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

**Padronização da reação de *Immuno-dot* para detecção
de Pet em sobrenadante de cultura de
Escherichia coli enteroagregativa**

Andréa Bernardes Vilhena Costa

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez

São Paulo
2004

Andréa Bernardes Vilhena Costa

Padronização da reação de *Immuno-dot* para detecção de Pet em
sobrenadante de cultura de *Escherichia coli* enteroagregativa

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez
orientador/presidente

Rioko Taki

1º. examinador

Waldin P. Elias Junior

2º. examinador

São Paulo, 07 de dezembro 2004.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comissão de Ética em Experimentação Animal

Of. CEEA nº 04/2004

CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto “Obtenção de anticorpos monoclonais e policlonais contra PET para padronização de ensaios de captura de antígeno em amostras produtoras de PET provenientes de amostras clínicas” (Protocolo nº26), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). **Andréa Bernandes Vilhena Costa** e do orientador(a) **Marina Baquerizo Martinez**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 09/02/2004.*

São Paulo, 01 de março de 2004.

Elfriede Bacchi

Prof. Assoc. Elfriede Marianne Bacchi
Coordenadora da CEEA

Dedicatória

Aos meus amados filhos, Marília e Alessandro Filho. Todos os dias em que eu não pude beijá-los e tê-los em meus braços eu os sentia e conseguia ter forças para continuar e poder dedicar com muito amor este trabalho a vocês.

À querida Maria Augusta, minha mãe, exemplo de amor incondicional. Por meio de seus acaletos, palavras bonitas de incentivo e o maior apoio que recebi em minha vida, pude superar obstáculos e vencer desafios, dedico este trabalho.

Ao meu irmão Alexandre, cunhada Maria Tereza e sobrinhas Alyssa e Izabella, pelo apoio, companheirismo e amor recebidos, dedico este trabalho.

Ao meu marido Alessandro e pai Hélio que partiram prematuramente de nossas vidas, que essa conquista seja elevada com amor a vocês.

Agradecimentos Especiais

À minha orientadora Prof^a Marina Baquerizo Martinez, obrigada por ter me acolhido em sua equipe, pelos ensinamentos, apoio, orientação e paciência dedicados a mim e ao meu trabalho. Serei eternamente grata.

À Dr^a Roxane Maria Fontes Piazza que, ao me receber em seu laboratório com apoio, dedicação, amizade, paciência e orientação constantes, tornou possível este trabalho. O meu obrigada de coração.

À querida Tia Leza, um dia desses... a façanha de seu trabalho me foi dedicada. Por seu imenso amor, apoio e incentivo, muito obrigada.

Ao padrinho Antônio, exemplo de vida, pelo amor e incentivo, muito obrigada.

Aos queridos Sr. Antônio e Darcy a acolhida calorosa em sua casa, a palavra amiga, o incentivo, o encorajamento, a sopinha quente... Toda essa expressão de amor tornou possível conquistar este trabalho. Muito obrigada.

Sobretudo a Deus que tornou todos os obstáculos transponíveis.

É melhor tentar e falhar, que preocupar-se , e ver a vida passar, é melhor tentar ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder, prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver!

Martin Luther King

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Luiz Rachid Trabulsi por ter me recebido em seu laboratório e principalmente por seu exemplo de vida dedicada à ciência.

Ao Dr. Oswaldo Augusto Sant'Anna, pelo convívio saudável e amizade no decorrer deste trabalho.

Aos Professores Dr. Antônio Fernando Pestana e Dra Kioko Takei, pelas valiosas sugestões recebidas na qualificação deste trabalho.

Ao Professores Dr. Waldir Pereira Elias Jr. e Dra Tânia A. Tardelli Gomes pelas valiosas sugestões no decorrer deste trabalho.

À Profa Elsa Mamizuka pelo apoio e carinho.

À Dra Márcia Franzolin, Rosely Alves, Renata Albuquerque e Solange Souza, pelo carinho, apoio e colaboração.

À Nadja Terra, pela amizade, carinho e grande incentivo durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos de bancada do Laboratório de Microbiologia Clínica Ana Carolina Moreno, Antônio Fernandes Filho, Carla Taddei e Juliana Motta, pela amizade, carinho, incentivo, colaboração e principalmente companheirismo em cada momento deste trabalho.

Às amigas de bancada do Laboratório Especial de Microbiologia do Instituto Butantan Caroline Magalhães, Caroline Menezes, Júlia, Meire e Paula Koga, pelo agradável convívio e colaboração em cada momento deste trabalho.

Aos amigos de Laboratório de Microbiologia Clínica Diogo Ogawa, Cristina Reineter, John McCulloch, Nilton Lincopan, José Antônio Albuquerque e do Laboratório Especial de Microbiologia do Instituto Butantan Carolina Qualy, Dennys, Márcia Marçal, Mellissa e Taíse pela amizade e companheirismo.

Aos funcionários do Laboratório Especial de Microbiologia Édson, Márcia Franco, Maria Luiza, Regina, Reginaldo, Sebastiana e Terezinha pela constante colaboração.

À Vanessa Bueris pelas valiosas sugestões.

À Flávia Lima pela ajuda e companheirismo em muitas etapas deste trabalho.

À Fernanda Pereira Ribeiro pelo incentivo do ingresso na pós-graduação.

Às minhas queridas amigas Ana Lúcia Leite, Andressa Andrade, Kátia Klein, Márcia Cândido e Rosana Rezende pelo enorme apoio, carinho, incentivo e companheirismo constantes.

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

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

Ao Instituto Butantan.

À Universidade de São Paulo.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. Introdução.....	01
1.1. <i>Escherichia coli</i> – generalidades.....	01
1.2. Padrão de adesão a linhagens celulares.....	02
1.3. Sorotipos.....	04
1.4. Epidemiologia.....	05
1.5. Manifestações e características clínicas.....	07
1.6. Mecanismos de virulência.....	08
1.7. Toxinas.....	11
1.8. Métodos de detecção e diagnóstico de EAEC.....	15
 2. Objetivos.....	 18
 3. Material e métodos.....	 19
3.1. Amostras bacterianas.....	19
3.2. Obtenção, semipurificação e expressão da toxina Pet.....	20
3.3. Teste de adesão em células HEP-2.....	21
3.4. Reação em cadeia da polimerase.....	23
3.5. Obtenção de anticorpos policlonais.....	24
3.5.1. Imunização de coelhos.....	24
3.5.2. Absorção do antissoro.....	25
3.5.3. Titulação do soro anti-Pet.....	25
3.6. <i>Immuno-dot</i>	26
3.6.1. Padronização do <i>immuno-dot</i>	26

3.6.2. Meios de cultura para efeitos das condições nutricionais na produção de Pet por EAEC.....	27
3.6.3. Desenvolvimento do ensaio de <i>immuno-dot</i>	28
4. Resultados.....	30
4.1. Obtenção, semipurificação e expressão da toxina Pet.....	30
4.2. Teste de adesão em células HEp-2.....	31
4.3. Detecção do gene <i>pet</i> por PCR.....	32
4.4. Obtenção do soro policlonal anti-Pet.....	34
4.5. Padronização do <i>immuno-dot</i>	35
4.6. Meios de cultura para efeitos das condições nutricionais na produção de Pet por EAEC.....	37
4.7. Detecção da toxina Pet por <i>immuno-dot</i>	40
5. Discussão.....	44
6. Conclusão.....	53
7. Referências Bibliográficas.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostras protótipos de <i>E. coli</i> e plasmídio vetor utilizados como controles.....	20
Tabela 2. Composição dos diferentes meios de cultura utilizados.....	28
Tabela 3. Distribuição das amostras de EAEC de acordo com os sorotipos, com o padrão de adesão agregativo de 3 e 6 horas, de ensaios de PCR e <i>Immuno-dot</i> para a pesquisa do gene <i>pet</i> e da expressão da toxina Pet, respectivamente.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sobrenadantes das amostras bacterianas pCEF1 e HB101) submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% contendo SDS e corado por <i>Coomassie blue</i> R-250.....	30
Figura 2. Padrão de adesão AA em células HEP-2 da amostra 042 em ensaio de 3 horas.....	32
Figura 3. Análise do perfil do produto de PCR através da eletroforese em gel de agarose (1%) das amostras 042 e HB101.....	33
Figura 4. Titulações do soro de coelho imunizado com Pet e soro pré-imune.....	34
Figura 5. Padronização do ensaio de <i>immuno-dot</i>	36
Figura 6A. Crescimento da amostra 042 em diferentes tempos de cultivo e meios de cultura.....	38
Figura 6B. Crescimento da amostra HB101 em diferentes tempos de cultivo e meios de cultura.....	38
Figura 7. <i>Immuno-dot</i> . Expressão da toxina Pet em diferentes tempos de cultivo e meios de cultura.....	39
Figura 8. Ensaio representativo de um dos experimentos de <i>immuno-dot</i>	41

Figura 9A. Distribuição das amostras bacterianas de acordo com o seu sorotipo provenientes de casos diarreicos..... 42

Figura 9B. Distribuição das amostras bacterianas de acordo com o seu sorotipo provenientes de casos controles..... 42

RESUMO

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC), destaca-se como um importante patógeno emergente causador de diarreia persistente em países em desenvolvimento e de diarreia aguda em países desenvolvidos. A grande heterogeneidade dos fatores de virulência caracteriza esta categoria, porém não foi estabelecido um marcador genético comum a todas as amostras de EAEC. O padrão de adesão agregativa (AA) em células HEp-2 e HeLa é a forma de caracterização e diagnóstico mais precisos desta categoria. Uma das toxinas envolvidas na patogênese é *Plasmid-encoded toxin* (Pet) pertencente à classe das proteínas autotransportadoras com características de uma serino protease denominada SPATEs. Iniciou-se este estudo com a determinação do padrão de adesão de 164 amostras EAEC, previamente caracterizadas como sonda pCVD432 ou sonda AA positiva. Assim, 141 (86%) amostras, que apresentaram padrão de adesão agregativo, foram caracterizadas como EAEC. Face aos resultados obtidos, confirmou-se a baixa especificidade da sonda AA. A pesquisa do gene *pet*, por meio de ensaio de PCR, resultou na positividade de 12 (8,5%) amostras. Prosseguiu-se esse estudo com a padronização da reação de *immuno-dot*. Utilizando-se 300 µL do sobrenadante bacteriano, soro policlonal anti-Pet e o conjugado nas diluições 1/50 e 1/2.500, respectivamente, resultados bastante reprodutíveis foram obtidos. O método foi mais sensível que a detecção do gene por PCR. Por esse ensaio, detectou-se a toxina Pet em 16 (11,3%) das 141 amostras EAEC. Nenhuma das amostras controle negativo foi reconhecida pelo soro anti-Pet, assim como as amostras de *E. coli* produtoras das mais diversas toxinas. Apesar da baixa prevalência de amostras de EAEC produtoras da toxina Pet, neste estudo padronizou-se um método rápido, sensível, específico e de baixo custo para pesquisa desta toxina mostrando o potencial diagnóstico deste ensaio para uso em inquéritos epidemiológicos, o que poderá permitir determinar o papel da Pet no desenvolvimento de diarreia aquosa.

SUMMARY

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAggEC) is an emerging diarrheal pathogen, whose pathogenesis is thought to comprise colonization of the intestinal mucosa with the release of secretogenic toxins. One of the toxin involved is the plasmid-encoded toxin (Pet), which is secreted by the autotransporter mechanism and belongs to a growing class of *Enterobacteriaceae* autotransporter proteins. Since the characteristic aggregative adherence pattern of EAggEC is associated with the presence of a large plasmid called pCVD432, DNA probes and PCR primers derived from this plasmid have been recommended as a screening method for EAggEC in the clinical laboratory. In this study 164 *E. coli* isolates positive for the pCVD432 probe were tested for adherence to HEp-2 cells in which 141 isolates showed aggregative pattern, 12 isolates from them amplify a 1037-bp DNA fragment corresponding to *pet* gene by PCR. Using this samples we standardized an immuno-dot assay for EAggEC detection through Pet toxin as target antigen. 300 µl of bacterial supernatant were applied in a PVDF membrane, and using a rabbit polyclonal sera anti-Pet the expression of the toxin by immuno-dot was in the same isolates in which the gene was detected. Besides no negative controls reacted with Pet antisera, in which we included 40 isolates with no virulence markers for diarrheagenic *E. coli* and *E. coli* expressing toxins other than Pet. This method proves to be rapid, sensitive, specific and low cost, demonstrating this potential as diagnosis for Pet expression and its association with diarrhea.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Escherichia coli* - generalidades

A diarreia é considerada um dos grandes problemas de saúde pública mundial, com mais de dois milhões de mortes ocorridas a cada ano, particularmente entre crianças abaixo de cinco anos de idade (CLARK *et al.*, 2003). No Brasil, principalmente nas regiões norte e nordeste, a doença diarreica representa grande causa de morbidade e mortalidade infantil. O patógeno bacteriano mais comumente associado com formas endêmicas de diarreia infantil é a *Escherichia coli*. Este patógeno tem sido implicado como agente de diarreia desde 1920 (NATARO, KAPER, 1998).

E. coli, é um bacilo Gram negativo e anaeróbio facultativo, pertencente à família Enterobacteriaceae. Tipicamente, este microrganismo coloniza o trato intestinal nas primeiras horas de vida, permanecendo em comensalismo, porém, em hospedeiros debilitados ou imunossuprimidos, ou quando a integridade da barreira intestinal é violada, mesmo as cepas de *E. coli* não patogênicas podem causar infecção (NATARO, KAPER, 1998).

As infecções causadas por *E. coli* podem ser intestinais ou extra-intestinais. Três síndromes clínicas podem resultar de infecções por esse patógeno, doença entérica, infecção do trato urinário (UTIs) e sepsis (KAPER *et al.*, 2004). As infecções do trato urinário são mais comumente causadas por *E. coli* uropatogênica (UPEC) e as meningites e sepsis por *E. coli* associada à meningite (MNEC). Cepas de *E. coli* patogênicas implicadas em infecções

extra-intestinais tem sido recentemente chamadas de ExPEC (RUSSO, JOHNSON, 2000).

As amostras de *E. coli* associadas a gastroenterite são conhecidas como *E. coli* diarreiogênicas, e suas categorias são diferenciadas de acordo com o padrão de adesão às células epiteliais, os sorotipos O:H, as manifestações clínicas da doença, os mecanismos de virulência e a epidemiologia (NATARO, KAPER, 1998). Atualmente são reconhecidas seis categorias de *E. coli* diarreiogênicas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* que adere difusamente em cultura de linhagens celulares (DAEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC).

1.2. Padrão de adesão a linhagens celulares

Em 1979, Cravioto e cols. demonstraram que amostras de EPEC aderiam às células HEp-2, levando outros pesquisadores a analisarem coleções bacteriológicas de *E. coli* provenientes de estudos de diarreia em países em desenvolvimento por ensaios de adesão. SCALETISKY e cols. (1984) mostraram que cepas de EPEC aderiam também às células HeLa, em um fenótipo característico descrito como padrão de aderência localizada (AL), caracterizado pela presença de *clusters* ou microcolônias. No entanto, muitas cepas de *E. coli* que não pertenciam ao sorogrupo de EPEC aderiam também às células HEp-2 em um padrão de adesão descrito como difuso (AD) onde as bactérias se mostravam dispersas sobre toda a superfície celular.

Em 1987, Nataro e cols. examinaram o padrão de adesão em monocamadas de células HEp-2 de isolados de *E. coli* provenientes de fezes de crianças de um estudo epidemiológico em Santiago do Chile. Face aos resultados obtidos os autores subdividiram o fenótipo do padrão de adesão difuso (AD) em duas categorias: agregativa e difusa.

No padrão de adesão agregativo (AA) as bactérias apresentam-se aderidas umas às outras, tanto nas células epiteliais como nas lamínulas, numa configuração lembrando tijolos empilhados, formando agregados heterogêneos ou distribuindo-se em forma de cordões, segundo protocolo de interação bactéria-célula HEp-2 descrito por Cravioto e cols. (1979). Dentro do padrão de adesão agregativo típico (AA_t) novos estudos demonstraram uma variação, determinando padrão AA para lamínulas (AA_{cs}) e padrão AA para células HEp-2 (AA_{cel}) (PAUL *et al.*, 1994; GIOPPPO *et al.*, 2000; SUZART *et al.*, 2001).

Deste modo, o termo EAEC é definido para cepas de *E. coli* que não secretam as enterotoxinas termo-lábil (LT) ou termo-estável (ST) elaboradas por ETEC, e que aderem a células HEp-2 num padrão de adesão agregativo (AA), abrangendo nesta definição clones patogênicos e não patogênicos. Atualmente, os testes de adesão em células HeLa ou HEp-2 são utilizados para o diagnóstico da categoria de EAEC, onde o padrão AA é característico para a distinção desta categoria (NATARO, KAPER, 1998).

1.3. Sorotipos

Kauffmann (1947) estabeleceu o primeiro esquema antigênico para classificação de amostras de *E. coli*, conhecido como sorotipagem. Nessa metodologia, as amostras de *E. coli* são classificadas de acordo com o seu antígeno somático (O), flagelar (H) e capsular (K). A combinação desses antígenos define o sorotipo da amostra.

EAEC constitui-se de uma categoria que apresenta uma grande diversidade de sorotipos (KNUTTON *et al.*, 1992) e a existência de um número grande de amostras rugosas ou não tipáveis quanto ao antígeno O, também foi relatada (VIAL *et al.*, 1988). De forma semelhante ao observado em EPEC, onde alguns antígenos H são conservados entre diferentes sorogrupos (ØRSKOV *et al.*, 1990), amostras de EAEC parecem também apresentar esse tipo de relação (NATARO, KAPER, 1998). Entretanto, um grande número de cepas de EAEC são imóveis ou não tipáveis quanto ao antígeno H (VIAL *et al.*, 1988; KNUTTON *et al.*, 1992, NATARO, KAPER, 1998; OKEKE, NATARO, 2001).

A categoria de EAEC apresenta pelo menos 90 diferentes combinações de antígeno somático, de origem polissacarídica e antígeno flagelar, de origem protéica. Algumas cepas de EAEC pertencem ao mesmo sorogrupo de EPEC (O44, O86, O111, O126, O128). Alguns sorogrupos como O44, O86 e O126 são predominantemente EAEC, outros como O128 e O111 contém isolados que podem ser: EPEC, STEC, ETEC ou EAEC (LAW, CHART, 1998).

1.4. Epidemiologia

As amostras de EAEC, desde que foram descritas em 1987, têm sido associadas à diarreia persistente ($>$ que 14 dias de duração) em crianças em países em desenvolvimento (NATARO *et al.*, 1987; NATARO *et al.*, 1998; OKEKE, NATARO, 2001) sendo implicadas em casos de diarreia aguda ($\leq$ 7 dias) e diarreia persistente ou crônica em viajantes em países desenvolvidos (COHEN *et al.*, 1993; GASCON *et al.*, 1998). Também têm sido associadas à diarreia em pacientes com AIDS (MAYER *et al.*, 1995) e em surtos de infecção alimentar (ITOH *et al.*, 1997).

Diversos estudos epidemiológicos em países desenvolvidos ou em desenvolvimento demonstram que a categoria EAEC, associada à doença diarreica, pode ser considerada um patógeno emergente (NATARO *et al.*, 1998). Nataro e cols. (1987) foram os primeiros a proporem patogenicidade à EAEC, após detectarem com uma maior frequência a presença desta cepa em fezes de crianças com diarreia em comparação às crianças saudáveis.

A participação de cepas de EAEC em diversos surtos de diarreia em adultos e crianças tem sido também relatada em países desenvolvidos como Japão, Alemanha e Reino Unido (HUPPERTZ, 1997; ITOH *et al.*, 1997; SMITH *et al.*, 1997). Alguns estudos em países em desenvolvimento encontraram associação entre o isolamento de EAEC em fezes de crianças e adultos com diarreia aguda (KIN *et al.*, 1989; HAIDER *et al.*, 1991; BOUZARI *et al.*, 1994; PAUL *et al.*, 1994; GONZALES *et al.*, 1997).

Estudos recentes conduzidos na cidade de São Paulo por Scaletsky e cols. (2002a) revelaram a associação de EAEC com diarreia aguda infantil,

apresentando taxa de isolamento de 20% dos casos diarreicos e 3% de isolamento dos casos controles ($p < 0,001$). Rodrigues e cols. (2002) e Fernandes-Filho e cols. (2003) nas cidades de Botucatu e de João Pessoa, respectivamente, também demonstraram a associação de EAEC com diarreia aguda infantil.

Fang e cols. (1995), em um estudo na cidade de Fortaleza, encontraram associação de EAEC à diarreia persistente, sendo a frequência deste patógeno em 68% dos casos diarreicos e em 31% dos casos controles ($p < 0,01$).

Porém, outros grupos não encontraram tal associação ao relatarem um número considerável de portadores assintomáticos (GOMES *et al.*, 1989; GOMES *et al.*, 1998). Estes dois estudos epidemiológicos sobre a etiologia da diarreia aguda na cidade de São Paulo (GOMES *et al.*, 1989; GOMES *et al.*, 1998), e um no Rio de Janeiro (ROSA *et al.*, 1998) não encontraram associação de diarreia aguda infantil com a presença de EAEC.

Recentemente um outro estudo prospectivo realizado em dois centros urbanos no nordeste do Brasil (SCALETISKY *et al.*, 2002b) relatou o isolamento de EAEC em 16,9% dos casos diarreicos contra 16,4% dos casos controles ($p > 0,5$), não encontrando associação de diarreia aguda infantil à presença de EAEC.

Em nenhum desses estudos epidemiológicos, a via precisa de transmissão de EAEC foi estabelecida, embora a associação entre infecção e a ingestão de alimentos ou água contaminada tenha sido sugerida (ITOH *et al.*, 1997; MORAIS *et al.*, 1997; PAI *et al.*, 1997; SMITH *et al.*, 1997). Já foram descritas amostras de EAEC isoladas de animais, tanto de material fecal como de infecções extra-intestinais (SOUSA *et al.*, 1997; LIBERATORE *et al.*, 1999).

Por outro lado, o papel desses animais como possível fonte de contaminação para humanos ainda não foi pesquisado.

1.5. Manifestações e características clínicas

As características clínicas da diarreia causada por EAEC são bem definidas em surtos, casos esporádicos e em voluntários. A doença típica é manifestada por uma diarreia aquosa, com muco e secretória, com baixa febre e pouco ou sem vômitos, porém a diarreia sanguinolenta foi relatada em alguns casos (NATARO, KAPER, 1998).

Em voluntários infectados com cepa 042 de EAEC, a diarreia foi com muco, de baixo volume e sem presença de sangue oculto ou leucócitos fecais e todos os pacientes permaneceram sem febre (NATARO *et al.*, 1995). Caracteristicamente, as cepas de EAEC produzem uma acentuada secreção de muco no epitélio, com um emaranhado de bactérias em formação de biofilme, o que parece ter relação com a capacidade de EAEC causar diarreia persistente (NATARO, KAPER, 1998) e já foi demonstrado que a fímbria tipo I participa na formação deste biofilme (MOREIRA *et al.*, 2003).

Embora a maioria dos casos diarreicos se resolva em uma a duas semanas, uma proporção persiste com a doença por mais tempo (LIMA *et al.*, 2000). Esta capacidade de persistência pode estar relacionada a uma demora no reparo da mucosa lesada, devido à desnutrição e outros comprometimentos do hospedeiro (NATARO *et al.*, 1998).

Independente da presença de diarreia a colonização por EAEC pode levar à desnutrição do hospedeiro devido a uma demanda metabólica

exacerbada após a inflamação intestinal; devido a formação de uma barreira de muco impossibilitando a absorção de nutrientes pela adesão intensa da bactéria e/ou aos danos à mucosa ocasionados por citotoxinas. Associada à ocorrência do retardo do crescimento infantil, essa categoria passa a desempenhar um papel ainda maior em doenças humanas principalmente em países em desenvolvimento (NATARO *et al.*, 1998).

1.6. Mecanismos de virulência

Na infecção por EAEC, vários fatores de virulência e características das lesões histopatológicas já foram descritos, porém sua patogênese ainda não é bem entendida (NATARO, KAPER, 1998). A patogenicidade de EAEC tem sido investigada usando-se vários modelos animais. Em intestinos de ratos e coelhos, a EAEC causa alteração histopatológica significativa, caracterizada pelo encurtamento das vilosidades intestinais e necrose hemorrágica na extremidade dos vilos, e uma suave resposta inflamatória com edema e infiltrado mononuclear (VIAL *et al.*, 1988).

Hicks e cols. (1996), demonstraram os efeitos citotóxicos de EAEC *in vitro*, ao observar a esfoliação dos enterócitos e o envolvimento de uma cepa de EAEC com muco em formação de biofilme através da cultura de órgão usando biópsia de espécime intestinal de criança. Nataro e cols. (1996), usando a cepa de EAEC 042, também observaram os efeitos citotóxicos desta cepa através do cultivo de células T84 (células de carcinoma de intestino humano). Em modelo de células T84 a citotoxicidade induzida por EAEC foi demonstrada pela formação de vesículas nas microvilosidades da membrana

seguida de morte e esfoliação celular. Este efeito pode ser ainda acompanhado da formação de vacúolos e separação do núcleo do citoplasma circulante. Em ambos os sistemas de cultivo utilizados nos dois estudos, cultura de órgão e de células T84, o efeito citotóxico requeria a presença de genes localizados no plasmídeo de 65-MDa.

Diversos autores associaram o padrão AA de cepas de EAEC à expressão de adesinas fimbriais ou não fimbriais. Protótipos de cepas de EAEC aderem a células HEp-2 e à mucosa intestinal por estruturas fimbriais chamadas *aggregative adherence fimbriae* (AAFs) (NATARO *et al.*, 1994; CZECHULIN *et al.*, 1997), que são relacionadas às adesinas da família Dr (SAVARINO *et al.*, 1994).

Na cepa 17-2 de EAEC o fenótipo AA está associado à presença de um plasmídeo de 60 MDa (pAA1) que codifica uma fímbria, descrita como uma estrutura de feixes frouxos, designada *aggregative adherence fimbriae* I (AAF/I) (NATARO *et al.*, 1992 e CZECHULIN *et al.*, 1997). Por outro lado, Czechulin e cols. (1997) mostraram que o fenótipo AA da cepa 042 de EAEC é codificado pelo plasmídeo AA, mas que a adesão agregativa é devida à presença de uma estrutura fimbrial que é geneticamente, fenotipicamente e morfolologicamente distinta da AAF/I, expressa pela cepa 17-2, assim chamada de AAF/II.

Os genes responsáveis pela biogênese da AAF/I estão organizados em um *operon* denominado *agg* do plasmídeo pAA1 (NATARO *et al.*, 1993). Os genes envolvidos na biogênese fimbrial são: gene *aggA* que codifica a pilina, *aggB* que codifica uma proteína críptica, *aggC* que codifica o usher, *aggD* que codifica a chaperonina e o *aggR* que é o ativador transcricional dos genes da biogênese da fímbria (SAVARINO *et al.*, 1994; CZECHULIN *et al.*, 1997).

Os determinantes genéticos de AAF/II estão localizados em duas regiões não contíguas do plasmídio de 65 MDa (pAA2) denominada *cluster aaf*, sendo também composto por cinco genes (*aafA*, *aafB*, *aafC*, *aafD* e *aggR*) responsáveis pela biogênese AAF/II. (ELIAS *et al.*, 1999). O gene *aafA* codifica a pilina, *aafB* codifica uma proteína críptica, *aafC* codifica o usher, *aafD* codifica a chaperonina e o *aggR* é o ativador transcricional dos genes da biogênese da fímbria (ELIAS *et al.*, 1999).

Ao contrário das fímbrias AAF/I e AAF/II, que formam feixes, a nova estrutura fimbrial designada AAF/III foi observada como filamentos individuais. A região que compreende os genes responsáveis pela biogênese de AAF/III é denominada de *operon agg-3*, sendo constituída pelos genes *agg-3A*, *agg-3B*, *agg-3C*, *agg-3D* (BERNIER *et al.*, 2002).

Essas fímbrias são responsáveis pela aderência em tecidos da mucosa, sendo, conseqüentemente candidatas a fator de colonização intestinal humano. Estudos epidemiológicos envolvendo EAEC, associam a regulação AggR com doenças diarreicas. A presença de genes associados com a regulação de AggR é fator preditivo do aumento significativo da concentração de IL-8 e IL-1 em pacientes com diarreia causada por EAEC (JIANG *et al.*, 2002).

Kaper e cols. (2004) sugerem que o termo EAEC típica seja reservado às cepas que carregam AggR e pelo menos um subgrupo de genes regulados por AggR (para a qual a tradicional sonda de EAEC é um marcador adequado) e que o termo EAEC atípica possa ser usado para cepas que não apresentam o regulador AggR.

Adesinas não fimbriais ou proteínas de membrana externa (OMPs) apresentando entre 30 e 50 KDa, associadas ao padrão AA têm sido

evidenciadas em diversas amostras de EAEC pertencentes a distintos sorotipos (DEBROY *et al.*, 1995; WAI *et al.*, 1996). Monteiro-Netto e cols. (2003) associaram a capacidade de adesão à cepa de EAEC do sorotipo O111:H12 a uma OMP denominada de proteína agregativa 58 ou Ap58, que adere e aglutina hemácias de bovinos e carneiros. Anticorpos anti-Ap58 inibiram a capacidade de adesão desta cepa e a presença do gene *ap58* está presente somente em cepas aderentes do sorotipo O111:H12 (MONTEIRO–NETTO *et al.*, 2003).

Recentemente foi descrita uma proteína chamada dispersina que parece relacionar-se com os efeitos agregativos da adesina AAF, facilitando talvez, o espalhamento bacteriano sobre a superfície da mucosa ou penetração na camada da mucosa (SHEIKH *et al.*, 2002). Uma estrutura adicional de superfície que está potencialmente envolvida em causas de inflamação é a flagelina, uma proteína de EAEC que induz a liberação de IL-8. A liberação dessa citocina pode estimular a transmigração de neutrófilos através do epitélio, podendo ser levado para o tecido íntegro e secreção de fluidos (STEINER *et al.*, 2000).

1.7. Toxinas

O envolvimento de toxinas na infecção causada por EAEC tem sido sugerido pela freqüente manifestação de diarreia aquosa (SAVARINO *et al.*, 1996). Algumas cepas de EAEC produzem um peptídeo de baixo peso molecular chamado “EAEC *heat-stable enterotoxin 1*” (EAST1) que é distinto da toxina ST (termo-estável) de ETEC, tanto geneticamente como

imunologicamente (SAVARINO *et al.*, 1996; SAVARINO *et al.*, 1993). Savarino e cols. (1991), atribuíram à EAST1 os efeitos de aumento na diferença de potencial (PD) e corrente de curto circuito (I_{sc}) da mucosa intestinal do coelho em modelo de Câmara de Ussing, usando filtrados da cepa 17-2 de EAEC. Em 1996, o mesmo grupo determinou a distribuição e prevalência do gene que codifica a EAST1, em um grupo seletivo de bactérias enteropatogênicas, através da hibridização de colônia e correlacionaram o genótipo EAST1 com a expressão de atividade enterotóxica, ao examinarem cepas de EAEC, EHEC e EPEC (SAVARINO *et al.*, 1996).

Alguns autores relataram que a cepa 17-2 de EAEC provoca o descolamento da monocamada celular de cultura de tecidos. Essa cepa também causa lise em hemácias de carneiro em placas de ágar sangue a 5%, suplementado com CaCl_2 (10 mM), a 37° C após 3 horas de cultivo. A capacidade de descolamento da monocamada celular foi associada à presença de uma α -hemolisina (GOMES *et al.*, 1995).

Em autópsias de íleo de crianças que morreram, num hospital mexicano em decorrência de dois surtos de diarreia persistente associados à EAEC, foram observadas lesões necróticas (ESLAVA *et al.*, 1993) e no sobrenadante dessas amostras foram encontradas duas proteínas de alto peso molecular de 108 e 116 kDa, que foram capazes de provocar acúmulo de fluido e lesões necróticas e hemorrágicas em alça ligada de intestino de rato. Estas proteínas foram predominantemente reconhecidas no sobrenadante das cepas dos surtos e no soro dos pacientes infectados. Esta enterotoxina foi denominada de Plasmid encoded toxin (Pet).

Pet é uma proteína de 104 kDa codificada pelo gene *pet*, o qual está localizado no plasmídio de virulência de 65 MDa da cepa 042 de EAEC. Essa toxina foi caracterizada como um membro da família das proteínas autotransportadoras com características de uma serino protease denominada SPATEs (*serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae*). A classe das autotransportadoras é caracterizada pela presença de um domínio C-terminal conservado formando um poro na membrana externa da bactéria, através da qual a proteína madura é transportada (HENDERSON, NATARO, 2001; NAVARRO-GARCIA *et al.*, 1999).

Navarro-Garcia e cols. (1998) sugeriram que esta proteína é capaz de provocar aumento da corrente de curto circuito (*I_{sc}*) e diminuição da resistência elétrica, com danos nas células do epitélio, em tecido de jejuno de rato montado em Câmara de Ussing. Acompanhados a estes efeitos de danos na mucosa, o aumento da produção de muco, a esfoliação celular e os abscessos crípticos também foram observados.

As alterações provocadas por Pet no citoesqueleto de células HEp-2 e HT29 cultivadas *in vitro*, sem comprometimento da viabilidade celular, mostraram-se dependentes da atividade da serino protease. Estes efeitos citopáticos e enterotóxicos mostraram-se inibidos pelo fenil metil sulfonil fluoreto (PMSF) e podem ser observados após duas horas de exposição da toxina às células HEp-2 e HT29, de forma irreversível, quando incubadas à temperatura de 37°C (NAVARRO-GARCIA *et al.*, 1999). Porém, a capacidade de inibição pode ser demonstrada à temperatura de 4°C, indicando assim, que a atividade catalítica pode ser termo dependente (NAVARRO-GARCIA *et al.*, 2000).

Navarro-Garcia e cols. (2000) mostraram que os efeitos citotóxicos de Pet parecem ser devido à capacidade de internalização da toxina na célula eucariótica através de um sistema vesicular. Além disso, Pet é capaz de clivar a espectrina e fodrina *in vitro*, pois, células intoxicadas com Pet apresentavam uma redistribuição e condensação da espectrina no citoesqueleto da membrana (VILLASECA *et al.*, 2000). Esses estudos recentes demonstraram um sítio de ação intracelular de Pet e a importância do trânsito dessa toxina dentro da célula epitelial (SUI *et al.*, 2003).

A diarreia secretória, particularmente em pacientes com doença entérica causada por EAEC, é consistente com a atividade enterotóxica induzida por Pet. Estudos epidemiológicos têm fortemente induzido a hipótese de que somente cepas de EAEC produtoras de Pet são capazes de induzir diarreia (ESLAVA *et al.*, 1998).

Além de Pet, Henderson e cols. (1999) descreveram na amostra protótipo de EAEC (042), uma proteína extracelular denominada *Protein involved in colonization* (Pic). Essa proteína secretada é capaz de degradar a mucina, conferir à bactéria a capacidade de resistir à atividade bactericida do soro, aglutinar hemácias de rato *in vitro*. Esta toxina também possui alta homologia com proteínas autotransportadoras (RAJAKUMAR *et al.*, 1997). Esses achados sugerem que Pic pode ser uma proteína multifatorial envolvida na patogênese entérica de EAEC (HENDERSON *et al.*, (1999).

1.8. Métodos de detecção e diagnóstico de EAEC

Após o isolamento e identificação da *E. coli* nas fezes do paciente, o ensaio de adesão às células HEP-2 ou HeLa mostrando o padrão AA, caracterizado pelas bactérias que se apresentam aderidas às células ou lamínulas numa configuração que lembra tijolos empilhados, constitui o teste referência e o diagnóstico definitivo de EAEC. Porém, diversos testes alternativos ao de adesão têm sido descritos e avaliados (NATARO, KAPER, 1998).

Baudry e cols. (1990) padronizaram uma sonda genética para diagnóstico da categoria, a qual consiste de um fragmento críptico de 1 Kb do plasmídeo presente na amostra 17-2 (sorotipo O3:H2), conhecido como sonda AA ou sonda pCVD432 (sonda EAEC), sendo sua especificidade e sensibilidade variável de acordo com diversos grupos de estudo (BAUDRY *et al.*, 1990; DEBROY *et al.*, 1994; FANG *et al.*, 1995; GOMES *et al.*, 1998).

Embora, Debroy e cols. (1994) tenham padronizado uma outra sonda genética (pVAP), que mostrou ser mais sensível (93%) que a sonda AA (70%) na avaliação de amostras de EAEC no Brasil, México, Chile e Índia. A sonda AA padronizada por Baudry e cols. (1990) continua sendo, no entanto, amplamente utilizada para detecção de EAEC em estudos epidemiológicos (FARUQUE *et al.*, 1992; GIOPPO *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 1998).

Ensaio de PCR utilizando genes marcadores de virulência de EAEC, como os genes plasmidiais *astA*, *pet*, *aggA*, *aggC*, *aafA*, *aafC*, *aggR*, *she*, *aap* *shf* e os genes cromossomais *irp2* e *pic*, têm sido amplamente utilizados em inquéritos epidemiológicos por diferentes grupos (CZECZULIN *et al.*, 1997;

ELIAS *et al.*, 1999; GIOPPPO *et al.*, 2000; MONTEIRO-NETTO *et al.*, 1999; SAVARINO *et al.*, 1994; YAMAMOTO *et al.*, 1997).

Recentemente, Cerna e cols. (2003) desenvolveram um novo método de detecção de EAEC pelo multiplex PCR, através da identificação de três genes plasmidiais *aap*, *aggR* e sonda AA. A caracterização molecular de EAEC por este método mostrou ter uma maior sensibilidade do que a sonda genética.

Albert e cols. (1993) mostraram que amostras de EAEC, sonda AA positiva, cultivadas em caldo Müeler-Hinton apresentavam um fenótipo característico de formação de uma película na superfície do tubo de cultivo. Esta película demonstra a capacidade da EAEC em formar biofilme e este fenótipo pode ser facilmente visualizado através da coloração por Giemsa (NATARO, KAPER, 1998).

Devido ao fato de ser considerada um patógeno emergente, não estão claros os mecanismos de patogenicidade e os fatores de virulência que diferenciam as amostras de EAEC isoladas de casos diarréicos e as isoladas de casos controles, no entanto, as evidências para o envolvimento de Pet na diarréia aquosa apontam para que esta toxina seja um dos principais fatores na patogênese desta infecção. Além disto, a ausência de técnicas sensíveis, específicas, rápidas e de baixo custo para detecção de amostras de EAEC produtoras da toxina Pet levou ao desenvolvimento deste trabalho.

Dentre as técnicas de detecção, destaca-se o ensaio de *immuno-dot*, também conhecido como *dot-ELISA*, *dot-blotting assay*, onde pequenas quantidades de amostras são aplicadas em membranas de nitrocelulose ou de difluoreto de polivinilideno (PVDF). Este ensaio foi desenvolvido por Hawkes e cols (1982), que verificaram que o teste poderia ser aplicado a uma série de

antígenos, diversos autores testaram e obtiveram excelentes resultados com proteínas solúveis, ácidos nucleicos, membranas, organelas, fungos, protozoários, bactérias e vírus.

Sendo assim, surgiu o objetivo deste trabalho que foi a obtenção de anticorpos anti-Pet para a padronização de um *immuno-dot* como método de detecção rápida da toxina Pet.

2. OBJETIVOS

Padronização de um método imunológico para detecção de amostras de EAEC produtoras de Pet:

- ♦ Caracterização de amostras EAEC pelo ensaio de adesão em linhagem HEp-2;
- ♦ Pesquisa do gene *pet* em amostras EAEC pelo método de PCR;
- ♦ Obtenção de anticorpos policlonais contra a toxina Pet produzida por EAEC;
- ♦ Padronização de um ensaio de *immuno-dot* para detecção de Pet.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras bacterianas

Foram estudadas 164 amostras de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), caracterizadas como reativas à sonda EAEC (BAUDRY *et al.*, 1990). Estas amostras foram avaliadas quanto ao seu sorotipo na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz.

40 amostras bacterianas, que não apresentaram nenhum dos fatores de virulência para *E. coli* diarreiogênicas, foram escolhidas aleatoriamente como amostras negativas, provenientes da coleção de culturas da Profª Assoc. Drª Marina Baquerizo Martinez (Universidade de São Paulo – FCF, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Laboratório de Microbiologia). Outras oito amostras de *E. coli* que expressam as mais diversas toxinas também foram avaliadas, e estas, foram provenientes da coleção de culturas bacterianas do Laboratório Especial de Microbiologia do Instituto Butantan (**Tabela 1**).

As amostras de *E. coli* utilizadas como controles dos diferentes ensaios e procedimentos estão descritas na **tabela 1**.

Tabela 1. Amostras protótipos de *E. coli* e plasmídeo vetor utilizados como controles.

Amostras	Categoria	Características	Sorotipo	Referência
042	EAEC	Protótipo para expressão da toxina Pet e de adesão agregativa	O44:H18	Nataro <i>et al.</i> , 1985
C1845	DAEC	Protótipo de adesão difusa	O75:H ⁻	Bilge <i>et al.</i> , 1989
ICB34	EPEC	Protótipo de adesão localizada	O55:H6	Martinez <i>et al.</i> , 1999
HB101	<i>E. coli</i>	Híbrido de <i>E. coli</i> K-12 com <i>E. coli</i> B		Boyer <i>et al.</i> , 1969
pCEFN1	<i>E. coli</i>	Portadora do fragmento de 3,9 Kb obtido do plasmídeo da amostra 042 inserido em uma <i>E. coli</i> , e expressa a toxina Pet		Eslava <i>et al.</i> , 1998
94	DAEC	Expressão de Sat	-	Sousa <i>et al.</i> , 2002
138	DAEC	Expressão de Sat	-	Sousa <i>et al.</i> , 2002
C7-88	EHEC	Expressão de Stx-1	O157:H7	Bacterioteca do Prof. Luiz R. Trabulsi
C1520-77	EHEC	Expressão de Stx-2	O157:H7	Bacterioteca do Prof. Luiz R. Trabulsi
3321-4	ETEC	Expressão de ST	O153:H45	Gomes <i>et al.</i> , 1991
21089	ETEC	Expressão de LT-I	OR	Girão <i>et al.</i> , 2001
40T	ETEC	Expressão de LT-I e ST-I	OR	Bacterioteca do Prof. Luiz R. Trabulsi
H10407	ETEC	Expressão de LT-I, ST-I e EatA	O78:H11	Evans <i>et al.</i> , 1975

3.2. Obtenção, semipurificação e expressão da toxina Pet

Para a obtenção da toxina Pet, o clone pCEFN1 (ESLAVA *et al.*, 1998) foi cultivado em 100 mL de caldo Lúria Bertani (LB) acrescido de ampicilina (50 µg/mL) e IPTG (Isopropil β-D-Tiogalactopiranoside) à concentração final de 1 mM, por 24 horas a 37°C, sob agitação constante de 200 rpm. A cultura foi centrifugada por 15 min a 8.200 x g e o sobrenadante obtido foi filtrado em membranas de 0,22 µm (Millex™ GP, Millipore, Bedford, MA) e concentrado pela passagem em filtros com corte de 50-kDa (Ultrafree, Millipore, Bedford, MA).

As frações protéicas obtidas foram dosadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para preparar esta fração protéica seguiu-se o protocolo descrito em 1985 por Navarro-Garcia e cols., com ligeiras modificações. A pureza desta preparação foi monitorada por SDS/PAGE usando gel de poliacrilamida a 10%, que após a corrida eletroforética foi corado com *Coomassie blue* R-250 (Sigma, St. Luis, MO). Como padrão de peso molecular utilizou-se os marcadores de 212 a 53 kDa (Amhersham Pharmacia Biotech).

À toxina semipurificada foi armazenada a -20°C até o momento de uso.

3.3. Teste de adesão em células HEp-2

O teste foi realizado conforme metodologia descrita por Cravioto e cols. (1979) com algumas modificações, utilizando-se camadas semiconfluentes de células HEp-2.

As células HEp-2 foram cultivadas a 37°C , sob atmosfera de 5% de CO_2 , em garrafas estéreis de poliestireno apropriadas para cultivo (Nunc Inc., Dinamarca) contendo Meio de Eagle modificado (MEM Sigma-Aldrich Química Brasil Ltda) acrescido de soro fetal bovino (SFB) a 10% e antibiótico (penicilina 10.000 UI/mL e estreptomicina 10 mg/mL), denominado MEM completo.

Para realização do repique para microplacas de poliestireno de 24 câmaras (Corning Costar Corporation, EUA), o meio de cultivo (MEM completo) foi desprezado e a monocamada celular foi lavada uma vez com PBS a 0,1 M, pH 7,4 (NaCl 136mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM, KH_2PO_4 1,5 mM) estéril, este foi desprezado e as células foram descoladas da garrafa utilizando-se raspador de células e recuperadas com 5 mL de meio de cultura. Utilizou-se

uma alíquota de 1,5 mL de suspensão contendo cerca de $1,0 \times 10^5$ células por mL em cada câmara, contendo uma lamínula de 13 mm de diâmetro. As placas foram incubadas em estufa a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂, por 48 h para obtenção de uma monocamada celular sub-confluente.

Para realização do teste de adesão, inicialmente, o meio de cultivo (MEM completo) foi desprezado e a monocamada celular foi lavada cinco vezes com PBS a 0,1 M, pH 7,4, estéril. Em seguida adicionou-se 1,0 mL de MEM contendo 2% de SFB e 2% de D-manose. Posteriormente, 30 µL do crescimento bacteriano obtido em meio TSB incubado por 16 h, foi inoculado nas câmaras da placa e esta incubada a 37°C por 3 h. Após este período, o meio foi então retirado, e os orifícios da placa lavados 5 vezes com PBS pH 7,4 estéril. Após fixação com metanol durante 30 min, as células foram coradas com May Grünwald, na diluição de 1:2, em tampão Sörensen durante 10 min e, em seguida corou-se com Giemsa, na diluição de 1:3, no mesmo tampão, durante 20 min. A placa foi lavada em água corrente, as lamínulas foram secas à temperatura ambiente, montadas e coladas sobre lâminas de vidro para serem observadas ao microscópio óptico comum, utilizando-se objetiva de 100X.

Os testes foram realizados em duplicata, e as amostras que não apresentaram um padrão de adesão definido após o período de 3 h, foram novamente avaliadas seguindo um protocolo de maneira semelhante à descrita acima, incluindo-se após as lavagens com PBS pH 7,4 estéril a adição de 1 mL de MEM contendo 2% de SFB e 2% de D-manose e incubação a 37°C por um período adicional de 3 h de contato bactéria-célula (teste de 6 h). Foram

utilizados como controles do teste de adesão as amostras 042 (adesão agregativa), C1845 (adesão difusa) e ICB34 (adesão localizada).

3.4. Reação em cadeia da polimerase

A detecção do gene *pet*, que codifica a toxina Pet, foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), com os seguintes iniciadores [Integrated DNA Technologies, Inc (IDT)] e condições de amplificação:

Gene	Proteína	iniciadores	Seqüência dos <i>primers</i>	Tamanho fragmento amplificado	Ciclo de amplificação	Referencia
<i>pet</i>	Pet (<i>plasmid encoded toxin</i>)	5'-3' 5'-3'	GTG TTT CAA CCA GGT TCA ACA CCT TCA CCA ATT TTA TGC AGT	1037 pb	1 min 94°C, 1 min 50°C, 90 seg 72°C (30 ciclos)	Gioppo <i>et al.</i> , 2000 com ligeiras modificações

As soluções de reação foram compostas por dNTP 400 mM, Buffer 10X: 2,0 µL, MgCl₂ 5 mM, Iniciador F: 0,4 µM, Iniciador R: 0,4 µM, Taq DNA polimerase 2 unidades, lisado bacteriano 2,0 µL e a água bidestilada estéril para complemento dos 20 µL de reação final. Os lisados bacterianos foram obtidos por meio da retirada de três colônias bacterianas de uma cultura prévia em ágar Lúria-Bertani (LB), ressuspensas em 300 µL de água bidestilada estéril e fervidas por 10 min, com posterior tratamento de choque térmico. Após o uso, os lisados foram mantidos a -20°C, para posteriores utilizações.

A reação foi realizada nas condições acima descritas em termociclador (Gene Amp PCR System 2400, Applied Biosystems). Ao final de cada reação, uma alíquota de 10 µL foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% em

tampão TBE 0,5x (Tris-Borato 45mM, EDTA 1 mM) juntamente com um padrão de peso molecular conhecido (1 Kb *DNA Ladder* – Invitrogen™), misturados a uma solução tampão (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30%), por cerca de 45 min a 100 volts. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e posteriormente fotografado.

3.5. Obtenção de anticorpos policlonais

3.5.1. Imunização de coelhos

Coelhos (Nova Zelândia) de 60-65 dias de idade foram imunizados utilizando-se a proteína Pet semipurificada. Previamente à imunização os sangues dos coelhos foram coletados para obtenção dos soros pré-imunes. O protocolo de imunização consistiu em uma primeira dose de 1 mL contendo 400 µg do antígeno na presença de adjuvante completo de Freund (Sigma) (v/v), por via subcutânea, seguida de injeções nas mesmas concentrações, na presença de adjuvante incompleto de Freund no 21º, 31º e 41º dias, sendo a sangria de prova realizada no 50º dia. O sangue foi coletado por punção cardíaca, o soro separado por centrifugação, e a titulação realizada por ELISA, utilizando a Pet semipurificada como antígeno (ENGVALL, PERLMANN, 1971). Os soros assim obtidos foram estocados a -20°C.

3.5.2. Absorção do antissoro

O soro anti Pet foi absorvido utilizando-se *E. coli* K12, uma amostra HB101 (híbrido de *E. coli* K12 mais *E. coli* B). A amostra HB101 foi crescida em meio LB, a 37°C, sob agitação constante de 200 rpm por 18h, e centrifugada a 1.500 x g por 20 min a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em 14 mL de solução tampão de salina-fosfato 0,01 M pH 7,2 (PBS) e essa suspensão foi dividida em alíquotas de 1 mL em tubos tipo *ependorf*. Os tubos foram centrifugados, os sobrenadantes descartados e os sedimentos mantidos a -20°C. Cerca de 1,5 mL de anti-soro anti-Pet foram homogeneizados com o sedimento e mantidos sob agitação por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, foram incubados de 16 a 18 horas, sob agitação, a 4°C. Posteriormente, essa mistura foi centrifugada e o sedimento descartado. O anti-soro absorvido foi mantido a -20° C até o momento de uso.

3.5.3. Titulação do soro anti-Pet

Uma placa de ELISA (NUNC, Polysorp, Denmark) foi incubada por 16 a 18 h a 4°C com a proteína Pet semipurificada diluída em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6 na concentração de 200 µg/mL. Após três lavagens com PBS Tween 20 0,05% (solução de lavagem), por 5 min, a placa foi bloqueada usando-se BSA a 3% por 1 hora. Em seguida, a placa foi lavada três vezes com solução de lavagem por 5 min, e incubada com diferentes diluições do soro anti-Pet: 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1.600, 1/3.200, 1/6.400 e 1/12.800 por 1 hora, seguida de 3 lavagens com solução de

lavagem, por 5 min. A placa foi, então, incubada com soro anti-coelho, produzido em cabra conjugado à peroxidase (1/10.000) por 1 hora, e a reação foi revelada com solução cromógena de orto-fenilenodiamino (OPD) 0,5 mg/mL, contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A leitura foi realizada a 492 nm em ELISA Multiskan (Labsystems). Titulou-se também os soros pré-ímmunes dos coelhos, obtidos no dia 0 da imunização, a fim de descartar a possibilidade de existência de anticorpos IgG anti-Pet existentes anteriormente à imunização.

3.6. *Immuno-dot*

3.6.1. Padronização do *immuno-dot*

As amostras de *E. coli* 042 e HB101, utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente, foram crescidas em meio TSB, a 37°C, sob agitação constante de 200 rpm, de 16 a 18 horas. Os crescimentos bacterianos foram centrifugados a 1.500 x g por 20 min e os sobrenadantes imediatamente separados. Volumes de 200 µL, 300 µL, 400 µL, e 500 µL de sobrenadantes foram aplicados a vácuo sobre a membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (Immobilon, Millipore, Bedford, MA) previamente tratada (30 seg com metanol, lavagem com água destilada e 2 min em tampão Tris 0,025 M, glicina 0,19 M e metanol a 20%), com o auxílio do sistema *Slot Blot Filtration Manifolds*, Pharmacia®. Após a aplicação do sobrenadante, a membrana foi bloqueada com solução tampão de BSA a 3% em PBS tween 20 0,05% por 30 min. Após o bloqueio, a membrana foi lavada duas vezes com água destilada por 5 min, sob agitação, e incubada com as diluições de 1/50 e 1/100 do soro

anti-Pet absorvido (policlonal), seguida da incubação com diferentes diluições do soro anti-coelho, produzido em cabra, conjugado à peroxidase (conjugado) de 1/2.500, 1/5.000 e 1/10.000.

Após esta padronização os soros pré-ímmunes dos coelhos foram submetidos a ensaio de *immuno-dot* para descartar a existência de anticorpos IgG anti-Pet, anteriormente à imunização, que pudessem reconhecer a amostra controle positivo do teste.

3.6.2. Meios de cultura para efeitos das condições nutricionais na produção de Pet por EAEC

As amostras de *E. coli* 042 e HB101 foram semeadas em 3 mL dos meios M9 com glicose, M9 com lactose, Caldo Lúria-Bertani (LB), Tryptic Soy Broth (TSB) e Caldo Penassay. A composição destes meios está na **tabela 2**. As amostras bacterianas foram incubadas a 37°C por 18 horas. Posteriormente, 500 µL desses cultivos foram adicionados a 50 mL de cada meio e incubados sob agitação constante de 300 rpm a 37°C. Até 5 horas de incubação, alíquotas de 1 mL do cultivo foram retiradas, em condições assépticas, com intervalo de 30 min e a DO medida a 600 nm. Após a 5ª hora de incubação, o procedimento obedeceu ao intervalo de 1 hora até completar a 8ª hora de cultivo marcada pela fase estacionária. As alíquotas retiradas para leitura da DO foram imediatamente centrifugadas a 1.500 x g por 20 min a 4°C. Os sobrenadantes foram submetidos a ensaios de *immuno-dot*.

Tabela 2. Composição dos diferentes meios de cultura utilizados.

	Meio mínimo	LB	TSB	Caldo Penassay
Triptona	–	1%	–	0,5%
Extrato de levedura	–	0,5%	–	0,15%
Caseína –caldo de soja	15%	–	3%	–
Extrato de carne	–	–	–	0,15%
NaCl	0,25%	1%	0,5%	0,35%
KH ₂ PO ₄	1,5%	–	–	0,37%
K ₂ HPO ₄	–	–	0,25%	0,132%
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	6,4%	–	–	–
NH ₄ Cl	0,5%	–	–	–
Glicose		–	0,25%	0,1%
Lactose ou Glicose	2%	–	–	–

3.6.3. Desenvolvimento do ensaio de *immuno-dot*

As amostras bacterianas foram crescidas em meio TSB da seguinte maneira: fez-se um pré-inóculo em meio TSB, a 37°C, sob agitação constante de 150 rpm por 18 horas. 30 µL deste crescimento foi adicionado a 3 mL de TSB e o crescimento deu-se a 37°C, sob agitação constante de 300 rpm por 4 horas. Os sobrenadantes bacterianos foram obtidos por centrifugação a 1.500 x g por 20 min. O volume de 300 µL de sobrenadante foi aplicado a vácuo sobre a membrana de PVDF previamente tratada como descrita no item 3.6.1. Após a aplicação do sobrenadante a membrana foi bloqueada com solução tampão de BSA a 3% em PBS Tween 20 0,05% por 30 min. Após o bloqueio a membrana foi lavada duas vezes com água destilada por 5 min, sob agitação. A membrana foi incubada com o soro anti-Pet absorvido, na diluição de 1/50,

por 1 hora, sob agitação. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes com solução de lavagem por 5 min, sob agitação. Em seguida, a membrana foi incubada com soro anti-coelho produzido em cabra conjugado à peroxidase (conjugado) diluído a 1/2.500 por 30 min, sob agitação, e após este período novamente lavada 3 vezes com solução de lavagem e mais 3 vezes com água destilada, por 5 min, sob agitação. A reação foi revelada com 4 cloro- α -naftol (3 mg/mL) na presença de H_2O_2 . A reação foi interrompida com água destilada.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção, semipurificação e expressão da toxina Pet

Para obtenção da toxina Pet, o clone bacteriano pCEF1N1 foi crescido na presença de IPTG e ampicilina. Após crescimento e indução da expressão da proteína este foi centrifugado e semipurificado em filtros com corte de 50 kDa. Foram aplicados 100 μ g de proteína da preparação semi-purificada em gel de poliacrilamida a 10% contendo SDS (SDS/PAGE). Depois da corrida eletroforética, a coloração por *Coomassie blue*, permitiu a visualização de uma única banda protéica com mobilidade eletroforética relativa de 104 kDa, demonstrando a expressão da proteína Pet (**Figura 1**).

Quando o sobrenadante da cultura da amostra HB101 foi aplicado nas mesmas condições descritas acima, nenhuma banda foi observada (**Figura 1**).

Figura 1. Sobrenadantes das amostras bacterianas pCEF1N1 (canaleta 1) e HB101 (canaleta 2) submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% contendo SDS e corado por *Coomassie blue* R-250.

4.2. Teste de adesão em células HEp-2

As amostras bacterianas utilizadas no presente estudo foram previamente avaliadas através da hibridização de colônias com a sonda genética pCVD432, na Escola Paulista de Medicina, caracterizando-as como amostras sonda EAEC positiva. Essas amostras foram avaliadas no ensaio de adesão de 3 horas e aquelas que apresentaram resultados indefinidos para padrão AA, padrão este definido como tijolos empilhados, porque não aderiram ou aderiram com pouca eficiência ou provocaram descolamento celular, foram re-testadas em ensaio de adesão de 6 horas.

Dentre as 164 amostras avaliadas neste estudo quanto ao padrão de adesão (**Figura 2**), 117 (71,4%) apresentaram o padrão agregativo (AA) no teste de 3 horas, 24 (14,6%) apresentaram padrão AA no teste de 6 horas, 20 (12,2%) não aderiram e 3 (1,8%) apresentaram padrão de adesão localizado (AL). Desta forma, 141 amostras (86%) selecionadas para este estudo foram confirmadas como pertencentes à categoria EAEC.

Figura 2. Padrão de adesão agregativo (AA) em células HEp-2 da amostra 042 em ensaio de 3 horas. Aumento 1.000x.

4.3. Detecção do gene *pet* por PCR

Das 141 amostras que apresentaram padrão AA em linhagens celulares detectou-se o gene plasmidial *pet* em 12 (8,5%) (**Figura 3**). Destas, 11 (9,3%) referem-se às amostras provenientes de casos diarreicos e 1 (4,3%) de caso controle. As 40 amostras utilizadas como controle negativo além de não pertencerem à categoria de EAEC, também não pertenciam a nenhuma das outras categorias de *E. coli* diarreiogênicas, pois apresentaram resultados negativos para hibridização das sondas *eae*, EAF, *bfpA*, LT1, STh, STp, Stx-1, Stx-2 e *inv*. Estas amostras também apresentaram resultados negativos para pesquisa do gene *pet* no ensaio de PCR.

Figura 3. Análise do perfil do produto de PCR através da eletroforese em gel de agarose (1%).

Canaleta 1. Ladder 1 kb, **canaleta 2.** amostra 042, **canaleta 3.** amostra 215A3, **canaleta 4.** amostra 215A4, **canaleta 5.** amostra HB101.

4.4. Obtenção do soro policlonal anti-Pet

A toxina Pet semi-purificada foi utilizada na imunização de coelhos e o soro obtido foi titulado frente a toxina na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, os resultados deste ensaio estão mostrados na **figura 4**. Apesar da alta concentração de antígeno utilizada na sensibilização da placa de ELISA, pode-se afirmar que quando Pet foi utilizada nesta concentração não houve diferença no reconhecimento pelo soro nas diluições de 1/100, 1/200 e 1/400. Já que uma ótima reatividade de um soro é quando este alcança no mínimo 1 DO a 492 nm. Os soros pré-ímenes dos coelhos não mostraram a presença de anticorpos IgG anti Pet (**figura 4**).

Figura 4. Titulação do soro de coelho imunizado com Pet.

Placa de ELISA sensibilizada com 200 $\mu\text{g/mL}$ de Pet e incubadas com diferentes diluições do soro imune (■), e soro pré-imune (□), seguido da incubação do conjugado anti-coelho-peroxidase (1/10.000). Como solução cromógena foi utilizado OPD + H_2O_2 e leitura realizada em 492 nm

4.5. Padronização do *immuno-dot*

As amostras de *E. coli* 042 e HB101, utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente, foram crescidas em meio TSB a 37°C, sob agitação constante de 200 rpm por 18 horas. Os crescimentos bacterianos foram centrifugados a 1.500 x g por 20 min e os sobrenadantes imediatamente separados. Por este ensaio ficou demonstrado que o volume de 300 µL de sobrenadante, e as diluições do soro anti-Pet absorvido de 1/50 e do soro anti-coelho produzido em cabra conjugado à peroxidase (conjugado) de 1/2.500 mostraram-se ideais em relação a reatividade do soro policlonal anti-Pet com a toxina Pet expressa no sobrenadante bacteriano, sendo assim utilizadas como critério de padronização neste estudo, conforme **figura 5**. Para utilizar o soro policlonal anti-Pet foi necessário apenas um procedimento de absorção do soro anti Pet, isto foi determinado pela ausência de reação cruzada do anti-soro com as amostras não produtoras de Pet.

O soro pré-imune foi submetido aos mesmos ensaios de padronização do *immuno-dot* e o resultado obtido foi a não reatividade deste soro com a toxina Pet expressa no sobrenadante bacteriano do controle positivo, descartando assim, a possibilidade do animal ter produzido anticorpos anti-Pet anterior à imunização.

Figura 5. Padronização do ensaio de *immuno-dot*.

Sobrenadantes das amostras bacterianas em a. 042 e b. HB101 em diferentes volumes A. 200 μ L, B. 300 μ L, C. 400 μ L e D. 500 μ L foram incubados com soro de coelho anti-Pet nas seguintes diluições 1/50 em 1, 3, 5 e 1/100 em 2, 4, 6, seguida da incubação com soro de cabra anti-coelho conjugado à peroxidase diluído 1/2500 (I), 1/5.000 (II) e 1/10.000 (III). A reação foi revelada com 4-cloro α -naftol + H_2O_2 .

4.6. Meios de cultura para efeitos das condições nutricionais na produção de Pet por EAEC

Sabe-se que a expressão de toxinas é variável de acordo com o meio em que a bactéria é cultivada, por este motivo cresceu-se as bactérias 042 e HB101 em diferentes meios de cultura (**Tabela 2**) antes do desenvolvimento dos ensaios de *immuno-dot*. Pode-se afirmar que existem diferenças no crescimento bacteriano e esta diferença pode ser dependente do meio utilizado (**Figura 6**). E este crescimento é semelhante tanto para amostra 042 (**Figura 6A**) como para amostra HB101 (**Figura 6B**). No entanto, Pet foi melhor expressa quando a bactéria 042 foi crescida no meio de TSB. Porém, o LB mostrou-se um bom meio de cultivo, permitindo uma expressão mais precoce da toxina a partir de 2h30min e esta permaneceu nos mesmos níveis até quando o cultivo bacteriano atingiu a fase estacionária. Por outro lado, a expressão de Pet em TSB foi homogênea no período entre 3h30min a 8h (**Figura 7**).

Figura 6. Crescimento das amostras 042 (A) e HB101 (B) em diferentes tempos de cultivo e meios de cultura.

Meio mínimo com glicose (■), Meio mínimo com lactose (▲), LB (▼), TSB (◆), Caldo Penassay (●)

Figura 7. *Immuno-dot*. Expressão da toxina Pet em diferentes tempos de cultivo e meios de cultura.

A. Amostra HB101 crescida em LB (1. 150 min, 2. 210 min, 3. 270 min, 4. 360 min, 5. 420 min, 6. 480 min) e TSB (7. 150 min, 8. 210 min, 9. 270 min, 10. 360 min, 11. 420 min, 12. 480 min). B. Amostra 042 crescida em LB e C. Amostra 042 crescida em TSB em 1. 90 min, 2. 120 min, 3. 150 min, 4. 180 min, 5. 210 min, 6. 240 min, 7. 270 min, 8. 300 min, 9. 360 min, 10. 420 min, 11. 480 min, 12. 1440 min. A reação foi desenvolvida com soro de coelho anti-Pet (1/50) e o soro de cabra anti-coelho conjugado a peroxidase (1/2.500). A reação foi revelada com 4-cloro α -naftol + H_2O_2 .

4.7. Detecção da toxina Pet por *immuno-dot*

Das 141 amostras que apresentaram padrão de adesão agregativo pelo ensaio de adesão, em 16 (11,3%) a toxina Pet foi detectada por *immuno-dot* (**Figura 8**). Destas, 15 (10,6%) referem-se a amostras provenientes de casos diarreicos e 1 (4,3%) de caso controle.

Nenhuma das 40 amostras negativas foi reconhecida pelo soro anti-Pet assim como as oito amostras de *E. coli* que expressam as toxinas Sat ou Stx-1 ou Stx-2 ou LT ou ST ou EatA ou LT/ST. Este ensaio foi extremamente reprodutível e em cada reação sempre se utilizou como controles positivo e negativo as amostras 042 e HB101, respectivamente.

Das amostras Pet positivas isoladas de casos diarreicos sete foram caracterizadas como sorotipo ONT:H⁻, duas como sorotipo ONT:H28, uma como sorotipo ONT:H9, duas como sorotipo O92:H33, uma como sorotipo O99:H4, uma como sorotipo O106:H⁻, e uma como sorotipo O112:H⁻ (**Figura 9A, Tabela 3**) e uma correspondente ao grupo controle como sorotipo O126:H2 (**Figura 9B, Tabela 3**).

Figura 8. Ensaio representativo de um dos experimentos de *immuno-dot*.

Amostras positivas (042, 40A5, 90A5, 91A4, 91A5, 91A7, 215A2) 300 μ L dos sobrenadantes das amostras bacterianas foram aplicados sobre a membrana de PVDF e esta foi reagida com o soro de coelho anti-Pet (1/50) e o soro de cabra anti-coelho conjugado a peroxidase (1/2.500). A reação foi revelada com 4-cloro α -naftol + H_2O_2 .

A

B

Figura 9. Distribuição das amostras bacterianas de acordo com o seu sorotipo.

A. Amostras provenientes de casos diarreicos (destaque as amostras do sorotipo ONT:H-, ONT:H9, ONT:H28, O92:H33, O99:H4, O106:H-, O112:H- reconhecidas por *immuno-dot* pelo soro anti-pet). B. Amostras provenientes de casos controles (destaque a amostra do sorotipo O126:H2 reconhecidas por *immuno-dot* pelo soro anti-pet).

Tabela 3. Distribuição das amostras de EAEC de acordo com os sorotipos, com o padrão de adesão agregativo de 3 e 6 horas, de ensaios de PCR e *Immuno-dot* para a pesquisa do gene *pet* e da expressão da toxina Pet, respectivamente. Valores expressos entre parênteses referem-se às amostras de casos controles.

Sorotipo	Teste de adesão 3 horas			Teste de adesão 6 horas	
	PCR +	PCR –	PCR -	PCR +	PCR -
	<i>Immuno-dot</i> +	<i>Immuno-dot</i> +	<i>Immuno-dot</i> -	<i>Immuno-dot</i> +	<i>Immuno-dot</i> -
ONT:H ⁻	7/19	-	1/19 (10/19)	-	1/19
ONT:H7	-	-	1/1	-	-
ONT:H9	1/1	-	-	-	-
ONT:H10	-	-	6/6	-	-
ONT:H18	-	-	4/6	-	2/6
ONT:H25	-	-	(1/1)	-	-
ONT:H27	-	-	-	-	2/2
ONT:H28	2/2	-	-	-	-
ONT:H49	-	-	2/2	-	-
O3:H2	-	-	19/21	-	2/21
O11:H18	-	-	-	-	1/1
O15:H18	-	-	5/9	-	4/7
O39:H49	-	-	2/8	-	6/8
O65:H ⁻	-	-	2/2	-	-
O76:H33	-	-	4/5	-	1/5
O77:H18	-	-	1/1	-	-
O78:H ⁻	-	-	4/4	-	-
O78:H10	-	-	3/3	-	-
O86:H11	-	-	1/1	-	-
O86:H18	-	-	1/1	-	-
O91:H ⁻	-	-	(10/10)	-	-
O92:H33	-	2/4	2/4	-	-
O99:H4	-	1/7	6/7	-	-
O99:H7	-	-	2/2	-	-
O99:H17	-	-	4/5	-	1/5
O104:H4	-	-	5/5	-	-
O106:H ⁻	1/1	-	-	-	-
O112:H ⁻	-	1/1	-	-	-
O125:H9	-	-	1/1	-	-
O126:H2	(1/2)	-	(1/2)	-	-
O128:H35	-	-	2/3	-	1/3
O153:H2	-	-	2/2	-	-
OR:HNT	-	-	1/1	-	-
NR	-	-	1/1	-	-

(NT) - não tipável; (R) - rugosa; (NR) - não realizado

5. DISCUSSÃO

Entre as categorias de *E. coli* diarreiogênicas, a EAEC destaca-se como um importante patógeno emergente causador de diarreia persistente em países em desenvolvimento e de diarreia aguda em países desenvolvidos (OKEKE, NATARO, 2001).

A grande heterogeneidade dos fatores de virulência descritos nesta categoria bem como o fato de amostras de EAEC serem isoladas de casos diarreicos e controles fortalecem a hipótese de que apenas um subgrupo de amostras EAEC portador de um subgrupo específico de fatores de virulência teria a capacidade de causar diarreia (NATARO, KAPER, 1998; NATARO *et al*, 1998).

Apesar de apresentarem diversos marcadores genéticos, ainda não foi estabelecido um marcador comum a todas amostras de EAEC. O padrão de adesão agregativa em células HEP-2 e HeLa ainda é a forma de caracterização comum da categoria e desta maneira o método diagnóstico mais preciso (NATARO, KAPER, 1998).

Sendo assim, iniciamos este estudo com a determinação do padrão de adesão AA em células HEP-2 das amostras bacterianas, previamente caracterizadas como sonda EAEC positiva em estudos anteriores (FERNANDES-FILHO *et al.*, 2003).

Dentre as 164 amostras caracterizadas como sonda AA positiva, 141 amostras apresentaram o padrão agregativo (AA) para os ensaios de 3 e 6 horas de adesão (86%) sendo então confirmadas como pertencentes à categoria EAEC. Os resultados obtidos corroboram os dados de outros

pesquisadores sobre a baixa especificidade da sonda EAEC (BAUDRY *et al.*, 1990; DEBROY *et al.*, 1994; FANG *et al.*, 1995; GOMES *et al.*, 1998), ressaltando-se a restrição do uso de somente a técnica da sonda AA para identificação de EAEC.

Após a determinação do padrão de adesão AA de toda a amostragem, prosseguiu-se com o objetivo deste trabalho que foi a obtenção de anticorpos policlonais para a padronização de imunoensaio para detecção de amostras de *E. coli* diarreiogênicas produtoras da toxina Pet. Fez-se necessária a semipurificação desta toxina para a imunização dos animais e subsequente obtenção destes anticorpos.

O protocolo de semipurificação de Pet utilizado foi o descrito por Navarro–Garcia e cols (1998), com ligeiras modificações. O clone pCEF1 foi induzido com IPTG com o objetivo de se obter uma maior expressão da toxina Pet (ESLAVA *et al.*, 1998). Esta foi semipurificada a partir do sobrenadante, e utilizada na imunização de coelhos Nova Zelândia.

A toxina Pet gerou anticorpos policlonais específicos. Esta especificidade foi demonstrada na reação de *immuno-dot* pela ausência de reação cruzada do antissoro com o sobrenadante das amostras do grupo controle negativo.

Para o desenvolvimento do ensaio de *immuno-dot* foi necessário determinar-se inicialmente o volume de sobrenadante do cultivo bacteriano, os títulos do soro anti–Pet obtido em coelho e o soro anti–coelho conjugado à peroxidase. A padronização do *immuno-dot* foi feita por titulação em bloco ensaiando-se diluições do soro anti–Pet com diluições do conjugado e como antígeno volumes de sobrenadante de cultura de *E. coli* 042 e HB101. Este

ensaio mostrou-se extremamente reprodutível quando utilizou-se 300 µL do sobrenadante bacteriano, soro anti-Pet e o conjugado nas diluições de 1/50 e 1/2.500, respectivamente.

Seguida à padronização do ensaio de *immuno-dot* deu-se início ao teste de toda a amostragem deste estudo, 141 amostras EAEC previamente determinadas pelo padrão de adesão AA mais 40 amostras não pertencentes a nenhuma das categorias de *E. coli* que causam diarreias, e mais oito amostras de *E. coli* produtoras das mais diversas toxinas, usando o sobrenadante de crescimento bacteriano de 18 horas de cultivo após uma agitação constante de 200 rpm. Das 141 amostras EAEC padrão AA, em 16 (11,3%) a toxina Pet foi detectada, 15 (10,6%) referem-se a amostras provenientes de casos diarreicos e 1 (4,3%) de caso controle. Nenhuma das amostras pertencentes ao controle negativo foi reconhecida pelo soro anti-Pet.

Porém, o fato da proteína Pet ser caracterizada como membro da família das proteínas autotransportadoras, com a presença de um conservado domínio C terminal através da qual a proteína madura é transportada e liberada para o sobrenadante do meio de cultivo (HENDERSON, NATARO, 2001; NAVARRO-GARCIA *et al.*, 1999), nos motivou a pesquisar qual a melhor fase relativa à curva de crescimento bacteriano para o ótimo de expressão desta toxina, bem como verificar se o soro reagiria cruzadamente com outras toxinas secretadas por amostras de *E. coli*.

As amostras de ETEC, produtoras de toxinas LT, ST alteram importantes mensageiros intracelulares como AMPc, GMPc e cálcio, respectivamente. A toxina LT produzida por ETEC apresenta homologia com a toxina colérica expressa por *Vibrio cholerae*. Os genes que codificam LT (*elt* ou *etx*) estão

albergados no plasmídio que também contém genes que codificam ST ou CFAs nestas bactérias. Também foi descrito recentemente uma proteína autotransportadora de ETEC, ETEC auto transporter A (EatA) que parece funcionar como um fator de virulência (PATEL *et al.*, 2004).

As cepas de *E. coli* produtoras da toxina de Shiga podem expressar Stx1 e/ou Stx2. Stx1 produzida por STEC é idêntica à toxina de Shiga elaborada por *Shigella dysenteriae*, estas toxinas atuam na inibição da síntese protéica. Por outro lado, Secreted Autotransported toxin (Sat) é uma proteína autotransportadora, sendo encontrada em amostras de UPEC e DAEC (KAPER *et al.*, 2004).

Assim, testou-se sobrenadante de amostras bacterianas de ETEC, STEC e DAEC. Os resultados negativos para estas toxinas comprovaram a especificidade do soro anti-Pet obtido, mostrando que ele não reage cruzadamente com outras toxinas de *E. coli* que não a própria Pet.

Mas restava uma dúvida em relação ao meio de cultura em que a toxina fosse melhor expressa, por este motivo testou-se diferentes meios de cultivo e diferentes tempos de incubação em relação à curva de crescimento bacteriano. Para isso, a bactéria foi submetida a uma agitação constante de 300 rpm com o objetivo de acelerar o crescimento bacteriano e as leituras das DO nos diferentes tempos de incubação foram medidos, estabelecendo-se assim, os pontos relativos à curva de crescimento bacteriano que melhor expressasse a toxina.

Pode-se observar algumas variações de crescimento bacteriano da cepa 042 nos diferentes meios, onde esta atinge a fase estacionária mais precoce (5horas) em meio LB, enquanto que para os outros meios esta fase foi atingida

numa variação de tempo entre 7 e 8 horas de cultivo. O fato da amostra controle negativa, HB101 também apresentar curvas de crescimento semelhantes à amostra 042, e não apresentar reatividade ao soro anti-Pet reforça a especificidade deste imuno-reagente (**Figura 6 e 7**).

Por outro lado, Pet foi melhor expressa em meio TSB numa variação entre 3h30min e 8 horas de cultivo, destacando-se também a expressão em meio LB de forma mais precoce, a partir de 2h30min a 5 horas de cultivo.

Quanto aos requerimentos nutricionais, mostrou-se que a ausência de fonte de carboidrato (meio LB), como provimento de fonte rápida de energia, pode ser suprida pela presença de hidrolisado protéico, cuja proteína é cindida por ácidos e enzimas originando aminoácidos e peptídeos que são utilizados pelas bactérias para prover o carbono e nitrogênio necessários ao metabolismo bacteriano.

Optou por utilizar o tempo de 4 horas para o crescimento bacteriano com agitação constante de 300 rpm e o meio de TSB como um meio de cultura utilizado na rotina laboratorial, disponível comercialmente e de fácil preparação, como critérios estabelecidos para a execução do desenvolvimento do ensaio de *immuno-dot*.

A partir da definição dos critérios de melhor meio de cultivo e tempo de incubação associados à padronização do ensaio de *immuno-dot* onde se definiu o volume do sobrenadante do crescimento bacteriano (300 µL) e títulos de soro anti Pet (1/50) e conjugado (1/2.500), novamente toda a amostragem deste estudo foi submetida a teste para definição da sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade deste ensaio.

Os resultados obtidos, quanto à positividade, foram exatamente os mesmos encontrados quando se utilizou o sobrenadante do crescimento bacteriano de 18 horas de cultivo numa agitação constante de 200 rpm, porém, quando se utilizou sobrenadantes com 4 horas de cultivo a 300 rpm obteve-se melhor sinal de expressão.

Embora a toxina Pet seja expressa numa diversidade de tempo de cultivo, da fase logarítmica à fase estacionária, vale a pena salientar que a proposta de utilização de um sobrenadante de crescimento bacteriano de 4 horas de cultivo a uma agitação constante de 300 rpm, além de ser o melhor momento para expressão, e a escolha de um meio de cultivo disponível comercialmente e de fácil preparo nos fez ganhar tempo na execução deste teste.

Além da pesquisa da expressão da toxina Pet, o gene *pet* também foi pesquisado pela técnica de PCR. O ensaio de PCR foi realizado seguindo-se basicamente o protocolo descrito por Gioppo e cols. (2002), no entanto fez-se necessário determinar-se através de um gradiente de temperatura qual a ideal para a hibridização utilizando-se os iniciadores descritos por estes autores. Os experimentos foram mais reprodutíveis quando se utilizou 50°C ao invés de 52°C. Das 141 amostras que apresentaram padrão de adesão agregativo pelo ensaio de adesão, 12 (8,5%) amostras o gene *pet* foi detectado. Destas, 11 (9,3%) referem-se a amostras provenientes de casos diarreicos e 1 (4,3%) de caso controle.

Observou-se que das 16 (11,3%) amostras que expressaram a toxina Pet em apenas 12 (8,5%) amostras detectou-se o gene *pet*. Estes dados sugerem que a seqüência dos iniciadores utilizada não possui uma boa

sensibilidade ou a seqüência de genes responsáveis pela expressão de Pet apresenta diferenças significativas. Estes resultados confirmam os resultados obtidos por Bellini (2001), que por *immunoblotting* observou que as amostras que foram reconhecidas pelo soro de coelho anti-Pet não apresentavam o gene para a toxina *pet*.

Embora Eslava e cols (1998) sugerissem que somente cepas produtoras de Pet são capazes de induzir diarreia, neste estudo determinou-se a baixa prevalência desta toxina. Porém, a associação do encontro desta toxina em casos controles não foi ainda estabelecida por dados estatísticos.

Os resultados da sorotipagem das amostras caracterizadas pelo padrão AA fornecidos para este estudo foram agrupados na intenção de se estabelecer a associação entre alguns sorotipos com as amostras de EAEC produtoras de Pet (**tabela 3**). Face aos resultados obtidos com este agrupamento, observou-se também a existência de alguns antígenos H conservados entre diferentes sorogrupos (O15:H18, O86:H18, O76:H33, O92:H33), como já observados por Ørskov e cols (1990) em cepas de EPEC e Nataro, Kaper (1998) em EAEC, assim como a existência de um grande número de amostras não tipáveis quanto ao antígeno O (VIAL *et al.*, 1988) e de amostras imóveis ou não tipáveis pelo Ag H (NATARO, KAPER, 1998; OKEKE, NATARO, 2001).

O sorotipo O44:H18 o qual caracteriza a cepa 042 utilizada neste estudo como protótipo da produção de Pet não foi encontrado em nenhuma destas amostras mostrando a baixa prevalência deste sorotipo em nosso meio, porém o sorotipo O3:H2 que caracteriza a cepa 17-2 de EAEC foi o sorotipo mais encontrado.

Também foi observado nas amostras de EAEC, utilizadas neste estudo, uma grande diversidade de sorotipos. No entanto, algumas amostras de EAEC descritas pertencem a sorogrupos comumente encontrados em amostras de EPEC: O86 e O128. Neste caso, há diversas evidências epidemiológicas de que estas amostras estejam associadas à diarreia infantil.

Das 16 amostras caracterizadas pela expressão de Pet, sete foram caracterizadas como sorotipo ONT:H⁻, duas como sorotipo ONT:H28, uma como sorotipo ONT:H9, duas como sorotipo O92:H33, uma como sorotipo O99:H4, uma como sorotipo O106:H⁻, uma como sorotipo O112:H⁻ e uma correspondente ao grupo controle como sorotipo O126:H2, não sendo observada associação entre sorotipo e expressão da toxina Pet.

Para melhor entender a transmissão e fatores de risco da EAEC, fazem-se necessários a descrição e estudos de surtos de diarreia que a envolvem. A habilidade para se fazer isso dependerá do desenvolvimento de testes diagnósticos que possam ser usados como ferramenta de identificação na rotina laboratorial.

A técnica de *immuno-dot* utilizada em diferentes sistemas biológicos na detecção tanto de antígenos como de anticorpos tem se mostrado extremamente sensível e específica. Na detecção de diferentes enteropatógenos, Bocatto e cols. (1997) utilizando soros polivalentes comercialmente disponíveis observaram um bom índice de concordância entre a técnica de *dot*-ELISA e a cultura bacteriológica.

Na detecção de intimina em amostras de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) o ensaio de *immuno-dot* foi

recentemente descrito como uma alternativa factível de método de captura (KOGA *et al.*, 2003).

Apesar da baixa prevalência de amostras EAEC produtoras de Pet, neste estudo padronizou-se um teste rápido, sensível, específico e de baixo custo para pesquisa desta toxina mostrando o potencial diagnóstico deste ensaio para uso em inquéritos epidemiológicos, o que poderá permitir determinar o papel da Pet no desenvolvimento de diarreia aquosa.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo concluiu-se que:

- O padrão de adesão agregativa em células HEp-2 e HeLa ainda é o método diagnóstico mais preciso para identificação de EAEC.
- Utilizando-se soro policlonal anti-Pet o ensaio de *immuno-dot* mostrou-se reprodutível, sensível e específico para detecção da toxina Pet.
- O *immuno-dot* é uma metodologia mais específica e sensível para a detecção de EAEC produtora de Pet quando comparada ao método de PCR.
- O ensaio de *immuno-dot* pode ser usado na detecção de Pet como substituto do PCR privilegiando a rotina laboratorial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

BELLINI, E. M. **Pesquisa de anticorpos contra *Plasmided Encoded Toxin (Pet)* em soros de crianças com diarreia aguda por *Escherichia coli* enteroagragativa**. São Paulo, 2001. 75f Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BOCCATTO, E.; SANTOS, S. A.; MAZIERI, N. A. ANDRADE, D. R.; CARRAZA, F.; YAMAGUITA, R. M. Evaluation of a rapid screening assay for bacterial identificat (Dot-ELISA) in fecal samples from children. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.39,p.21-27, 1997.

BOUZARI, S.; JAFARI, A.; FARHOUDI-MOGHADDAM, A. A.; SHOKOUHI, F.; PARSI, M. Adherence of non-enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **J Med Microbiol**, v.40, p.95-97, 1994.

BOYER, H. W.; ROULLAND-DUSSOIX, R. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. **J Mol Biol**, v.41, p.459–468, 1969.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p.248-254, 1976.

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

CLARK, S. C.; HAIGH, R. D.; FREESTONE, P. P. E.; WILLIAMS, P. H. virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. **Clin Microbiol Rev**, v.16, p.365-378, 2003.

COHEN, M. B.; HAWKINS J. A. WECKBACH, L. S.; STANEEK, J. L.; LEVINE, M. M.; HECK, J. E. Colonization by enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol**, v.31, p.351-353, 1993.

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

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

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

DEBROY, C., BRIGHT, B. D.; WILSON, R. A. ; YEALY, J.; KUMAR, R.; BHAN, M. K. Plasmid-coded DNA fragment developed as a specific gene probe for the identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Med Microbiol**, v.41, p.393-398, 1994.

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

ELIAS, W. P. JR.; CZECHULIN, J. R.; HENDERSON, I. R.; TRABULSI, L. R.; NATARO, J. P. The organization of biogenesis genes for aggregative adherence fimbria II (AAF/II) defines a virulence gene cluster in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v.181, p.1779-1785, 1999.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin. **Immunochemistry**, v.8, p.871, 1971.

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

ESLAVA, C.; VILLASECA, J.; MORALES, R.; NAVARRO, A. CRAVIOTO, A. Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative *Escherichia coli*, abstr. B-105, p. 44: 1993. In Abstract of the 93 rd General Meeting of the American Society for Microbiology 1993. **American Society for Microbiology**, Washington, D.C.

EVANS, D. G., SILVER, R. P., EVANS, D. J. CHASE JR., D. G., GORBACH, S. L. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. **Infect immune**, v.12, p.656-667, 1975.

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

FARUQUE, S. M.; HAIDER, K.; RAHMAN, M. M.; ABDUL-ALIM, A. R. M.; BAQUI, A. H.; AHMAD, Q. S.; *et al.* Evaluation of a DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli* from children with diarrhea in Bangladesh. **J Diarrhoeal Dis Res**, v.10, p.31-34, 1992.

FERNANDES-FILHO, A.; MONTEMOR, L. P.G.; GOMES, T. A. T.; SANTOS-FILHO, L.; TRABULSI, L. R.; MARTINEZ, M. B. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in João Pessoa, Brazil. ASM 103rd General Meeting, Washington, D.C. pp. 139, 2003.

GASCON, J.; VARGAS, M.; QUINTÓ, L.; CORACHÁN, M.; JIMÉNEZ DE ANTA, M. T.; VILA, J. Enteroaggregative *Escherichia coli* strains as a cause of traveler's diarrhea: a cause-control study. **J Infect Dis**, v.177, p. 1409-1412, 1998.

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

GIRÃO, D. M.; GIRÃO, V. B. C.; GOMES, T. A. T.; TRABULSI, L. R. Etiologic profile of infantile diarrhea in Rio de Janeiro. XXI Brazilian Microbiology Meeting, p. 123, 2001.

GOMES, T. A. T.; ABE, C. M.; MARQUES, L. R. M. Detection of HeLa Cell-Detaching Activity and Alpha-Hemolysin Production in enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from feces of brazilian children. **J Clin Microbiol**, v.33, p.3364, 1995.

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

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

GONZÁLES, R.; DIAZ, C.; MARIÑO, M.; CLORALT, R.; PEQUENEZE, M.; PÉREZ-SCHAEEL, I. Age-specific prevalence of *Escherichia coli* with localized and aggregative adherence in Venezuelan infants with acute diarrhea. **J Clin Microbiol**, v.35, p.1103-1107, 1997.

HAIDER, K.; FARUQUE, S. M.; SHAHID, N. S.; ALBERT, M. J.; NAHAR, S.; MALEK, A. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* infections in Bangladeshi children: clinical and microbiological features. **J Diarrhoeal Dis Res**, v.9 p.318-322, 1991.

HAWKES, R.; NIDAY, E.; GORDON, J. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. **Anal Bio Chem**, v.119, p.142-147, 1982.

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

HENDERSON, I. R.; NATARO, J. P. Virulence functions of autotransporter proteins. **Infect Immun.**, v.69, p. 1231–1243, 2001

HICKS, S.; CANDY, D. C. A.; PHILLIPS, A. D. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa In Vitro. **Infect Immun**, v.64, p.4751-4760, 1996.

ITOH, Y.; NAGANO, I.; KUNISHIMA, M.; ESAKI, T. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. **J Clin Microbiol**, v35, p.2546-2550, 1997.

JIANG, Z.; DAVID, G.; NATARO, J. P.; STEFFEN, R.; DUPONT, H. L. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. **J Clin Microbiol**, v40, p.4185-4190, 2002.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli* **Microbiology**, v.12, p.123-140, 2004.

KAUFMANN, F. Zur serologie der coli gruppe. **Acta Pathol Microbiol Scand**, v.21, p.20-45, 1947.

KIM, K. H.; SUH, I. S.; KIM, J. M.; KIM, C. W.; CHO, Y. J. Etiology of childhood diarrhea in Korea. **J Clin Microbiol**, v.27, p.1192-1196, 1989.

KNUTTON, S.; SHAW, R. K.; BHAN, M. K.; SMITH, H. R.; MCCONNELL, M. M.; CHEASTY, T.; WILLIAMS, P. H.; BALDWIN, T. J. Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere in vitro to human intestinal mucosa. **Infect Immun**, v.60, p.2083-2091, 1992.

KOGA, P. C. M.; MENEZES, C. A.; LIMA, F. A. L.; NARA, J. M.; MAGALHÃES, C. A.; CIANCIARULLO, A. M.; *et al.* Polyclonal anti-intimin antibody: immunological characterization and it use in EPEC and EHEC diagnosis. **Braz J Microbiol**, v34, p.5-7, 2003.

LAW, D.; CHART, H. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Appl Microbiol**, v.84, p.685-697, 1998.

LIBERATORE, A. M. A.; TOMITA, S. K.; VIEIRA, M. A.M.; GOMES, T. A. T. Ocorrência de amostras de *Escherichia coli* com padrão de adesão agregativa

em diferentes materiais clínicos obtidos de eqüinos. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 1999. Sociedade Brasileira de Microbiologia, Salvador, BA. **Abstracts** MV111, p. 162.

LIMA, A. A. M.; MOORE, S. R.; BARBOZA JÚNIOR, M. S.; SOARES, A. M.; SCHLEUPNER, M. A.; NEWMAN, R. D.; *et al.* Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: A prospective cohort study among children in northeastern Brazil. **J Infect Dis**, v.181, p.1643-1651, 2000.

MARTINEZ, M. B.; TADDEI, C. R.; RUIZ-TAGLE, A.; TRABULSI, L. R.; GIRÓN, J. A. Antibody response of children with enteropathogenic *Escherichia coli* infection to the bundle-forming pilus and LEE-encoded virulence determinants. **J Infect Diseases**, v.179, p.269-274, 1999.

MAYER, H. B.; WANKE, C. A. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a possible cause of diarrhea in an HIV-infected patient. **N Engl J Med**, v.332, p.273-274, 1995.

MONTEIRO-NETO, V. **Caracterização fenotípica e molecular da virulência de amostras de *Escherichia coli* O111:H12**. São Paulo, 1999. Tese de Doutorado-Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

MONTEIRO-NETO, V.; BANDO, S. Y.; MOREIRA-FILHO, C. A.; GIRON, J. A. Characterization of the outer membrane protein associated with haemagglutination and adhesive properties of enteroaggregative *Escherichia coli* O111:H12. **Cellular Microbiology**, v.5, p.533-547, 2003.

MORAIS, T. B.; GOMES, T. A. T.; SIGULEM, D. M. Enteroaggregative *Escherichia coli* in infant feeding bottles. **Lancet**, v.349, p.1448-1449, 1997.

MOREIRA, C. G. **Fatores de Virulência e o Papel da Fímbria Tipo I na Adesão Agregativa de Amostras de *Escherichia coli* do Sorotipo O128:H35**. 2001. 133f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MOREIRA, C. G., CARNEIRO, S. M., NATARO, J. P., TRABULSI, L. R., ELIAS, W. P. Role of type fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett**, v.226, p.79-85, 2003.

NATARO, J. P.; HICKS, S.; PHILLIPS, A. D.; VIAL, P. A.; SEARS, C. L. T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. **Infect Immun**, v.64, p.4761-4768, 1996.

NATARO, J. P.; KAPER J. B.; BROWNE, R. R.; PRADO, V.; VIAL, P.; LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr Infect Dis J**, v.6, p.829-831, 1987.

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

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

NATARO, J. P.; STEINER, T.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis**, v.4, p.251-261, 1998.

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

NATARO, J. P. YIKANG, D.; YINGKANG, D.; WALKER, K. AggR, a transcriptional activator of aggregative *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v.176, p.4691-4699, 1994.

NATARO, J. P. YIKANG, D.; GIRÓN, J. A.; SAVARINO, S. J.; KOTHARY, M. H.; HALL, R. Aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions. **Infect Immun**, v.61, p.1126-1131, 1993.

NAVARRO-GARCIA, F.; CANIZALES-ROMAN, A.; LUNA, J.; SEARS, C.; NATARO, J. P. Plasmid-encoded toxin of enteroaggregative *Escherichia coli* is internalized by epithelial cells. **Infect Immun**, v.69, p.1053-1060, 2000.

NAVARRO-GARCIA, F.; ESLAVA, C.; VILLASECA, J. M.; LÓPEZ-REVILLA, R.; CZECHULIN, J. R.; SRINIVAS, S.; NATARO, J. P.; CRAVIOTO, A. In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v.66, p.3149-3154, 1998.

NAVARRO-GARCIA, F.; SEARS, C.; ESLAVA, C.; CRAVIOTO, A.; NATARO, J. P. Cytoskeletal effects induced by Pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v.67, p.2184-2192, 1999.

OKEKE I. N.; NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **The Lancet Infect Dis**, v.1, p. 304-312, 2001.

ØRSKOV, F.; WHITTAM, T. S.; CRAVIOTO, A.; ØRSKOV, I. Clonal relationships among classic enteropathogenic *Escherichia coli* belonging to different O groups. **J Infect Dis**, v.162, p. 76-81, 1990.

PAI, M.; KANG, G. RAMAKRISHNA, B. S.; VENKATARAMAN, A.; MULIYIL, J. An epidemic of diarrhoeae in South India caused by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Indian J Med Res**, v.106, p. 7-12, 1997.

PATEL, S. K.; DOTSON, J.; ALLEN, K. P.; FLECKENSTEIN, J. M. Identification and molecular characterization of EatA, an autotransporter protein of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v.72, p.1786-1794, 2004.

PAUL, M.; TSUKAMOTO, T.; GHOSH, A. R.; BHATTACHARYA, S. K.; MANNA, B.; CHAKRABARTI, S., *et al.* The significance of enteroaggregative *Escherichia coli* in etiology of hospitalized diarrhoea in Calcutta, India and the demonstration of a new honey-combed pattern of aggregative adherence. **FEMS Microbiol. Lett**, v.117, p.319-326, 1994.

RAJAKUMAR, K.; SASAKAVA, C.; ADLER, B. Use a novel approach, termed island probing, identifies the *Shigella flexneri* the pathogenicity island which encodes a homolog of the immunoglobulin A protease-like family of proteins. **Infect Immun.**, v.5, p.4606-4614, 1997.

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

ROSA, A. C. P.; MARIANO, A. T.; PEREIRA, A. M. S.; TIBANA, A.; GOMES, T. A. T.; ANDRADE, J. R. C. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. **J Med Microbiol**, v.47, p.781-791, 1998.

RUSSO, T. A. & JOHNSON, J. R. Proposal a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli* ExPEC. **J Infect Dis**, v.181, p 1753-1754, 2000.

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

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

SAVARINO, S. J.; FOX, P.; YIKANG, D.; NATARO, J. P. Identification and characterization of a gene cluster mediating enteroaggregative adherence fimbria I biogenesis. **J Bacteriol**, v.176, p.4949-4957, 1994.

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

SCALETSCKY, I. C. A.; FABBRICOTTI, S. H.; ARANDA, K. R.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. Comparasion of DNA hybridization and PCR assays for detection of putative pathogenic enteroadherent *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol**, v.40, p. 1254-1258, 2002 b.

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

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

SHEIKH, J. *et al.* A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J Clin Invest**, v.110, p. 1329-1337, 2002.

SOUZA, E. C.; MARTINEZ, M. B.; TADDEI, C. R.; MUKAI, L.; GILIO, A. E.; RACZ M. L.; *et al.* Perfil etiológico das diarreias agudas de crianças atendidas em São Paulo. **J Pediatr**, v. 78, p. 31-38, 2002.

SMITH, H. R.; CHEASTY, T.; ROWE, B. Enteroaggregative *Escherichia coli* and outbreaks of gastroenteritis in UK. **Lancet**, v.350, p. 814-815, 1997.

SOUZA, A.; BLANCO, J.; ANDRADE, J. R. C.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; RICCI, L. C.; YAMADA, A.; *et al.* Possíveis novos mecanismos de patogenidade de amostras de *Escherichia coli* não toxigênicas isoladas de suínos com diarreia. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 1997. Sociedade Brasileira de Microbiologia, Rio de Janeiro, RJ. **Abstracts**. MV-030, p.118

STEINER, T. S.; NATARO, J. P.; POTEET-SMITH, C. E.; SMITH, J. A.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. **J Clin Invest**, v.5, p.1769-1777, 2000.

SUI, B. Q.; DUTTA, P. R.; NATARO, J. P. Intracellular expression of the plasmid-encoded toxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v.71, p.5364-5370, 2003.

SUZART, S.; GUTH, B.E.; PEDROSO, M. Z.; OKAFOR, U. M.; GOMES, T. A. Diversity of surface structures and virulence genetic markers among enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains with and without the EAEC DNA probe sequence. **FEMS Microbiol Lett**, v.201, p.16-23, 2001.

VIAL, P. A.; ROBINS-BROWNE, R.; LIOR, H.; PRADO, V.; KAPER J. B.; NATARO, J. P.; MANEVAL, D.; ELSAYED, A.; LEVINE, M. M. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. **J Infect Dis**, v.158, p70-79, 1988.

VILLASECA, J. M.; NAVARRO-GARCIA, F.; MENDOZA-HERNÁNDEZ, G.; NATARO, J. P.; CRAVIOTO, A.; ESLAVA, C. Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. **Infect Immun**, v.68, p.5920-5927, 2000.

WAI, S. N.; TAKADE, A.; AMAKO, K. The hydrophobic surface protein layer of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **FEMS Microbiol Lett**, v.135, p.17-22, 1996.

WANK, C. A.; CRONAN, S.; GOSS, C.; CHADEE, K.; GUERRANT, R.L.
Characterization of binding of *Escherichia coli* strains which are enteropathogens to small-bowel mucin. **Infect Immun** v.58, p.794-800, 1990.

WANK, C. A.; SCHORLING, J. B.; BARRET, L. J.; DE SOUZA, M. A.;
GUERRANT, R. L. Potential role of adherence traits of *Escherichia coli* in persistent diarrhea in a urban Brazilian slum. **Pediatr Infect Dis J**, v.10, p.746-751, 1991.

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