133
H51	P44	1601	346/ 291/ 248/ 232/ 195/ 142/ 133/ 101
H52	P45	1127	693/ 374/ 174
H53	-	-	-
H54	-	-	-
H55	P5	1300	1300
H56	P46	1300	910/ 302/ 98

(-) - cepa não amplificada por PCR; (pb) - pares de bases

Figura 3 – Perfil de restrição do gene *fliC* de 17 AgH de cepas padrão de *E. coli* pela técnica de PCR-RFLP utilizando-se a endonuclease *RsaI*.

M2 – padrão molecular de 100pb (Invitrogen®); P1: antígeno H1; P2: antígeno H2; P3: antígeno H3; P4: antígeno H4; P5: antígeno H5; P6: antígeno H6; P7: antígeno H7; P8: antígeno H8; P9: antígeno H9; P10: antígeno H10; P11: antígeno H11; P1: antígeno H12; P12: antígeno H14; P13: antígeno H15; P3: antígeno H16; P14: antígeno H18; P15a: antígeno H19.

Figura 4 – Perfil de restrição do gene *fliC* de 16 AgH de cepas padrão de *E. coli* pela técnica de PCR-RFLP utilizando-se a endonuclease *RsaI*.

M2 – padrão molecular de 100pb (Invitrogen®); P16: antígeno H20; P17a: antígeno H21; P18: antígeno H23; P19: antígeno H24; P20: antígeno H25; P21: antígeno H26; P11: antígeno H27; P22: antígeno H28; P23: antígeno H29; P24: antígeno H30; P25: antígeno H31; P26: antígeno H32; P27: antígeno H33; P28: antígeno H34; P29: antígeno H35; P31: antígeno H37.

Figura 5 – Perfil de restrição do gene *fliC* do AgH₃₆ de cepa padrão de *E. coli* pela técnica de PCR-RFLP utilizando-se a endonuclease *RsaI*.

M2 – padrão molecular de 100pb (Invitrogen®); P30: antígeno H36.

Figura 6 – Perfil de restrição do gene *fliC* de 16 AgH de cepas padrão de *E. coli* pela técnica de PCR-RFLP utilizando-se a endonuclease *RsaI*.

M2 – padrão molecular de 100pb (Invitrogen®); P32: antígeno H38; P33: antígeno H39; P34: antígeno H40; P35: antígeno H41; P36: antígeno H42; P37: antígeno H43; P38: antígeno H44; P39: antígeno H45; P40: antígeno H46; P41: antígeno H47; P42: antígeno H48; P43: antígeno H49; P44: antígeno H51; P45: antígeno H52; P5: antígeno H55; P46: antígeno H56.

Tabela 4 - Relação entre os antígenos H, perfil de PCR-RFLP (*Hha*I), tamanho do *fliC* amplificado e número de pares de base dos fragmentos de RFLP das cepas padrão pertencentes aos sorotipos H1, H3, H5, H11, H12, H16, H27 e H55.

Cepa padrão	Perfil Molecular	Número de pares de base do <i>fliC</i> (pb)	Número de pares de bases dos fragmentos obtidos por RFLP (pb)
H1	P1/A	1785	677, 398, 223, 172, 132, 88, 67
H3	P3/A	1616	1327, 1200, 1068, 220, 136, 74
H5	P5/A	1300	845, 772, 712, 207, 108, 85, 63
H11	P11/A	1500	457, 426, 298, 228
H12	P1/B	1785	629, 394, 221, 169, 111, 84, 62
H16	P3/A	1616	1327, 1200, 1068, 220, 136, 74
H27	P11/B	1500	383, 311, 298, 227, 153
H55	P5/A	1300	845, 772, 712, 207, 108, 85, 63

Figura 7 – Perfil de restrição do gene *fliC* de cepas padrão de antígeno flagelar pela técnica de PCR-RFLP utilizando-se a endonuclease *Hha*I.

M2 – padrão molecular de 100pb (Invitrogen®); cepa padrão de H1; cepa padrão de H12; cepa padrão de H11; cepa padrão de H27.

4.2. CEPAS DE ETEC MÓVEIS COM ANTÍGENOS O E H CONHECIDOS

4.2.1. Amplificação de *fliC* pela Reação em Cadeia da Polimerase

O gene da flagelina foi amplificado em 88 das 91 amostras estudadas. Entre as três cepas nas quais o gene *fliC* não foi amplificado estão 2 cepas O159:H4 e 1 cepa NT:H25. Para estas, as condições dos ciclos e concentrações dos reagentes da PCR foram variadas, porém nenhuma amplificação foi obtida. Foi utilizado outro par de iniciadores (MACHADO et al., 2000) para a amplificação do *fliC* dessas amostras, mas nenhum resultado foi obtido.

O tamanho dos fragmentos de DNA amplificados variou de aproximadamente 1.297 a 1.977pb. Todos foram fidedignos a cada sorotipo, ou seja, cepas que possuíam o mesmo antígeno flagelar obtiveram o mesmo tamanho de fragmento amplificado. Na tabela 5 pode ser observada a relação entre os antígenos flagelares e o tamanho do gene *fliC* obtido na reação da PCR.

Todas as cepas estudadas apresentaram um único fragmento amplificado, com exceção das cepas H8, onde foi observado um segundo fragmento (figura 8).

4.2.2. Estudo do Polimorfismo de Restrição do Gene *fliC* com a Endonuclease *RsaI*

Os polimorfismos de restrição do gene *fliC* foram estudados por meio da digestão enzimática com a endonuclease *RsaI*, conforme descrito no item 3.5.1. Os tamanhos dos fragmentos de DNA obtidos após o tratamento com a enzima de restrição foram determinados conforme descrito no item 3.6 e os valores obtidos podem ser observados na tabela 5.

Entre as 88 amostras móveis, observou-se 16 perfis moleculares. Foram estudados 14 tipos de antígenos flagelares: H2, H7, H8, H9, H12, H16, H18, H19, H21, H25, H27, H32, H42 e H45. Pode-se observar que cada antígeno flagelar gerou um perfil molecular único e singular, com exceção do antígeno H21, que apresentou três perfis de RFLP distintos (figura 9). Um destes mostrou-se idêntico ao perfil da cepa padrão H21 (P17) e dois mostraram perfis distintos, denominados de P17a e P17b. Assim sendo, com a metodologia de PCR-RFLP, utilizando-se a enzima de restrição *RsaI*, foi possível distinguir molecularmente cada um dos antígenos flagelares testados (figura 10).

O perfil molecular observado para as cepas H19 de ETEC (P15a) foi diferente do perfil obtido com a cepa padrão deste antígeno flagelar (P15). Desta forma, observamos uma diversidade genética para esse alelo.

No decorrer dos experimentos de PCR-RFLP, algumas discordâncias surgiram em relação ao antígeno flagelar determinado anteriormente por sorotipagem e o perfil molecular observado para algumas cepas. Desta forma, a similaridade do perfil de restrição da referida cepa relacionava-a a outro antígeno flagelar ou sugeria alguma diversidade genética do alelo dessa cepa. Para explicar a discrepância entre os resultados, realizou-se uma nova sorotipagem das cepas duvidosas com a finalidade de confirmar o antígeno flagelar das mesmas.

Como pode ser observado na tabela 6, os padrões de RFLP obtidos para as cepas 287 F/1 (159:H21), 124a (O128:H27), TR 2487 (NT:H4) e H 19/3 (R:H27) não estavam em concordância com o esperado. Após novos ensaios de soroaglutinação, todas elas apresentaram uma nova classificação flagelar, apresentando, desta forma, um perfil molecular condizente ao esperado. Com relação às amostras O114:H21 (P17a) e O60:H21 (P17b), seus antígenos flagelares foram confirmados por sorologia, demonstrando assim a diversidade genética do H21.

Tabela 5 – Relação entre os antígenos H, *fliC* e PCR-RFLP das cepas de ETEC com AgH conhecido.

Antígeno H	Número de pares de base do <i>fliC</i> (pb)	Perfil de RFLP (nº de amostras)	Número de pares de bases dos fragmentos obtidos por RFLP (pb)
H2	1500	P2 (1)	553/ 406/ 313/ 160/ 122
H7	1763	P7a (8)	540/ 504/ 348/ 227/ 125
H8	1500/ 1290	P8 (3)	714/ 315/ 286/ 170/ 147
H9	1967	P9 (6)	1118/ 313/ 296/ 159
H12	1785	P1 (21)	742/ 421/ 290/ 165/ 136
H16	1616	P3 (16)	385/ 336/ 304/ 294/ 160/ 150
H18	1677	P14 (2)	757/ 561/ 201/ 112
H19	1977	P15a (2)	629/ 591/ 280/ 244
H21	1557	P17 (9)	380/ 320/ 290/ 278/ 173/ 149
H21	1557	P17a (2)	382/ 320/ 290/ 227/ 173/ 149
H21	1576	P17b (3)	382/ 322/ 292/ 263/ 173/ 149
H25	1361	P20 (4)	1000/ 317
H27	1500	P11 (2)	544/ 284/ 171/ 145/ 125
H32	1720	P26 (1)	749/ 516/ 315/ 121
H42	1297	P36 (3)	617/ 329/ 311
H45	1677	P39 (5)	415/ 372/ 300/ 203/ 128/ 107/ 77

(pb) - pares de bases.

Tabela 6 - Confirmação do antígeno flagelar de amostras de ETEC, com AgH inicialmente conhecido, por sorotipagem.

Número da cepa	Sorotipo inicial	Padrão de RFLP	Confirmação do sorotipo
287 F/1	O159:H21	P39 (H45) ^a	O159:H45
124a	O128:H27	P7 (H7) ^a	O128:H7
TR 2487	NT: H4	P36 (H42) ^a	NT: H42
H19/3	R:H27	P9 (H9) ^a	R:H9
B 21-4	O114:H21	P17a (H21) ^a	O114:H21
TR 204/75	O60:H21	P17b (H21) ^a	O60:H21

a – antígeno flagelar correspondente; NT - não tipável; R - rugosa.

Figura 8 – Produto da PCR do gene *fliC* de amostras móveis de ETEC.

M1 – padrão molecular de 1Kb (Invitrogen®); antígeno H2 (Rugosa:H2); antígeno H7 (O128:H7); antígeno H8 (NT:H8); antígeno H9 (O8:H9); antígeno H12 (O78:H12); antígeno H16 (O6:H16); antígeno H18 (NT:H18); antígeno H19 (O62:H19); antígeno H21 (O128:H21); antígeno H21 (O159:H21); antígeno H21 (O60:H21); antígeno H25 (O88:H25); antígeno H27 (O128:H27); antígeno H32 (O8:H32); antígeno H42 (O25:H42); antígeno H45 (O153:H45).

Figura 9 – Perfil de restrição do gene *fliC* de três amostras de ETEC H21 pela técnica de PCR-RFLP utilizando-se a endonuclease *RsaI*.

M2 – padrão molecular de 100pb (Invitrogen®); P17: O128:H21; P17a: O159:H21; P17b: O60:H21

Figura 10 – Perfil de restrição do gene *fliC* de 16 AgH de ETEC pela técnica de PCR-RFLP utilizando-se a endonuclease *RsaI*.

M2 – padrão molecular de 100pb (Invitrogen®); P2: antígeno H2; P7a: antígeno H7; P8: antígeno H8; P9: antígeno H9; P1: antígeno H12; P3: antígeno H16; P14: antígeno H18; P15a: antígeno H19; P17: antígeno H21; P17a: antígeno H21; P17b: antígeno H21; P20: antígeno H25; P11: antígeno H27; P26: antígeno H32; P36: antígeno H42; P39: antígeno H45.

4.3. CEPAS DE ETEC IMÓVEIS

4.3.1. Amplificação de *fliC* pela Reação em Cadeia da Polimerase

Obtivemos amplificação do gene *fliC* em 34 das 37 cepas imóveis de ETEC, sendo que uma cepa de cada um dos sorotipos O19:NM, O38:NM e NT:NM não obtiveram seus genes amplificados mesmo utilizando-se outras condições experimentais na reação da PCR.

O tamanho dos fragmentos amplificados de *fliC* variou de 1187 e 4171pb, conforme tabela 7. Apenas um fragmento de DNA foi amplificado para cada cepa (figura 11).

Figura 11 – Produto da PCR do gene *fliC* de amostras imóveis de ETEC

M1 – padrão molecular de 1Kb (Invitrogen®); linha 2: NM-a (O27:NM); linha 3: NM-b (O112:NM); linha 4: NM-c (NT:NM); linha 5: NM-d (O154:NM); linha 6: NM-e (O114:NM); linha 7: NM-i (NT:NM); linha 8: NM-j (O6:NM); linha 9: NM-k (O77:NM); linha 10: NM-l (NT:NM); linha 11: NM-m (O128:NM); linha 12: NM-n (O88:NM); linha 13: NM-o (O86:NM).

4.3.2. Estudo do Polimorfismo de Restrição do Gene *fliC* com a Endonuclease *RsaI*

Após a análise dos perfis de RFLP das 34 cepas de ETEC imóveis, verificou-se que 25 delas apresentaram perfis de restrição pareados aos perfis obtidos com as cepas de ETEC cujos AgH eram conhecidos (item 4.2.2) e/ou aos perfis moleculares obtidos com as cepas padrão de AgH. Assim sendo, a metodologia de PCR-RFLP, utilizando-se a endonuclease *RsaI*, permitiu a caracterização do sorotipo dessas cepas imóveis (figura 12).

Duas cepas (NT:NM – NM-c) não apresentaram sítios de restrição para a endonuclease *RsaI* (tabela 7). O *fliC* destas cepas foi submetido à digestão enzimática com *HhaI* e o perfil molecular obtido foi idêntico ao perfil P5/A (H5 e H55) (figura 13).

Nove cepas não obtiveram identidade molecular com os AgH estudados. Nessas amostras, foram observados 2 tipos de perfis moleculares, sendo 5 P47 (NM-d) e 4 P48 (NM-f) (tabela 7) (figura 14). Devido ao não pareamento dos polimorfismos de restrição do *fliC* dessas amostras com os perfis das cepas com AgH conhecidos, essas não puderam ser caracterizadas quanto ao antígeno flagelar.

Tabela 7 – Relação entre os AgH, *fliC* e PCR-RFLP das cepas de ETEC imóveis

Sorotipo	Sorogrupo (n° de amostras)	Perfil de RFLP (AgH correspondente)	Número de pares de base do gene <i>fliC</i> (pb)	Número de pares de bases dos fragmentos obtidos por RFLP (pb)
NM-a	O27 (4)	P16 (H20)	1690	379/ 313/ 286/ 222/ 189
NM-b	O16 (1)			
	O88 (1)	P10 (H10)	1187	523/ 332/ 313
	O112 (1)			
	NT (1)			
NM-c	NT (2)	P5 (H5/H55)	1300	1300
NM-d	NT (1)	P47*	4171	595/ 387/ 362/ 340/ 311/ 295/ 276/ 225/ 203
	O64 (1)			
	O154 (3)			
NM-e	O114 (1)	P43 (H49)	1501	423/ 310/ 291/ 259/ 207/ 133
	rugosa (1)			
NM-f	O104 (1)	P48*		
	NT (3)			
NM-g	NT (1)	P24 (H30)	1494	547/ 393/ 296/ 288/ 94
NM-h	NT (1)	P34 (H40)	1377	290/ 252/ 155
NM-i	NT (1)	P1 (H1 ou H12)	1785	742/ 421/ 290/ 165/ 136
NM-j	O6 (1)			
	O21 (1)	P3 (H3 ou H16)	1616	385/ 336/ 304/ 294/ 160/ 150
	O23 (1)			
	O25 (1)			
NM-k	O77 (1)	P14 (H18)	1677	757/ 561/ 201/ 112
NM-l	NT (1)	P15 (H19)	1977	629/ 591/ 280/ 244
NM-m	O128 (2)	P17a (H21)	1557	382/ 320/ 290/ 227/ 173/ 149
NM-n	O88 (1)	P20 (H25)	1361	930/ 298
NM-o	O86 (1)	P26 (H32)	1720	749/ 516/ 315/ 121

* perfis moleculares distintos e únicos, sem pareamento com os perfis dos AgH estudados.

Figura 12 – Comparação do perfil de RFLP do gene *fliC* entre cepas móveis e imóveis de ETEC.

M2 – padrão molecular de 100pb (Invitrogen®); NM-i: (NT:NM); P1 (O128:H12); NM-j: (O6:NM e O23:NM); P3: (O6:H16); NM-k: (O77:NM); P14: (NT:H18); NM-l: (R:NM); P15: (O62:H19); NM-m: (O128:NM); P17: (O128:H21); NM-n: (O88:NM); P20: (O88:H25); NM-o: (O86:NM); P26: (O8:H32).

Figura 13 – Comparação do perfil de RFLP do gene *fliC*, após digestão com *HhaI*, de cepas que não apresentaram sítios de restrição para *RsaI*.

M2 – padrão molecular de 100pb (Invitrogen®); 1- NM-c: (NT:NM) (P5/A); 2- cepa padrão de H5 (P5/A); 3- cepa padrão de H55 (P5/A).

Figura 14 – Perfil de restrição do gene *fliC* de amostras imóveis de ETEC pela técnica de PCR-RFLP utilizando-se a endonuclease *RsaI*.

M2 – padrão molecular de 100pb (Invitrogen®); P47: NM-d (NT:NM, O64:NM, O154:NM); P48: NM-f (NT:NM, O104:NM).

4.4. CARACTERIZAÇÃO DO *fliC* PELA TÉCNICA DE PCR-RFLP EM AMOSTRAS DE *E. coli* COM ANTÍGENOS O E H PREVIAMENTE DESCONHECIDOS

Com o objetivo de verificar a especificidade da PCR-RFLP na identificação de antígenos flagelares de *E. coli*, 100 amostras, cujos antígenos O e H eram previamente desconhecidos, foram estudadas, conforme. Essas amostras foram designadas de amostras teste. Seus antígenos O e H foram determinados, posteriormente à determinação do perfil do *fliC*, no IAL pelo método padrão de soroaglutinação.

Igualmente às demais amostras de ETEC, as amostras teste foram submetidas à metodologia de PCR-RFLP. O gene da flagelina foi amplificado em 88 das 100 amostras testadas. Para as 12 cepas nas quais o gene *fliC* não foi amplificado as condições dos ciclos e concentrações dos reagentes da PCR foram variadas, porém nenhuma amplificação foi observada (tabela 8). Embora outro par de iniciadores tenha sido utilizado (MACHADO et al., 2000) na tentativa de amplificar o *fliC* dessas cepas, nenhum resultado foi obtido.

Para todas as cepas teste, exceto as amostras NT:H26 (1 amostra), O99:H17 (2 amostras), O142:H17 (1 amostra) e NT:H17 (1 amostra), a tipagem molecular do antígeno

flagelar através da caracterização do *fliC* por PCR-RFLP foi concordante com a determinação do AgH pelo método clássico de soroaglutinação (tabela 8). NT:H26 (AgH determinado por soroaglutinação) apresentou um perfil molecular distinto de todos os perfis obtidos durante este estudo, mostrando polimorfismo deste alelo.

Desta forma, o método mostrou 94,3% de sensibilidade e 100% de especificidade na determinação do antígeno flagelar de *E. coli* (83 AgH identificados em 88 *fliC* amplificados). Porém, se levarmos em conta as cepas que não tiveram seus *fliC* amplificados, a sensibilidade do método, em nosso estudo, foi de 83% (83 AgH identificados em 100 amostras testadas).

Tabela 8- Cepas de *E. coli* com AgO e AgH inicialmente desconhecidos.

Número de amostras	<i>fliC</i> (PCR-RFLP) <i>RsaI</i> ; <i>HhaI</i>	Antígeno H (sorotipagem)
5	P1, P1a	H1
21	P2	H2
3	-	H2
2	P4	H4
1	-	H4
2	P5; P5/A	NT
1	P6	H6
6	P7a	H7
2	-	H7
4	P10	H10
1	P11; P11/A	H11
1	P1; P1/B	H12
2	P13	H15
7	P3; P3/A	H16
2	-	H16
4	*	H17
10	P14	H18
1	-	H18
2	P15a	H19
2	P17	H21
2	P20	H25
1	-	H25
1	*	H26
1	P11; P11/B	H27
1	P24	H30
3	P27	H33
2	P34	H40
1	P39	H45
3	P40	H46
3	P43	H49
2	-	NT

* Perfil de restrição distinto de todos os obtidos neste estudo. Assim, o AgH não pode ser identificado pela PCR-RFLP; (NT) - não tipável; (-) - cepas que não obtiveram produto de amplificação na PCR: NT:NT (2), O55:H2, O119:H2, O126:H2, O159:H4, NT:H7, O103:H7, O6:H16 (2), O73:H18, O3:H25.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Os genes da flagelina têm sido muito utilizados para detecção e identificação de bactérias devido às variações genéticas entre espécies (WHITTAM, 1995). Por causa de sua estrutura dominial, esses genes são ideais para serem amplificados na reação da PCR. Essa característica tem levado ao desenvolvimento de inúmeras aplicações baseadas na amplificação desses genes.

Por muitos anos, o principal método de identificação de cepas de *E. coli* patogênicas tem sido a sorotipagem O:H, baseada na presença do antígeno O, lipopolissacáride de superfície celular, e do antígeno flagelar H (EWING, W. H., 1986).

Pelo fato de se tratar de um marcador de virulência, torna-se importante a realização da tipagem do AgH. Esta tipagem, realizada pelo método tradicional de sorotipagem, esbarra em uma série de problemas. O método é trabalhoso e demorado, pois alguns isolados clínicos requerem inúmeros subcultivos em ágar semi-sólido, para expressar o antígeno H imunorreativo. Outros fatores contribuem para as dificuldades encontradas na execução da sorotipagem, a saber: reações cruzadas entre determinados antígenos H que compartilham os mesmos epítomos (EWING, W. H., 1986), amostras de *E. coli* não reativas com os antisoros de AgH disponíveis e a proporção substancial de cepas de *E. coli* diarreio gênicas imóveis.

O AgH de *E. coli* é constituído por uma subunidade estrutural única, flagelina, codificada pelo gene *fliC* (MacNab, 1992). Estão descritos 53 tipos de AgH (H1 a H56) que, combinados com o AgO, podem estar associados com clones bacterianos que causam doenças específicas.

Primeiramente, com a intenção de conhecer os perfis moleculares de todos os antígenos flagelares de *E. coli*, a técnica de PCR-RFLP foi aplicada às cepas padrão, utilizadas para obtenção de anticorpos anti AgH dessa espécie bacteriana. Das 53 cepas padrão de AgH, o *fliC* foi amplificado em 50 cepas. O tamanho dos fragmentos amplificados variou de 1127 a 2600pb. O tamanho do gene *fliC* de *E. coli* K-12 é de 1700pb (KUWAJIMA, 1988). Esse autor mostrou em seu estudo que, conservando-se as regiões C e N-terminais do *fliC*, a flagelina pode ser construída com sucesso, independente das alterações que a região central do gene possa sofrer. Em vista disso, inserções de pares de bases nesta região não

implicariam falhas na montagem do filamento bacteriano. Portanto, após amplificação dos genes que sofreram inserção de nucleotídeos, o tamanho do fragmento amplificado foi maior do que o esperado. Esse resultado pode ser observado em algumas das cepas padrões utilizadas em nosso estudo. Pôde-se observar que inserções no *fliC* são facilmente perpetuadas após divisão bacteriana; sendo assim, ele pode ser um bom marcador para rastreamentos epidemiológicos.

As cepas padrão H17, H53 e H54 não apresentaram produtos de amplificação após reação da PCR, mesmo variando-se os iniciadores e as condições da reação. Como as regiões 5' e 3' do *fliC* são bastante conservadas e essenciais para a amplificação do gene, esse dado sugere que essas cepas sofreram alguma mutação nestas regiões.

Das 50 cepas que amplificaram o *fliC*, foram obtidos 46 diferentes perfis moleculares, após digestão enzimática do gene com *RsaI*. Dúvidas surgiram em relação ao AgH de algumas cepas padrão procedentes da USC, cujos *fliC* apresentavam mesmo perfil molecular quando submetidos à digestão enzimática com *RsaI*. Quando o AgH dessas amostras eram confirmados por sorologia (H1, H3, H5, H11, H12, H16, H27 e H55), a endonuclease *HhaI* foi utilizada na tentativa de diferenciação entre os AgH (MACHADO et al., 2000). Somente as amostras H1, H12 e H11, H27 foram discriminadas. Além dessas, as cepas H24, H33, H36, H39 e H41 não confirmaram seus antígenos flagelares após sorotipagem e, portanto, foram substituídas por cepas procedentes do IAL.

Erros de sorotipagem também foram observados por ZHANG et al. (2000), em seu estudo. Esses autores, assim como nós, tiveram dúvidas da tipagem sorológica do AgH de cepas que após análise de seus *fliC* pela PCR-RFLP, mostraram divergência entre o perfil molecular obtido e o resultado da sorotipagem do AgH. As cepas que apresentaram resultados duvidosos tiveram seu AgH novamente sorotipados. O resultado da nova sorologia confirmou o perfil molecular obtido.

Dados como esses refletem alguns dos problemas do método clássico de soroaglutinação para determinação do antígeno flagelar de *E. coli*. Os erros de sorotipagem podem estar relacionados a vários fatores, tais como: (I) troca de amostras bacterianas durante o procedimento laboratorial; (II) detecção da aglutinação, pois esta é instável, sendo facilmente desagregada após agitação; (III) obtenção de bons soros hiperimunes, uma vez que alguns devem ser adsorvidos a fim de se evitar reações cruzadas.

Alguns dos nossos resultados foram discordantes com os publicados por MACHADO et al. (2000), uma vez que esses autores alegaram que a enzima *HhaI* é capaz de discriminar

todos os AgH de *E. coli* pela PCR-RFLP, exceto os antígenos H12 e H45. Em nosso estudo, utilizando-se *RsaI*, os *fliC* referentes a esses dois AgH apresentaram perfis distintos.

Comparando nossos perfis (*HhaI*) com os obtidos por MACHADO et al. (2000), verificamos que alguns deles eram semelhantes, diferenciando-se apenas por uma ou duas bandas a mais, que foram observadas em nossas cepas. Essas discrepâncias provavelmente aconteceram devido às diferentes condições eletroforéticas entre esses dois estudos. MACHADO et al. (2000) utilizaram gel de agarose a 2%, 5h a 4,8V/cm. Pela experiência adquirida durante nosso estudo, podemos afirmar que não é recomendável utilizar concentrações menores que 3% de agarose, independente da voltagem utilizada durante a separação eletroforética, uma vez que a malha do gel formada não possuiria capacidade de discriminar fragmentos de tamanhos muito próximos. É evidente a importância da padronização das condições eletroforéticas da RFLP para se obter resultados reprodutíveis.

Analizando os perfis moleculares dos *fliC* referentes às cepas H2 e H35, observamos que eles apresentaram-se distintos. BOTELHO et al. (2003) observaram a ocorrência de perfis de RFLP comuns para esses mesmos sorotipos, sendo diferenciados, então, pela metodologia de SSCP. FIELDS et al. (1997) encontraram tanto perfis comuns quanto distintos para os *fliC* desses AgH. Em vista dos resultados obtidos, sugerimos a presença de polimorfismo em pelo menos um desses alelos.

FIELDS et al. (1997) observaram tanto perfis comuns como distintos para os alelos H2, H35 e H47. MACHADO et al. (2000) encontraram polimorfismo molecular somente para o alelo *fliC*_{H47}. Em nosso estudo, o perfil molecular observado para o *fliC* da cepa padrão de AgH₄₇ foi diferente do observado para os das cepas padrão AgH₂ e AgH₃₅. Esses dados mostram a existência de diversidade genética do alelo H47.

Um dos objetivos desse trabalho foi estudar a variação dos genes da flagelina entre os sorotipos móveis e imóveis de ETEC pelo seu polimorfismo de restrição. Nossos resultados revelaram que há variações moleculares entre os *fliC* dos diferentes sorotipos e não foi observada nenhuma similaridade molecular entre os diferentes alelos das cepas móveis. Com esses dados, pudemos, então, identificar marcadores moleculares para cepas móveis e imóveis de ETEC a partir do gene *fliC*.

Após análise dos padrões de restrição obtidos para as cepas móveis de ETEC, observamos, também, para algumas delas, uma discrepância na determinação do AgH pelas técnicas de PCR-RFLP e sorotipagem clássica. Após nova soroaglutinação, todas essas cepas apresentaram uma nova classificação flagelar, compatível com o método molecular.

O *fliC* de cada isotipo flagelar estudado apresentou perfil molecular único e singular, exceto os correspondentes ao H21, que apresentaram três perfis moleculares distintos, porém diferentes dos outros perfis encontrados. Um destes perfis foi idêntico ao perfil P17, correspondente à cepa padrão H21. Portanto, foi observada uma diversidade genética para esse alelo.

Cepas de ETEC pertencentes aos sorotipos H7 e H19 apresentaram perfis de RFLP distintos dos perfis obtidos para as cepas padrão de mesmo AgH. A diversidade genética do *fliC*_{H19} também foi observada por MACHADO et al. (2000), onde foram encontrados 3 diferentes perfis moleculares, após digestão enzimática dos *fliC* com *HhaI*. FIELDS et al. (1997) observaram um polimorfismo do *fliC*_{H7}, encontrando quatro perfis distintos, classificados como padrões A, B, C ou D. O perfil obtido para todas as cepas H7 de ETEC foi igual ao padrão B desses autores. BOTELHO et al. (2003), por sua vez, encontraram em seu estudo os padrões A e B. A cepa padrão de AgH₇, utilizada em nosso estudo, apresentou um perfil similar ao padrão C de FIELDS et al. (1997).

Os demais perfis moleculares observados para as cepas móveis de ETEC foram idênticos aos perfis apresentados pelas cepas padrão de AgH correspondentes, sem apresentarem polimorfismo dentro desta categoria de *E. coli* diarreiogênica, com exceção do AgH₂₁.

A maioria das cepas imóveis de ETEC apresentou perfis de RFLP idênticos aos perfis de algumas cepas móveis e/ou aos perfis observados para as cepas padrão de AgH, enfatizando a capacidade da PCR-RFLP em classificar cepas imóveis de *E. coli* quanto ao gene da flagelina que carregam. Pela metodologia clássica de soroaglutinação para determinação de AgH, essa classificação não é possível. FIELDS et al. (1997) e BOTELHO et al. (2003) também fizeram uso da PCR-RFLP para determinar o isotipo de *fliC* das cepas imóveis estudadas por esses autores.

Nove cepas imóveis de ETEC [P47 - NM-d (5) e P48 - NM-f (4)] não puderam ser classificadas quanto ao gene *fliC*, pois seus perfis moleculares não foram similares a nenhum perfil observado durante nosso estudo. O *fliC* amplificado para as cepas NM-d apresentou um tamanho molecular muito elevado (4171pb), sugerindo uma grande inserção de nucleotídeos nesses genes. Uma vez que não obtivemos amplificação do *fliC* das cepas padrão H17, H53 e H54, as cepas que apresentaram o perfil P48 podem estar relacionadas a um desses AgH ou a algum outro AgH que possua diversidade genética, não detectada nas cepas estudadas em nosso trabalho.

Duas cepas NM (NM-c) não apresentaram sítios de restrição para a endonuclease *RsaI*. Portanto, o *fliC*_{NM-c} foi submetido à digestão enzimática com *HhaI* e o perfil obtido foi idêntico ao perfil P5/A, referente aos antígenos flagelares H5 e H55. Portanto, essa cepa pôde ser classificada quanto ao gene *fliC*.

Comparando nossos resultados com a literatura (FIELDS et al., 1997, ZHANG et al., 2000; BOTELHO et al., 2003), observamos uma fidelidade do perfil de restrição dos diferentes alelos de *fliC*, independente da categoria diarreio gênica de *E. coli*, sendo que a maioria dos perfis moleculares obtidos para cepas de ETEC foram iguais aos perfis observados para cepas não ETEC com mesmos antígenos flagelares.

Assim como observado em nosso estudo, MACHADO et al. (2000) e BOTELHO et al. (2003) também observaram polimorfismo para o *fliC*_{H21}. MACHADO et al. (2000) encontraram 4 perfis de RFLP para o AgH₂₁, utilizando a endonuclease *HhaI* na digestão dos *fliC*. BOTELHO et al. (2003) encontraram dois perfis de RFLP para esse mesmo AgH, sendo P21a e P21b. Relacionando esses resultados com os obtidos em nosso estudo, observamos que os nossos perfis P17b e P17 foram iguais aos perfis P21a e P21b, respectivamente, de BOTELHO et al. (2003).

BOTELHO et al. (2003) também observaram polimorfismos para os *fliC* correspondentes aos antígenos H9 (P9a, P9b), H18 (P18a, P18b), H34 (P34a, P34b) e H40 (P40a, P40b). Em nosso estudo, observamos, para ETEC, os perfis P9b (nosso P9) e P18a (nosso P14). É interessante mencionar que os perfis de RFLP dos alelos *fliC*_{H9} e *fliC*_{H18} de ETEC foram iguais aos observados para as cepas padrão de AgH.

O perfil P40b de BOTELHO et al. (2003) foi muito similar ao nosso perfil P17a, correspondente ao antígeno flagelar H21. Tal dado sugere duas possibilidades: (I) determinados clones com antígenos flagelares H21 e H40 não poderão ser discriminados por PCR-RFLP, utilizando-se a endonuclease *RsaI*; (II) é possível que a cepa utilizada por esses autores esteja erroneamente sorotipada, uma vez que 5 cepas H40 foram estudadas e somente uma apresentou o perfil P40b.

Para ETEC, todas as cepas pertencentes ao sorotipo H45 (3) apresentaram um único perfil molecular. FIELDS et al. (1997). encontraram polimorfismo para o antígeno H45, observando dois perfis de RFLP distintos, sendo um deles similar ao observado em nosso estudo.

MACHADO et al. (2000), após digestão dos *fliC* com *HhaI*, encontraram variedade genética para os alelos H2 (3 genotipos), H4 (3 genotipos), H8 (2 genotipos), H9 (2

genotipos), H19 (3 genotipos), H21 (4 genotipos), H25 (3 genotipos), H31 (2 genotipos) e H47 (2 genotipos).

Os estudos relacionados com o gene da flagelina de *E. coli* por PCR-RFLP foram todos analisados após conhecimento prévio dos antígenos flagelares das amostras (FIELDS et al., 1997; ZHANG et al., 2000; MACHADO et al., 2000; BOTELHO et al., 2003). Portanto, com a finalidade de verificar a eficiência dessa metodologia na determinação de AgH, estudamos 100 cepas de *E. coli* diarreiogênicas (EPEC, ETEC e EAEC) sem o conhecimento prévio de seus sorotipos (chamadas de amostras teste). O gene da flagelina foi amplificado em 88 das 100 amostras. Os 88 amplicons foram submetidos ao RFLP com a endonuclease *RsaI*.

Uma vez que os perfis moleculares da maioria dos AgH eram conhecidos, as amostras testes puderam ser analisadas comparando seus perfis moleculares com os perfis obtidos com as cepas padrão e com as cepas móveis de ETEC. Uma classificação foi inferida para cada cepa (tabela 8). Após identificação do antígeno flagelar pela metodologia clássica de soroaglutinação, comprovamos a eficiência da tipagem molecular, uma vez que o método mostrou 94,3% de sensibilidade e 100% de especificidade, sem levarmos em conta as cepas que não tiveram os seus *fliC* amplificados. Se assim fosse, a sensibilidade do método seria de 83%.

Apenas as cepas pertencentes aos sorotipos H17 (4 amostras) e H26 (1 amostra) não puderam ser tipadas por PCR-PFLP, em nosso estudo. Como não obtivemos amplificação do *fliC*_{H17} da cepa padrão de AgH, não tínhamos padrão de restrição para compararmos o perfil obtido para as amostras teste pertencentes a esse sorotipo. Contudo, o perfil observado para as cepas teste H17 foi único e singular, diferenciando-o dos outros perfis moleculares desse estudo. O perfil molecular observado para a amostra teste H26 foi diferente do obtido para a cepa padrão deste AgH. Entretanto, esse perfil foi único e singular, não classificando essa cepa a nenhum outro AgH. Podemos, então, sugerir um polimorfismo do alelo H26.

Um problema detectado na metodologia da PCR-RFLP é a possibilidade da ausência de amplificação do gene *fliC* de algumas amostras, como pôde ser observado durante o presente estudo. Para essas amostras, a determinação do AgH deve ser realizada pelo método clássico de soroaglutinação. Outra falha dessa metodologia é a variabilidade genética presente em alguns alelos, que se não forem todas detectadas, podem resultar na falta de perfis moleculares para comparação e classificação do AgH, como observado para a amostra teste H26 do nosso estudo.

Perfis moleculares comuns entre diferentes sorotipos, para uma mesma endonuclease, também são uma falha da metodologia molecular avaliada. O uso de diferentes enzimas de

restrição pode ser uma alternativa à essa dificuldade. Entretanto, mesmo utilizando-se diferentes enzimas, determinados *fliC*, pertencentes a diferentes sorotipos, podem não ser discriminados. Como alternativa, a identificação do AgH deve ser procedida pelo método clássico de soroaglutinação.

É interessante mencionar que, após identificação pela PCR-RFLP do antígeno flagelar das amostras teste pertencentes à categoria ETEC, a determinação do antígeno somático pôde ser direcionada, diminuindo, assim, o número de anti-soros utilizados para a pesquisa do AgO. O conhecimento prévio do antígeno flagelar, não só de ETEC, mas também das outras categorias de *E. coli* diarreiogênicas, auxilia e orienta a identificação do sorogrupo dessas amostras, uma vez que elas pertencem a sorotipos específicos de virulência.

O método de PCR-RFLP é mais rápido na identificação do AgH de *E. coli* (2 a 3 dias) em comparação com a sorologia clássica (7 ou mais dias, dependendo da motilidade da cepa).

Neste estudo, mostramos a possibilidade de identificação dos AgH de ETEC pela caracterização molecular do gene *fliC* pela análise de seu polimorfismo de restrição. Além de cepas móveis, isolados imóveis também podem ser caracterizados por esse método molecular.

A alta tipabilidade da PCR-RFLP foi comprovada por meio de sua aplicação não só a amostras de ETEC com AgH previamente desconhecidos, mas também a outras linhagens de *E. coli*.

Acreditamos que o método de soroaglutinação para determinação do AgH será substituído rapidamente pela PCR-RFLP. Contudo, a soroaglutinação não poderá ser totalmente dispensada em curto prazo. No futuro, com o perfil molecular obtido dos alelos de cepas procedentes de estudos epidemiológicos, novos padrões serão definidos para as cepas diarreiogênicas de *E. coli*, permitindo o abandono da sorologia para AgH.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Nossos estudos permitiram concluir que:

- ◆ O método de PCR-RFLP possui alta especificidade para determinação do antígeno flagelar de *E. coli*.
- ◆ A determinação do AgH de *E. coli* é muito mais rápida pelo método de PCR-RFLP do que pela sorotipagem.
- ◆ O *fliC* de cepas imóveis de *E. coli* pode ser caracterizado pela PCR-RFLP.
- ◆ Para um mesmo fenótipo sorológico de AgH podem ser encontrados diferentes alelos.
- ◆ *fliC* de ETEC mostrou um único alelo para cada antígeno flagelar, com exceção do H21, permitindo a sua identificação pela análise de seu polimorfismo de restrição, utilizando-se a endonuclease *RsaI*.
- ◆ O conhecimento prévio do AgH auxilia e orienta a identificação dos sorogrupos de ETEC.
- ◆ Na ausência de perfis moleculares para comparação, o método clássico de soroaglutinação deve ser utilizado para caracterização do AgH.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKOPYANZ, N. et al. PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 20, p. 6221-6225, 1992.

ALBERT, M. J. et al. Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 33, p. 937-977, 1995.

ALM, R. A.; GUERRY, P.; TRUST, T. J. Distribution and polymorphism of the flagellin genes from isolates of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 175, p. 3051-3057, 1993.

ALMEIDA, M. T. G. et al. Enteropatógenos associados com diarreia aguda em crianças. **J. Pediatr.**, Rio de Janeiro, v. 74, p. 291-298, 1998.

AMHAZ, J. M. K. et al. The EIEC flagelin gene as a biomarker for epidemiological analysis. In: GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 101TH, 2001, Orlando. ASM 101th General Meeting. Washington: ASM Press, 2001.

ANDRADE, A. et al. Flagella expression by non-motile serotypes of enteroinvasive *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 70, p. 5882-5886, 2002.

ASAKURA, S. G.; EGUCHI, G.; LINO, T. Unidirectional growth of *Salmonella* flagella in vitro. **J. Mol. Biol.**, London, v. 35, p. 227-236, 1968.

BHAN, M. K. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 159, p. 1061-1064, 1989.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) - NBR 6023/2000.

BOTELHO, B. A. et al. Identification of EPEC na non-EPEC serotypes in the EPEC O serogroups by PCR-RFLP analysis of the *fliC* gene. **J. Microbiol. Methods**, v. 54, p. 87-93, 2003.

CAMPOS, J. V. M. Diarréias. In: Dani, Renato; Castro, L.D. **Gastroenterologia Clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1993. Cap. 54, p. 788-801.

CHAO, K. L.; DREYFUS, L. A. Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells. **Infect. Immun.**, Washington, v. 65, p. 3209-3217, 1997.

COIMBRA, R. et al. Clonal relationships among *Shigella* serotypes suggested by cryptic flagellin gene polymorphism. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, p. 670-674, 2001.

DAUGA, C.; ZABROVSKAIA, A.; GRIMONT, P. A. D. Restriction fragment lenght polymorphism analysis of some flagellin genes of *Salmonella enterica*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 36, n.10, p. 2835-2843, 1998.

DENNING, N. et al. The flagellin gene as a stable marker for detection of *Pseudomonas fluorescens* SBW25. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 24, p. 198-202, 1997.

DRASAR, B. S., HILL, M.J. Human intestinal flora: the distribution of bacterial flora in the intestine. London: Academic Press, 1974. p. 36-43.

ECHEVERRIA, P. et al. Case-control study of endemic diarrheal disease in Thai children. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 159, p. 543-548, 1989.

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

FERNANDES FILHO, A. et al. Perfil epidemiológico das diarréias infecciosas agudas infantis na cidade de João Pessoa - PB. **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v. 5, p. 132, 2001.

FIELDS, P. I. et al. Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and a development of a PCR- restriction fragment length polymorphism test for identification of *E. coli* O157:H7 and O157:NM. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 35, n. 5, p. 1066-1070, 1997.

- GILL, P. R.; AGABIAN, N. The nucleotide sequence of the $M_r = 28,500$ flagellin gene of *Caulobacter crescentus*. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 258, p. 7395-7401, 1983.
- GOMES, T. A. T. et al. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 164, p. 331-337, 1991.
- GUERRANT, R. L.; KIRCHHOFF, L. V. Prospective study of diarrheal illnesses in northeastern Brazil: patterns of disease, nutritional impact, etiologies and risk factors. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 7, p. 753-759, 1983.
- GUTH, B. E. C. Enterotoxigenic *Escherichia coli* – an overview. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 1, p. 95-97, 2000.
- GUTH, B. E. C. et al. Enterotoxin production, presence of colonization factor antigen I, and adherence to HeLa cells by *Escherichia coli* 0128 strains belonging to different O subgroups. **Infect. Immun.**, Washington, v. 47, p. 338-340, 1985.
- GUTH, B. E. C. et al. Virulence factors and biochemical characteristics of serotypes of *Escherichia coli* serogroup 029. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 27, p. 2161-2164, 1989.
- HART, C. A.; BATT, R. M.; SAUNDERS, J. R. Diarrhoea caused by *Escherichia coli*. **Ann. Trop. Paediatr.**, v. 13, p. 121-131, 1993.
- HOMMA, M. et al. Regions of *Salmonella typhimurium* flagellin essential for its polymerization and excretion. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 169, p. 291-296, 1987.
- HORIGUCHI, T. et al. Genetic analysis of *Hl*, the structural gene for phase-I flagellin in *Salmonella*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 91, p. 139-149, 1975.
- HUGHES, et al. Sensing structural intermediates in bacterial assembly by export of a negative regulator. **Science**, Washington, v. 262, p. 1277-1280, 1993.
- IINO, T. Genetics of structure and function of bacterial flagella. **Annu. Rev. Genet.**, v. 11, p. 161-182, 1977.
- JOSENHANS, C.; LABIGNE, A.; SUERBAUM, S. Comparative ultrastructural and function studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin

subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 177, p. 3010-3020, 1995.

JOYS, T. M. The covalent structure of the phase-1 flagellar filament protein of *Salmonella typhimurium* and its comparison with other flagellins. **J. Biol. Chem.**, v. 260, p. 15758-15761, 1985.

JOYS, T. M. The flagellar filament protein. **Can. J. Microbiol.**, v. 34, p. 452-1458, 1988.

KAPER, J. B. Proceedings of the international symposium on enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 130-133, 1996.

KILGER, G.; GRIMONT, P. A. D. Differentiation of *Salmonella* phase 1 flagellar antigen types by restriction of the amplified *fliC* gene. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 31, p. 1108-1110, 1993.

KIM, K. H. et al. Etiology of childhood diarrhea in Korea. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 27, p. 1192-1196, 1989.

KOMEDA, Y. Transcriptional control of flagellar genes in *Escherichia coli* K12. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 168, p. 1315-1318, 1986.

KUTSUKAKE, K.; LINO, T. Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 172, p. 741-747, 1990.

KUWAJIMA, G. et al. Nucleotide sequence of the *hag* gene encoding flagellin of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 168, p. 1479-1483, 1986.

KUWAJIMA, GORO. Construction of a minimum-size functional flagellin of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 170, p. 3305-3309, 1988.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropatogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroaherent. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 155, p. 377-389, 1987.

LEVINE, M. M. et al. Diarrhea caused by *Escherichia coli* that produce only heat-stable enterotoxin. **Infect. Immun.**, Washington, v. 17, p. 78-82, 1977.

LEVINE, M. M. et al. Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. **Am. J. Epidemiol.**, v. 138, p. 849-869, 1993.

LINO, T. Assembly of *Salmonella* flagellin in vitro and in vivo. **J. Supramol. Struct.**, New York, v. 2, p. 372-384, 1974.

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

LÖVGREN, A. et al. Identification of two expressed flagellin genes in the insect pathogen *Bacillus thuringiensis* subsp. alest. **J. Gen. Microbiol.**, Colchester, v. 139, p. 21-30, 1993.

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

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

McGEE, K.; HORSTEDT, P.; MILTON, D. L. Identification and characterization of additional flagellin genes from *Vibrio anguillarum*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 178, p. 5188-5198, 1996.

MOENS, S.; VANDERLEYDEN, J. Functions of bacterial flagella. **Crit. Rev. Microbiol.**, v.22, p. 67-100, 1996.

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

NORRIS, S. J. *Treponema pallidum* polypeptide research group. Polypeptides of *Treponema pallidum*: progress toward understanding their structural, function and immunologic roles. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 57, p. 750-779, 1993.

ORLANDI, P. P. et al. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants of poor urban areas of Porto Velho, Rondônia: a preliminary study. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 5, p. 621-625, 2001.

- OYOFO, B. A.; ROLLINS, D. M. Efficacy of filter types for detecting *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental water samples by polymerase chain reaction. **Appl. Envir. Microbiol.**, v. 59, p. 4090-4095, 1993.
- RASMUSSEN, H. N. et al. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken faecal samples by PCR. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 23, n. 5, p. 363-366, 1996.
- REID, S. D.; SELANDER R. K.; WHITTAM, T. S. Sequence diversity of flagellin (*fliC*) alleles in pathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 181, p. 153-160, 1999.
- SAVARINO, S. J. et al. A. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 173, p. 1019-1022, 1996.
- SCHMIDT, H. et al. A gene cluster closely related to type II secretion pathway operons of gram-negative bacteria is located on the large plasmid of enterohemorrhagic *E. coli* O157 strains. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 148, p. 265-272, 1997.
- SHI, F. et al. Development and application of a new scheme for typing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 40, n. 5, p. 1791-1797, 2002.
- SILVERMAN, M.; SIMON, M. I. Bacterial flagella. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 31, p. 397-419, 1977.
- SIXMA, T. K. et al. Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. **J. Mol. Biol.**, London, v. 230, p. 890-918, 1993.
- SCALETSKY, I. C. A. et al. Diffusely Adherent *Escherichia coli* as a Cause of Acute Diarrhea in Young Children in Northeast Brazil: a Case-Control Study. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 40, p. 645-648, 2002.
- SOUZA, E. C. et al. Perfil etiológico das diarreias agudas de crianças atendidas em São Paulo. **J Pediatr.**, Rio de Janeiro, v. 78, p. 31-38, 2002.
- TRABULSI, L. R. et al. Epidemiology of infantile bacterial diarrheal disease in Brazil. **Bact. Diar. Dis.**, v. 20, p. 25-36, 1985.

WEI, L. N.; JOYS, T. M. Covalent structure of three phase-1 flagellar filament proteins of *Salmonella*. **J. Mol. Biol.**, London, v. 186, p. 791-803, 1985.

WHITTAM, T. S. Genetics population structure and pathogenicity in enteric bacteria. In: Baumberg, S.; Yong, J. P. W. **Population genetics of bacteria**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p. 217-245.

WINSTANLEY, C. et al. Flagellin gene and protein variation amongst clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, v. 142, p. 2145-2151, 1996.

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

WOLF, M. K. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 10, p. 569-584, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **State of the art of new vaccines: research and development: Initiative for Vaccine**. Géneva, 2003. Disponível em: <www.who.int/vaccine_research/documents/en/stateofart_excler.pdf>. Acesso em: 4 abril 2004.

YAMAGUCHI, S. et al. Genetic analysis of *H2*, the structural gene for phase-2 flagellin in *Salmonella*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 130, p. 255-265, 1984.

YAMAMOTO, T.; ECHEVERRIA, P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. **Infect. Immun.**, Washington, v. 64, p. 1441-1445, 1996.

ZHANG, W. et al. Molecular analysis of H antigens reveals that human diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains that carry the *eae* gene belong to the H11 clonal complex. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 38, n. 8, p. 2989-2993, 2000.

Anexos

8. ANEXOS

Meios de cultura, sais e soluções

Quando não especificados, os meios de cultura, sais e açúcares utilizados, foram de procedência Difco Laboratories-Detroit Michigan, USA, OXOID ou Merck e os demais reagentes provenientes da Merck ou Sigma-Aldrich Química Brasil Ltda.

Os meios de cultura, obtidos sob a forma desidratada, foram preparados em água destilada e esterelizados por autoclavação de acordo com as recomendações do fabricante. Os meios de cultura utilizados foram: TSB (“Trypticase Soy Broth”), MacConckey agar, Ágar estoque.

Ágar Estoque

Bacto Ágar	3,0g
Extrato de carne	1,5g
Cloreto de sódio (NaCl)	40g
Peptona	2,5µL
Água deionizada Milli-Q	500mL

O meio de cultura foi dissolvido por aquecimento e autoclavado a 121°C por 15 minutos.

Ágar movimento

Extrato de carne	3,0g
Peptona	10g
Cloreto de sódio (NaCl)	5g
Bacto-ágar	2g ou 4g
Água destilada q.s.p.	1000mL

Utilizados para manipulação do DNA

Tampão TE (Tris-EDTA), pH 8,0

Soluções estoques de Na₂EDTA a 500 mM pH 8,0 e Trizma base a 1M foram diluídas para as concentrações finais de 1mM e 10 mM respectivamente, em água bidestilada. A solução autoclavada a 121⁰C por 15 min era mantida em ambiente.

Solução de Brometo de Etídio

O Brometo de Etídio foi preparado a 5 mg/ml em tampão Tris a 0,05 M pH 8,5 e mantido em frasco escuro à temperatura ambiente.

Solução Tampão (TBE) Tris-Borato-EDTA pH 8,2 (10X)

Trizma base	890 mM
Na ₂ EDTA	25 mM
Ácido Bórico	89 mM

Após a dissolução a quente do Na₂EDTA, foram adicionados o Tris, ácido bórico e água bidestilada para completar o volume sob agitação magnética até completa dissolução. A concentração de uso era 0,5X.

Corante de corrida para eletroforese

Azul de Bromofenol	0,25 %
Xileno cianol	0,25 %
Ficoll tipo 400	25,0 %

O Ficoll foi dissolvido a quente em água bidestilada e, após a dissolução dos corantes e, completado o volume com água bidestilada, a mistura foi mantida à temperatura ambiente.