

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO BIOMÉDICO
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Strictu-Sensu* EM MICROBIOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

Lavicie Rodrigues Arais

Orientador: Prof^o Dr. Aloysio de Mello Figueiredo Cerqueira

Co-orientadora: Prof^a Dra. Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral

Niterói, Fevereiro de 2010.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LAVICIE RODRIGUES ARAIS

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE *ESCHERICHIA COLI*
ENTEROPATOGÊNICA ATÍPICA ISOLADA DE CÃES E DE HUMANOS.**

Niterói, Fevereiro de 2010.

LAVICIE RODRIGUES ARAIS

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE *ESCHERICHIA COLI*
ENTEROPATOGÊNICA ATÍPICA ISOLADA DE CÃES E DE HUMANOS.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre.

Banca examinadora:

Prof. Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dra. Rosana Rocha Barros
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Walter Lilenbaum
Universidade Federal Fluminense

Niterói, 24 de Fevereiro de 2010.

A659 Arais, Lavicie Rodrigues

Caracterização genotípica e fenotípica de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica isolada de cães e de humanos / Lavicie Rodrigues Arais.-Niterói: [s.n.], 2010.
77 f. :il.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense, 2010.

1. *Escherichia coli* Enteropatogênica. 2. Cães. 3. Humanos. I.
Título

*Dedico este trabalho
ao meu marido Antonio,
amor da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela dádiva da vida.

Agradeço ao meu marido Antonio Eduardo Bier Longhi por todo amor, apoio, carinho, amizade e companheirismo, em todos os momentos;

Agradeço à minha família que sempre esteve ao meu lado e me apoiou, em especial os meus queridos pais Yeddo Renato Arais e Elaine Rodrigues Arais, que fizeram de mim o que sou hoje e aos quais não tenho palavras para expressar meu amor. Agradeço também aos meus queridos irmãos Vicente e Gustavo;

Ao Professor Doutor Aloysio de Mello Figueiredo Cerqueira, meu orientador e amigo, agradeço toda atenção, paciência, esforço e ensinamentos na orientação deste trabalho, desde a preparação do projeto até a conclusão do mesmo, e também por ter me dado esta oportunidade.

À Professora Doutora Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral, co-orientadora deste trabalho, pelo apoio, prestatividade e ensinamentos realizados desde o início do mesmo, além do fornecimento de cepas de origem humana;

À Doutora Mônica Vieira pela valiosa colaboração, trocas de emails e ensinamentos, além do auxílio com os experimentos realizados na UNIFESP;

Ao Prof. Dr. Dennys Girão, pelo apoio e fornecimento de cepas humanas;

Aos Professores participantes da banca, agradeço e me sinto honrada por terem aceitado o convite.

Aos Professores que participaram deste curso de pós graduação, pelos ensinamentos e dedicação prestados durante suas aulas.

Aos amigos e colegas que estiveram ao meu lado e dividiram comigo as dificuldades e os aprendizados durante a realização deste trabalho. Em especial aos amigos Camila Hammond Regua-Mota, Cecília Matheus-Guimarães, Davi Heckert da Costa, Tatiana Didonet Lemos, Daniele Pacheco Alves, Luciana Justo, Daniela Prado e Guilherme Barandas;

Aos amigos, que apesar de longe, sempre foram apreciadores e incentivadores da pesquisa: Melissa Maria Heinrich e Gabriel Vieira Soares.

Agradeço à técnica Laura Maria Dantas pelo carinho e apoio a todos do laboratório de Enteropatógenos e Microbiologia de Alimentos da UFF;

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

RESUMO

Cepas atípicas de *Escherichia coli* enteropatogênica (aEPEC) são consideradas patógenos emergentes e vêm sendo detectadas de modo crescente em animais e humanos. No Brasil, aEPEC é atualmente mais prevalente que as cepas típicas de EPEC. O presente trabalho teve como objetivo a comparação de isolados de aEPEC recuperados de cães e de crianças, por meio de sua caracterização genética e fenotípica. Foram estudados 15 isolados caninos e 5 isolados humanos de aEPEC provenientes de material fecal diarréico. Isolados dos sorotipos O51:H40, O4:H16, O11:H16 e O49:H10, foram recuperados de crianças e de cães. Os demais isolados, dos sorotipos O28:H16, O2:H19, O181:H18, O159:H23, O156:H- e O117:H40, foram recuperados apenas de cães. Foram investigados, através de PCR, diversos marcadores genéticos, cromossômicos ou plasmidiais, associados ou não ao locus LEE, e descritos em outros patótipos de *E. coli*. Testes fenotípicos incluíram a adesão celular “in vitro” em células Caco-2 e a produção de hemolisinas. A similaridade genética foi avaliada por meio do perfil plasmidial e de amplificação através do RAPD-PCR. A maioria (65%) dos isolados apresentou os subtipos β ou γ do gene *eae* e 50% e 60% dos isolados foram do subtipo α na subtipagem de *tir* e *espB*, respectivamente. Já na subtipagem do gene *espA*, foram detectados os subtipos α e β em 46,6% (n=7) e 40% (n=6) dos isolados caninos, respectivamente. Nenhum isolado humano foi positivo para o gene *ehxA*, e 60% foram positivos para *α -hlyA*, enquanto nenhum isolado canino foi positivo para estes dois genes. Entretanto, no teste fenotípico, apenas um isolado humano do sorotipo O51:H40 produziu enterohemolisina. Os genes *efa-1*, *iha* e *astA* foram detectados em 20% e 40%, 100% e 0% e 0% e 13.3% dos isolados humanos e caninos, respectivamente. Os genes *tccp2* e *tccp* foram detectados em 60% e 20% dos isolados humanos, e 26,7% e 6,7% dos isolados caninos. Adicionalmente, 85% dos isolados foram positivos para o gene *fimH*. Todos os isolados foram negativos para os genes *afa*, *cnf1*, *kps*, *pap*, *stx2f* e *aggR*. Todos os isolados humanos apresentaram os subtipos *lpfA1-2* e *lpfA2-1* de Lpf, enquanto apenas 6/15 dos isolados caninos foram típicos, sendo que um deles apresentou dois subtipos de *lpfA1* (*lpfA1-2* e 1-5) associado a *lpfA2-1*. O dendograma construído após os ensaios de RAPD-PCR agrupou os isolados em 5 tipos (I a V), sendo que todos isolados de origem humana e canina de sorotipos comuns formaram um agrupamento com mais de 75% de similaridade genética (tipo I). Na extração plasmidial, 18 dos 20 isolados apresentaram plasmídeos de alto peso molecular. Uma aderência de moderada a intensa foi caracterizada em ensaios de 6 horas com a maioria dos isolados (90%) apresentando um padrão de aderência localizada “like” (ALL), sendo que em dois destes, o padrão ALL estava associado com aderência periférica na forma de cordões, semelhante à aderência agregativa. Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que os isolados de aEPEC estudados apresentaram um perfil de virulência heterogêneo sendo mais diversificado em isolados de origem humana, inclusive entre isolados de mesmo sorotipo dos isolados caninos. No entanto, os marcadores de virulência detectados e a elevada similaridade genética demonstrada entre os isolados evidenciam um perfil patogênico, tanto para humanos como para animais, dos isolados de origem canina estudados.

Palavras chave: EPEC atípica, caninos, humanos.

ABSTRACT

Strains of atypical *Escherichia coli* (aEPEC) are considered emerging pathogens and have been increasingly detected in animals and humans. In Brazil, aEPEC is now more prevalent than the typical EPEC strains. This study aimed to compare aEPEC isolates recovered from dogs and children, by their genetic and phenotypic characterization. Were studied 15 canine and 5 human isolates of aEPEC from diarrheal faeces. Isolates of serotypes O51:H40, O4:H16, O11:H16 and O49:H10, were recovered from children and dogs. The remaining isolates, from serotypes O28:H16, O2:H19, O181:H18, O159:H23, O156:H-, O136:H- and O117:H40, were recovered only from dogs. Were investigated by PCR several genetical markers, chromosomal or plasmidial, associated or not with the LEE locus, and described in other pathotypes of *E. coli*. Phenotypic tests included the cell adherence in vitro in Caco-2 cells and the hemolysins production. The genetic similarity was evaluated by plasmidial profile and amplification by RAPD-PCR. The majority (65%) of isolates presented the β or γ subtypes of the *eae* gene and 50% and 60% of the isolates were of α subtype in *espB* and *tir*, respectively. In the subtyping of *espA* gene, were detected subtypes α and β in 46.6% (n = 7) and 40% (n = 6) respectively, of the canine isolates. None human isolate were positive for the *ehxA* gene, and 60% were positive for α -*hlyA* gene, while none of the canine isolates was positive for these two genes. However, in the phenotypic test, only one human isolate of serotype O51:H40 produced enterohemolysin. The *efa-1*, *iha* and *astA* genes were detected in 20% and 40%, 100% and 0% and 100% and 13.3% of human and canine isolates, respectively. The *tccP2* and *tccP* genes were detected in 60% and 20% of human isolates, and 26.7% and 6.7% of canine isolates. In addition, 85% of the isolates were positive for *fimH* gene. All isolates were negative for *afa*, *cnf1*, *kps*, *pap*, *stx2f* and *aggR* genes. All human isolates showed *lpfA1-2* and *lpfA2-1* subtypes of Lpf, while only 6/15 of the canine isolates were typeable, one of which showed two subtypes of *lpfA1* (*lpfA1-2* and *1-5*) associated with *lpfA2-1*. The dendrogram created after the RAPD-PCR tests, clustered the isolates into 5 types (I to V), with all the isolates from human and canine origin, which had common serotypes, formed a cluster with more than 75% of genetic similarity (type I). In plasmid profile analysis, 18 of 20 isolates had plasmids of high molecular weight. Moderate to intense adherence was observed in the 6 hours test with most isolates (90%) showing a localized-like adherence pattern (ALL), and in two of these, the default ALL adherence was associated with peripheral adherence in the form of strands, similar to the aggregative adherence. The results of this study showed that the aEPEC isolates evaluated had a heterogeneous virulence profile, which were more diverse in strains of human origin, including strains of similar serotype as the canine's serotypes. However, the virulence markers identified and the high genetic similarity demonstrated between the isolates, confirm the pathogenic profile for both, humans and animals, of the canine isolates studied.

Key-words: atypical EPEC, canine, human.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVO GERAL	14
2.1 Objetivos Específicos	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 <i>Escherichia coli</i>	15
3.2 Patotipos de <i>Escherichia coli</i>	15
3.2.1 Características do patotipo EPEC	16
3.2.2 Epidemiologia dos patotipos aEPEC e tEPEC	18
3.3 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica em cães e humanos	18
3.4 Genes de virulência em <i>Escherichia coli</i>	19
3.5 Adesão celular em <i>Escherichia coli</i>	23
3.6 Ensaio de PCR, RAPD-PCR e extração plasmidial em microbiologia	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Isolados Bacterianos	26
4.1.1 Isolados de <i>E. coli</i> provenientes de cães	26
4.1.2 Isolados de <i>E. coli</i> provenientes de humanos	26
4.2 Métodos	28
4.2.1 Ensaio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	28
4.2.1.1 Obtenção de DNA dos isolados	28
4.2.1.2 Pesquisa de marcadores de virulência do “locus” LEE e outros marcadores de virulência cromossomiais e plasmidiais	29
4.2.1.3 Controles positivos e negativos da PCR	29
4.2.1.4 Reação de PCR	31
4.2.1.5 Gel de agarose	31
4.2.2 Extração e perfil plasmidial	31
4.2.3 Amplificação Randômica de DNA Polimórfico (RAPD-PCR)	32
4.2.3.1 Obtenção de DNA	32

4.2.3.2	Reação de amplificação.....	33
4.2.3.3	Eletroforese em gel de agarose.....	33
4.2.3.4	Análise da similaridade genética dos isolados	33
4.2.4	Ensaio “in vitro” de aderência em células Caco-2.....	34
4.2.4.1	Ensaio de adesão	34
4.2.5	Produção de enterohemolisina e α -hemolisina.....	35
5	RESULTADOS.....	41
5.1	Ensaio de PCR para pesquisa de genes de virulência.....	41
5.1.1	Pesquisa de marcadores de virulência do “locus” LEE e marcadores de tEPEC e STEC... 41	41
5.1.2	Pesquisa de marcadores de virulência cromossomiais e plasmidiais	42
5.2	Extração e perfil plasmidial	44
5.3	Perfil genético gerado após ensaios de RAPD-PCR.....	45
5.4	Ensaio “in vitro” de aderência em células Caco-2.....	49
5.5	Produção de enterohemolisina e α-hemolisina	51
6	DISCUSSÃO.....	53
7	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Diagrama de Venn representando o conjunto dos sorotipos, e suas respectivas origens, de isolados de EPEC atípicas recuperados de cães e de humanos.....	28
Figura 2: Foto representativa de gel de agarose a 0,8% da extração plasmidial de isolados de <i>E. coli</i> provenientes de material fecal de caninos e humanos	44
Figura 3: Foto representativa do ensaio de RAPD-PCR com oligonucleotídeo 1254 com isolados aEPEC de humanos e caninos	46
Figura 4: Foto representativa do ensaio de RAPD-PCR com oligonucleotídeo 1252 com isolados de aEPEC de humanos e caninos.....	47
Tabela 1: Isolados de aEPEC de cães e humanos, com sua respectiva origem, idade e sintoma clínico principal, sorotipo, local e ano de isolamento e referência de isolamento, que foram utilizadas no presente estudo.	27
Tabela 2: Marcadores de virulência pesquisados em isolados de aEPEC de caninos e humanos no presente estudo	30
Tabela 3: Sequências e temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos empregados na caracterização dos genes do “locus” LEE, e tamanho do fragmento amplificado	36
Tabela 4: Sequências e temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos empregados para a pesquisa de genes de virulência cromossomiais, e tamanho do fragmento amplificado.....	38
Tabela 5: Sequências e temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos empregados para a pesquisa de genes de virulência plasmídeos ou fragmento de plasmídeo, e tamanho do fragmento amplificado.....	40
Tabela 6: Isolados de aEPEC de caninos e humanos quanto à presença (+) ou ausência (-) de genes de virulência cromossomiais e plasmídias pesquisados neste estudo.	42
Tabela 7: Isolados de aEPEC de caninos e humanos quanto à subtipagem de 6 variantes da fímbria polar longa do tipo 1 e 2 (<i>lpfA1</i> e <i>lpfA2</i>).	43
Tabela 8: Ocorrência de plasmídeos de alto e baixo peso molecular em 20 isolados aEPEC provenientes de material fecal diarréico de caninos e de humanos:	45
Tabela 9: Aderência em células Caco-2 de 20 isolados de aEPEC de origem canina e humana após 3 e 6 horas de incubação.	50
Tabela 10: Caracterização genotípica e fenotípica de isolados de aEPEC de origem canina e humana:	52

LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES

AA: adesão agregativa
AD: adesão difusa
A/E: lesão "attaching and effacing"
AEEC: "attaching and effacing" *Escherichia coli*
aEPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica atípica
Afa: adesina afimbrial I
afa: gene codificador de adesina afimbrial I
aggR: gene ativador transcripcional das adesinas fimbriais I e II de *Escherichia coli* enteroagregativa
AI: adesão indeterminada/irregular
AL: adesão localizada
ALL: adesão localizada "like"
AP: adesão periférica
astA: gene codificador de enterotoxina termoestável de *Escherichia coli* enteroagregativa
ATCC: "American Type Culture Collection"
BFP: "Bundle Forming Pilus"
bfpA: gene codificador de "Bundle Forming Pilus"
C: Celsius
Caco-2: linhagem celular derivada de adenocarcinoma de cólon
CLED: cistina lactose eletrolito-deficiente
cnf: gene codificador do fator de necrose citotóxica I
DAEC: *Escherichia coli* que apresenta aderência difusa
DEC: *Escherichia coli* diarreio gênica
DNA: ácido desoxirribonucléico
dNTP: desoxinucleotideo trifosfato
DO: densidade óptica
eae: gene codificador da intimina
EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativa
EAF: "Enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor"
EAST-1: enterotoxina termoestável de *Escherichia coli* enteroagregativa
Efa-1: *Escherichia coli* enterohemorrágica "factor for adherence"
efal: gene codificador de Efa-1
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica
EhxA: enterohemolisina
ehxA: gene codificador de enterohemolisina
EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasora
EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica
EspA: proteína estrutural do sistema de secreção do tipo III
espA: gene codificador de EspA
EspB: proteína secretada pelo sistema de secreção do tipo III, formadora do poro de membrana
espB: gene codificador da proteína formadora do poro de membrana, secretada pelo sistema de secreção do tipo III
Et al: e outros
ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica
ExPEC: *Escherichia coli* extra-intestinal

FAS: “Fluorescent Actin Staining”
g: grama
GL: Gay-Lussac
HeLa: linhagem celular derivada de câncer epitelial cervical
HEp-2: linhagem celular derivada de carcinoma laríngeo
HlyA: alfa-hemolisina de *Escherichia coli*
hlyA: gene que codifica a alfa-hemolisina de *Escherichia coli*
HUS: síndrome urêmica hemolítica
Iha: proteína homóloga a “iron regulated gene A” de *Vibrio cholerae*
iha: gene codificador de Iha
IrgA: “iron regulated gene A”
kb: kilobase
kps: gene codificador da cápsula do grupo II
LB: caldo Luria Bertani
LEE: “locus of enterocyte effacement”
LpfA: fímbria polar longa
lpfA1: gene codificador do subtipo 1 da fímbria polar longa
lpfA2: gene codificador do subtipo 2 da fímbria polar longa
M: molar
mA: miliampere
MDa: megadalton
mg: miligrama
µg: micrograma
µL: microlitro
mL: mililitro
mm: milímetro
mM: milimolar
MNEC: *Escherichia coli* causadora de meningite neonatal
µM: micromolar
ng: nanograma
N-WASP: “Wiskott-Aldrich syndrome protein”
PAI: ilha de patogenicidade
pap: gene codificador do pilus associado à pielonefrite
pb: pares de bases
PBS: solução salina tamponada
PCR: reação em cadeia da polimerase
pEAF: plasmídeo “Enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor”
pH: potencial hidrogeniônico
p/v: massa do soluto/volume da solução
RAPD-PCR: amplificação randômica de DNA polimórfico
REPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica específica de roedores
RFLP: polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição
rpm: rotação por minuto
STEC: *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga
Stx: toxina Shiga
Stx1: toxina Shiga - 1
stx: gene que codifica toxina Shiga
stx1 : gene que codifica toxina Shiga - 1
stx2 : gene que codifica toxina Shiga - 2
stx2f: gene que codifica a variante 2f da toxina Shiga

TAI: "tellurite resistance and adherence conferring island"
T3SS: sistema de secreção do tipo III
TBE: tampão Tris-Borato-ácido etilenodiamino tetra-acético
TSA: ágar triptona de soja
TSB: caldo triptona de soja
TccP: "Tir-cytoskeleton coupling protein"
tccP: gene codificador de "Tir-cytoskeleton coupling protein"
tccP2: gene codificador do alelo de "Tir-cytoskeleton coupling protein"
Tir: "translocated intimin receptor"
tir: gene codificador de "translocated intimin receptor"
U: unidade
UPEC: *Escherichia coli* uropatogênica
UPGMA: agrupamento pareado por médias aritméticas
UV: ultravioleta
V: Volt
v/v: volume/volume
%: por cento
®: marca registrada

1 INTRODUÇÃO

A partir de 1995 o conjunto de amostras do patotipo de *Escherichia coli* Enteropatôgena (EPEC), importante causador de diarreia em crianças, foi subdividido em cepas típicas e atípicas, em função de diferenças em suas características de virulência (KAPER, 1996). Desde então, e principalmente na última década, grande destaque tem sido dado às cepas atípicas de EPEC (aEPEC) pois, assim como as STEC (*Escherichia coli* produtora de toxina Shiga), elas são consideradas patógenos emergentes (TRABULSI et al, 2002).

No Brasil, aEPEC é atualmente mais prevalente que as cepas típicas de EPEC, que era tradicionalmente o agente mais comum de diarreia epidêmica em crianças (TRABULSI, KELLER & GOMES, 2002; revisado em ABE et al, 2009). A emergência e aumento na frequência de ocorrência de cepas aEPEC podem ter origem similar àquelas que levaram à emergência e aumento na frequência da O157:H7 e outros sorotipos de STEC (TRABULSI, KELLER & GOMES, 2002).

A relação desta bactéria com os animais é importante, pois, além dos prejuízos diretos à saúde animal, estes podem representar um vasto reservatório de patógenos humanos (TRABULSI, ORDOÑEZ & MARTINEZ, 2005). Apesar de ainda não ter-se comprovado qual o principal hospedeiro de aEPEC, este patotipo já foi isolado de caninos e de diversas outras fontes animais, tanto em animais com diarreia quanto em animais saudáveis. O seu potencial zoonótico ainda não pôde ser confirmado, apesar de estudos recentes terem encontrado cepas similares, e com potencial para causar infecção humana, em populações animais (NAKAZATO et al, 2004; KRAUSE, ZIMMERMANN, BEUTIN, 2005; revisado em HERNANDES et al, 2009).

Em relação aos cães, como animais de companhia, sabe-se que estão cada vez mais próximos dos humanos, muitas vezes sendo tratados como membros da família, não podendo assim, subestimar-se a sua importância como um potencial reservatório de alguns patógenos humanos.

Portanto, estudos que abordem a investigação da ocorrência, virulência e epidemiologia de aEPEC em animais são necessários para esclarecer a real importância destas cepas nestes hospedeiros e sua importância como reservatórios de cepas patogênicas para o ser humano.

2 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral a comparação de isolados de aEPEC recuperados de material fecal diarréico de cães e de crianças, por meio de sua caracterização genotípica e fenotípica.

2.1 Objetivos Específicos

- Identificação de genes de virulência cromossomiais e plasmidiais em isolados de aEPEC de cães e humanos;
- Comparação do perfil genotípico com o perfil apresentado após amplificação randômica do DNA polimórfico e extração plasmidial, com a finalidade de avaliar a similaridade destes isolados de cães e crianças;
- Avaliação do perfil de aderência destes isolados em células intestinais “in vitro”.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli pertence à família Enterobacteriaceae, que é uma importante família bacteriana, justamente por pertencer a ela o ser vivo mais conhecido (*E. coli* K12), e importantes patógenos para os seres humanos e animais (TRABULSI, ORDOÑEZ & MARTINEZ, 2005). Apresentam-se como bastonetes, Gram negativos, facultativamente anaeróbios, móveis ou imóveis, não-esporulados, capazes de fermentar a glicose com produção de ácido e gás (SCHROEDER et al, 2002; FRANCO & LANDGRAF, 2002).

Trata-se de uma espécie bacteriana incrivelmente diversificada e com a capacidade de colonizar e persistir em vários nichos, tanto no ambiente quanto no hospedeiro. Tanto *E. coli* quanto outros microrganismos comensais da microbiota intestinal de mamíferos, freqüentemente formam uma relação simbiótica benéfica com seu hospedeiro, fornecendo nutrientes, regulação imune e proteção contra patógenos externos (YAN & POLK, 2004).

De fato a maioria das cepas é constituída por microrganismos comensais, contudo algumas cepas de *E. coli* podem exibir um caráter patogênico, apresentando a capacidade de causar doenças graves no hospedeiro (KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004). Este patógeno, além de estar entre os principais agentes de infecção hospitalar, constitui a principal causa de infecção intestinal de humanos em muitos países (TRABULSI, ORDOÑEZ & MARTINEZ, 2005).

3.2 Patotipos de *Escherichia coli*

A *E. coli* é capaz de causar doença em indivíduos saudáveis, podendo ocasionar, principalmente em humanos, três síndromes clínicas distintas: doença entérica/intestinal, infecções do trato urinário ou sepse/meningite. Dentre as *E. coli* diarreiogênicas (DEC) existem seis categorias já descritas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* difusamente aderida (DAEC) (NATARO e KAPER, 1998; KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004). ETEC, EAEC e EHEC são produtores de toxinas; EPEC, EAEC e DAEC expressam padrões de aderência característicos (localizado, agregativo e difuso, respectivamente) a células epiteliais e são então referidas

como *E. coli* enteroaderentes; EIEC é distinguida pela capacidade de invadir células epiteliais e inabilidade de produzir toxinas (NATARO & KAPER, 1998). Dentro do patotipo EHEC, estão incluídas as cepas EHEC que produzem a toxina Shiga (STEC), e que estão associadas a diversos surtos e casos esporádicos de diarreia, colite hemorrágica ou até mesmo complicações como a síndrome urêmica-hemolítica (HUS), no mundo (NATARO & KAPER, 1998) e associadas a casos de diarreia no Brasil (GUTH et al, 2002). Além dos patotipos DEC, existem as cepas de *E. coli* que causam infecções extra-intestinais (ExPEC), e entre estas estão incluídas as cepas uropatogênicas (UPEC), que são o principal agente etiológico das infecções do trato urinário em humanos, e as cepas causadoras de meningite neonatal (MNEC) (FRANZOLIN, CAMPOS & TRABULSI, 2005).

3.2.1 Características do patotipo EPEC

EPEC foi o primeiro patotipo de *E. coli* a ser descrito, devido a surtos de diarreia em crianças no Reino Unido em 1945 (KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004). A Organização Mundial de Saúde reconhece que as cepas de EPEC estão compreendidas entre 12 sorogrupos O: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158 (WHO, 1987, revisado em HERNANDES et al, 2009), também conhecidas como sorogrupos clássicos de EPEC.

Desde 1995 o patotipo EPEC é dividido em dois subgrupos denominados EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC) (KAPER, 1996). Como características comuns, possuem a capacidade de formar a lesão A/E (“attaching and effacing”) no epitélio intestinal, característica também compartilhada com as cepas EHEC e com o patógeno *Citrobacter rodentium* (WALES, WOODWARD & PEARSON, 2005), e a não produção da toxina Shiga. As principais diferenças são referidas aos sorotipos e à presença do plasmídeo pEAF (plasmídeo do fator de aderência de EPEC) somente nas tEPEC, o qual carrega genes para a regulação das funções do LEE (“locus of enterocyte effacement”) e para a formação do Bfp (“bundle-forming pilus”), que é uma fímbria tipo IV (KAPER, 1996; GARMENDIA et al, 2005). O “locus” LEE é uma ilha de patogenicidade (PAI) na qual estão localizados os determinantes genéticos para a produção da lesão A/E (McDANIEL & KAPER, 1997).

Sendo EPEC um patógeno Gram negativo, diferentemente dos Gram positivos, apresenta em sua estrutura uma membrana externa que dificulta o processo de secreção de proteínas. Para tal, desenvolveu mecanismos mais complexos de secreção como o sistema de

secreção tipo III (T3SS). Não somente EPEC, mas vários patógenos Gram negativos utilizam este sistema de secreção para injetar proteínas efetoras diretamente no citoplasma das células eucarióticas (SAIER, 2004). LEE codifica este T3SS, além de proteínas secretadas, chaperoninas, reguladores, a adesina de membrana externa intimina e seu receptor translocado Tir (GARMENDIA et al, 2005), que é a principal proteína efetora necessária para a formação da lesão A/E, a qual, uma vez translocada, é integrada pela membrana plasmática da célula mamífera, servindo como receptor para a proteína intimina (KENNY et al, 1997).

O pilus Bfp participa no primeiro contato da bactéria com a célula hospedeira, levando à formação de agrupamentos bacterianos na superfície celular que determinam o padrão de aderência localizada (AL) apresentado pelas tEPEC. As aEPEC não expressam Bfp, e geralmente apresentam um padrão de aderência localizada “like” (ALL); algumas cepas, no entanto, mostram um padrão de aderência difusa (AD) ou agregativa (AA) (NATARO & KAPER, 1998; VIEIRA et al, 2001; TRABULSI & ORDONEZ, 2005), ou são até mesmo não aderentes (revisado em HERNANDES et al, 2009).

A colonização da mucosa do intestino com a formação de lesões A/E é caracterizada pela aderência íntima do patógeno ao epitélio intestinal do hospedeiro, com apagamento localizado das microvilosidades (KNUTTON, LLOYD & McNEISH, 1987). Esta lesão é associada com o rearranjo drástico do citoesqueleto celular da célula hospedeira, resultando na produção de estruturas semelhantes a pedestais, ricas em actina polimerizada (FRANKEL et al, 1998).

Reconhecem-se dois perfis de aEPEC: aquelas que expressam apenas fatores de virulência codificados pela região LEE e aquelas que expressam fatores de virulência codificados pelo “locus” LEE e também expressam os fatores de virulência não codificados por ele. Todos os sorotipos de aEPEC, com exceção do O125ac:H6, incluem ambos os tipos de cepas. A ocorrência de mais de um tipo de cepa na maior parte dos sorotipos atípicos é mais uma diferença interessante entre EPEC típica e atípica (TRABULSI, KELLER e GOMES, 2002). Alguns sorotipos, como o O51:H40, que é frequentemente isolado de crianças com diarreia, compreende cepas classificadas como aEPEC e também algumas classificadas como tEPEC (MOREIRA et al, 2008).

As aEPEC são mais próximas de STEC do que as tEPEC em características genéticas, sorotipos, produção de toxinas, reservatórios e outros aspectos epidemiológicos. As cepas de aEPEC podem ser menos virulentas que as cepas típicas pela ausência do pEAF, porém isso

ainda não foi provado, pois estes organismos possuem outros fatores de virulência que podem compensar a ausência do pEAF (TRABULSI, KELLER e GOMES, 2002).

3.2.2 Epidemiologia dos patótipos aEPEC e tEPEC

Uma diferença epidemiológica entre EPEC típica e atípica é sua distribuição geográfica. No passado, os sorotipos típicos epidêmicos eram frequentemente identificados em países industrializados como causa de surtos e casos esporádicos de diarreia em humanos, mas atualmente estes relatos são menos frequentes (NATARO & KAPER, 1998). Nestes países, atualmente, os sorotipos atípicos predominam (SCOTLAND et al, 1996; BOKETE et al, 1997; AFSET, BERGH & BEVANGER, 2003; BLANCO et al, 2006b).

No entanto, o mesmo parece estar ocorrendo nos países em desenvolvimento, já que alguns estudos têm mostrado um frequência muito baixa de tEPEC, e uma frequência relativamente alta de aEPEC (TRABULSI, KELLER & GOMES, 2002; RODRIGUES et al, 2004a; GOMES et al, 2004; BUERIS et al, 2007; SCALETSKY et al, 2009; revisado em HERNANDES et al, 2009; CONTRERAS et al, 2010; MORENO et al, 2010).

A razão para estas alterações, igualmente às ocorridas nos Estados Unidos da América (EUA) e na Europa, ainda não está clara, podendo ser devido ao aprimoramento das terapias, das condições sanitárias e do controle das infecções hospitalares (TRABULSI, KELLER & GOMES, 2002).

3.3 *Escherichia coli* enteropatogênica em cães e humanos

A diarreia continua sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em crianças no mundo inteiro e, entre os patógenos bacterianos causadores, as cepas DEC são um importante agente de diarreia endêmica e epidêmica no mundo todo (KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004; RODRIGUES et al, 2004a).

Diversos estudos reportam um aumento nos casos de diarreia infantil ocasionada por cepas aEPEC, conforme relatado anteriormente (TRABULSI, KELLER & GOMES, 2002; RODRIGUES et al, 2004a; GOMES et al, 2004; BUERIS et al, 2007; SCALETSKY et al, 2009; CONTRERAS et al, 2010), e além disso alguns estudos evidenciam a associação de aEPEC com diarreia prolongada em crianças (AFSET et al, 2004).

E. coli é frequentemente associada à infecções intestinais em cães adultos e filhotes (ALMEIDA, 2005; NAKAZATO et al, 2004; revisado em WALES, WOODWARD & PEARSON, 2005; BETANCOR et al, 2007), e também à septicemia em neonatos caninos (MÜNNICH & LÜDBE-BECKER, 2004).

O estudo feito por Nakazato e colaboradores (2004) e por Almeida (2005), confirmam a presença de aEPEC em cães brasileiros com e sem diarreia. No estudo de Nakazato e colaboradores (2004) os fatores de virulência encontrados nas linhagens isoladas foram similares às aEPEC de humanos, exibindo a possibilidade das aEPEC poderem se mover entre populações humanas e caninas. No entanto, a diferença na frequência de isolamento de aEPEC de cães com diarreia e sem diarreia não foi significativa. O mesmo ocorreu nos estudos feitos por Almeida (2005) e Krause e colaboradores (2005), nos quais se isolou cepas aEPEC de cães com e sem diarreia.

Apesar de não existir evidência da transmissão direta de animais para humanos, as cepas de aEPEC isoladas de animais pertencem a sorogrupos implicados em doença humana, sugerindo que estes animais podem representar reservatórios importantes de aEPEC, e que podem ser transmitidos aos humanos (revisado em HERNANDES et al, 2009). Em São Paulo foi relatado o caso de uma criança e seu cão, ambos com diarreia aguda, no qual foi isolado um clone de tEPEC das fezes da criança e do cão, mostrando a possibilidade do cão atuar como um reservatório e também de ser um hospedeiro susceptível das EPEC (RODRIGUES et al, 2004b).

A presença de isolados portadores do gene que codifica intimina (*eae+*) em cães saudáveis é reportada frequentemente (NAKAZATO et al, 2004; KRAUSE, ZIMMERMANN & BEUTIN, 2005; ALMEIDA, 2005; ISHII, MEYER & SADOWSKY, 2007), o que representa um dado importante na epidemiologia da doença.

3.4 Genes de virulência em *Escherichia coli*

Diversos fatores de virulência já foram identificados em *E. coli*. Em se tratando de cepas aEPEC, os genes codificados pelos “locus” LEE representam os mais importantes marcadores genéticos a serem considerados neste patotipo. A ilha de patogenicidade LEE tem aproximadamente 35 kb e pode ser inserida em um ou mais locais no cromossomo de grupos clonais AEEC (WIELER et al, 1997; SPERANDIO et al, 1998). Neste “locus” estão localizados aproximadamente 40 genes, entre eles os determinantes genéticos para a produção

da lesão A/E (McDANIEL & KAPER, 1997), e conforme explanado anteriormente, inclui aqueles que codificam um T3SS (ELLIOT et al, 1998), proteínas como EspB e EspA, a adesina de membrana externa intimina e seu receptor translocado Tir, que é enviado por este sistema de secreção para a membrana da célula do hospedeiro (GARMENDIA et al, 2005). A lesão A/E é o mecanismo central da patogênese de EPEC, assim como de algumas cepas de STEC/EHEC (KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004) e ainda de outras espécies bacterianas como *Citrobacter rodentium* e determinadas cepas de *Hafnia alvei* (McDANIEL et al, 1995).

O gene *eae* é um dos genes do “locus” LEE que apresentam maior polimorfismo, sendo que atualmente já foram caracterizadas 27 variantes deste gene que codificam 27 diferentes tipos e subtipos de intimina. As regiões 5’ do gene *eae* são conservadas e as regiões 3’ são heterogêneas (BLANCO et al, 2006a; BLANCO et al, 2006b; GARRIDO et al, 2006; LACHER, STEINSLAND & WHITTAM, 2006; revisado em ABE et al, 2009). A diferenciação destes alelos representa uma importante ferramenta para a tipagem de aEPEC, tEPEC e STEC em estudos sobre a patogênese, epidemiologia, clonalidade e estudos imunológicos (TORRES, ZHOU & KAPER et al, 2005).

EspA é a proteína estrutural do T3SS da superfície da bactéria, que interage com a célula humana epitelial nas fases iniciais da lesão A/E (KENNY et al, 1997). EspB, juntamente com EspD, forma o complexo do poro de membrana, permitindo que Tir seja enviado para funcionar como o receptor para intimina dentro da membrana celular da célula do hospedeiro (KNUTTON et al, 1998).

As tEPEC produzem, com poucas exceções, apenas os fatores de virulência codificados pela região LEE e pelo pEAF (NATARO & KAPER, 1998; TRABULSI, KELLER & GOMES, 2002). Em geral, tEPEC são mais homogêneas em suas características de virulência do que as aEPEC, que não têm o gene *bfpA*, mas frequentemente possuem diversos outros fatores de virulência e podem carrear genes codificadores de fatores de virulência de outros patótipos de DEC mais frequentemente que as cepas tEPEC (TRABULSI, KELLER & GOMES, 2002).

Os genes *pap*, *afa*, *cnf1* e *kps* são encontrados principalmente em cepas uropatogênicas (UPEC) (BEKAL et al, 2003; TAVECHIO et al, 2004; VON-SIDOW, 2005). Starcic e colaboradores (2002) estudaram 24 cepas de *E. coli* hemolíticas provenientes de fezes diarréicas caninas e a grande maioria dos isolados foi positivos para *pap* (80%), *cnf1* (80%), *kps* (62,5%) e *hlyA* (100%). Regua-Mangia e colaboradores (2009) associaram a presença do gene *kps* com diarreia em crianças. A toxina CNF1 já foi isolada de fezes de crianças com

diarréia (ELLIOT et al, 1998), mas freqüentemente é produzida por ExPEC de humanos com doença do trato urinário.

As adesinas Efa-1 (EHEC “factor for adherence”) (NICHOLLS et al, 2000) e Iha (proteína homóloga a IrgA, “iron regulated gene A” de *Vibrio cholerae*) (TARR et al, 2000) foram primeiramente encontradas em cepas EHEC e as duas estão localizadas em ilhas de patogenicidade (PAI) cromossomiais. A presença destas adesinas em cepas EPEC do sorotipo O26 também é frequente (BARDIAU, LABROZZO & MAINIL, 2009). Efa-1 é codificado na PAI OI-122 e a presença desta ilha foi associada à sorotipos de STEC relacionados à epidemias ou doença grave em humanos, além da sua presença estar associada à colonização intestinal e diarréia em bezerros (KARMALI et al, 2003). O gene *iha* está localizado na PAI OI-43 ou TAI (“Tellurite resistance and adherence conferring island”) e foi primeiramente associado a cepas O157:H7, e promove adesão em cepas laboratoriais não aderentes, conferindo um padrão difuso de aderência (TARR et al, 2000). Johnson e colaboradores (2005) comprovaram o seu papel como um fator de virulência na aderência de cepas UPEC utilizadas no estudo. Dados epidemiológicos evidenciam que Iha é mais frequente, com significância estatística, em diversos grupos de patógenos ExPEC que entre isolados fecais controle (JOHNSON et al, 2005).

O gene *astA*, codificador da enterotoxina termoestável de EAEC (EAST-1), foi descrito pela primeira vez em cepas EAEC (YAMAMOTO & ECHEVERRIA, 1996; SAVARINO et al, 1996; YUSTE et al, 2006) e está localizado em um grande plasmídeo de 60-65 MDa, juntamente com o gene ativador transcricional das adesinas fimbriais I e II de EAEC (*aggR*). Esta toxina também é encontrada com alta frequência em cepas STEC provenientes de pacientes adultos e crianças com diarréia no Brasil (VAZ et al, 2004; GUTH et al, 2002). O papel desta toxina é ainda questionável, porém está provavelmente associada à patogênese da diarréia aquosa que ocorre nos primeiros estágios da infecção por STEC (PATON & PATON, 1998). Dulguer e colaboradores (2003), estudando cepas aEPEC provenientes de crianças com e sem diarréia, encontraram associação significativa da presença desta toxina com diarréia.

Outra adesina importante foi identificada por Torres e colaboradores (2002), os quais descreveram o operon fimbrial cromossomial de STEC O157:H7 não fermentadora de sorbitol, com alta similaridade aos genes da fímbria polar longa (Lpf) de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. O mesmo grupo postulou que a fímbria polar longa é um dos poucos fatores adesivos das EHEC O157:H7 que estão associados com a colonização do intestino,

sendo que possuem dois loci, *lpfA1* e *lpfA2*, que codificam estruturas fimbriais altamente reguladas. Posteriormente estes genes foram encontrados em outras DEC, como as aEPEC (TORRES et al, 2009). Resultados de estudos recentes indicam que a combinação de três marcadores genéticos (*eae*, *lpfA1* e *lpfA2*) pode ser suficiente para realizar uma rápida identificação de isolados AEEC (TORRES et al, 2009). Neste estudo, Torres e colaboradores (2009) encontraram a combinação das variantes *lpfA1-2* e *lpfA2-1* com *eae* β 1 ou ϵ 2 como sendo característica do patotipo aEPEC. Segundo os autores a identificação de suas variantes em 10 subtipos e sua associação com os subtipos de *eae* são úteis para identificação de *E. coli*.

TccP (“Tir-cytoesqueleto coupling protein”) é uma proteína efetora do T3SS (GARMENDIA et al, 2004) que substitui a via Nck (proteína adaptadora de mamíferos) em termos de recrutamento e ativação de N-WASP (“Wiskott-Aldrich syndrome protein”), que por sua vez promove a polimerização da actina da célula do hospedeiro. Se achava primeiramente que a proteína Tir das cepas EHEC não possuíam um local para ligação de Nck, utilizando a proteína efetora translocada TccP para se ligar e ativar N-WASP (GARMENDIA et al, 2004). De fato isso ocorre com cepas EHEC O157, porém verificou-se que algumas cepas de EHEC não-O157 e algumas cepas de EPEC tem o potencial de induzir a polimerização da actina por meio da utilização simultânea das vias Tir-Nck e Tir-TccP (WHALE et al, 2006), assim como cepas aEPEC *tccP2* positivas (OOKA et al, 2007).

Posteriormente descobriu-se que cepas de EHEC O157 possuem um gene intacto além do *tccP*, que foi chamado de *tccP2*, e que também está relacionado à via de polimerização de actina (OGURA et al, 2007). Existe um alto nível de conservação de sequências entre TccP e TccP2, porém ainda não se pode excluir a possibilidade de diferenças funcionais (WHALE et al, 2007). O que foi provado por Ogura e colaboradores (2007) é que TccP2 é uma proteína efetora translocada e capaz de desencadear a polimerização da actina da célula eucariótica, independente da via Nck e sugerem que, em cepas EHEC não-O157, ele possui a função equivalente à de TccP.

A produção de enterohemolisina é codificada pelo gene *ehxA*, que é carregado em um grande plasmídeo de 60 MDa e é diferente da α -hemolisina codificada pelo gene *hlyA* (NATARO & KAPER, 1998). A enterohemolisina é fortemente associada a cepas STEC, apesar de ter sido descrita primeiramente em cepas EPEC provenientes de crianças com diarreia, motivo pelo qual foi nomeada enterohemolisina (BEUTIN et al, 1988). No mesmo estudo, Beutin e colaboradores (1988) não encontraram cepas enterohemolíticas em 200 EPEC provenientes de fezes de crianças saudáveis. Bockzec e colaboradores (2006) relataram

a presença maciça deste gene em cepas ambientais de *E. coli*. A produção dela só pode ser claramente detectada em sangue lavado de carneiro, no qual ela produz uma zona de hemólise geralmente menor e mais turva do que a gerada pela α -hemolisina, a qual, por sua vez, se caracteriza por zonas claras de hemólise, detectadas na fase exponencial de crescimento bacteriano (BEUTIN, 1988). Além disso, a lise dos eritrócitos ocasionada pela α -hemolisina é detectada após 3 horas de incubação, e para detecção da produção de enterohemólise é requerida incubação de 18 a 24 horas (BEUTIN et al, 1991).

3.5 Adesão celular em *Escherichia coli*

Um passo importante na colonização do trato gastrointestinal humano e animal por bactéria é a adesão do organismo à superfície do hospedeiro. Apesar de a adesão ser essencial para a manutenção dos membros da microbiota no intestino, ela também é uma fase inicial crítica em todas as infecções diarréicas causadas por cepas de *E. coli* patogênicas (revisado em TORRES, ZHOU & KAPER, 2005). O perfil de adesão “in vitro” gerado por cepas de *E. coli* é uma ferramenta bastante utilizada na caracterização dos seus patótipos, e geralmente utilizam-se para estes ensaios as linhagens celulares HEP-2 (derivada de carcinoma laríngeo) e HeLa (derivada de câncer epitelial cervical). As células Caco-2 (adenocarcinoma de cólon) também são frequentemente utilizadas, porém podem apresentar algumas vezes padrões distintos dos observados em HeLa ou HEP-2 pela presença de outros receptores, de regiões periféricas menos diferenciadas ou meio de cultivo diferente.

O ensaio de aderência celular em *E. coli* foi primeiramente descrito por Cravioto e colaboradores (1979). Três padrões principais de aderência estão descritos em células HeLa e HEP-2: aderência localizada, difusa e agregativa (NATARO & KAPER, 1998). No entanto, não é fato incomum cepas de aEPEC exibirem mais de um padrão ou apresentarem-se aderidas de forma irregular ou apenas periférica às células (TORRES et al, 2009; SCALETSKY et al, 2010).

3.6 Ensaios de PCR, RAPD-PCR e extração plasmidial em microbiologia

Com o advento da PCR, tornou-se possível a identificação dos marcadores genéticos de patogenicidade em isolados bacterianos, oferecendo o rápido diagnóstico de infecções por *E. coli* e outros microrganismos. No âmbito da microbiologia clínica, a PCR se aplica a três

grandes campos: diagnóstico etiológico, controle de tratamento com antimicrobianos e caracterização genética de agentes infecciosos (COSTA, 2004). Posteriormente, o “multiplex” PCR também começou a ser frequentemente utilizado na detecção simultânea de genes de relevância clínica em *E. coli*, como por exemplo os que codificam os subtipos de toxina Shiga, as intiminas e as hemolisinas (MENDEZ-ALVAREZ & PEREZ-ROTH, 2004) e também para a identificação rápida de *E. coli* diarréiogênicas para humanos (TOMA et al, 2003; FUJIOKA et al, 2009).

Entre as técnicas de tipagem baseadas na PCR, a amplificação randômica de DNA polimórfico pode ser utilizada para avaliar a relação genética entre cepas de *E. coli*. Esta técnica se destaca pela simplicidade, já que utiliza apenas um oligonucleotídeo inespecífico, o qual se anela em um ou mais sítios no DNA, gerando fragmentos de tamanhos variáveis (WILLIAMS et al, 1990). Decorrentes dos princípios que fundamentam a técnica, o RAPD-PCR apresenta diversas vantagens como método de tipagem bacteriana. Como não há necessidade do conhecimento prévio da seqüência a ser amplificada a técnica pode ser aplicada para tipagem de qualquer microrganismo, sendo esta rápida e de fácil execução. A probabilidade de se detectar diferenças entre cepas é grande, uma vez que todo o genoma serve de molde para amplificação, podendo este ser obtido de modo simplificado, sem obrigatoriedade na sua purificação, e em pequenas quantidades. A visualização dos produtos de amplificação é feita diretamente após coloração do gel de agarose, sendo possível a análise combinada de perfis de amplificação obtidos pelo uso de mais de um iniciador (WILLIAMS et al, 1993; BRIKUN et al, 1994). O uso de dois oligonucleotídeos mostra que o poder discriminatório entre as cepas é maior do que quando se utiliza apenas um oligonucleotídeo (HOPKINS & HILTON, 2001).

Além disso, moléculas extracromossomiais de DNA, conhecidas como plasmídeos, são encontradas em diversas espécies bacterianas sendo que alguns possuem genes de virulência, sendo geralmente os de alto peso molecular. Muitos marcadores de virulência codificados em plasmídeos são alvos de diagnóstico molecular (NATARO & KAPER, 1998). Diversas técnicas de extração plasmidial são utilizadas como complemento da caracterização destes patógenos. A extração plasmidial de células bacterianas pode ser realizada por um método cujo princípio é a desnaturação alcalina seletiva de DNA cromossomal de alto peso molecular, enquanto DNA circulares ligados covalentemente permanecem fita-dupla. Este

método permite a extração de grandes e de pequenos plasmídeos (BIRNBOIM & DOLY, 1979).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolados Bacterianos

4.1.1 Isolados de *E. coli* provenientes de cães

Foram incluídos no estudo 15 isolados classificados como aEPEC, proveniente de material fecal diarréico de cães da região metropolitana do Rio de Janeiro, previamente isolados e parcialmente caracterizados em estudo anterior de nosso grupo (ALMEIDA, 2005), os quais estão especificados na **Tabela 1**. Os isolados foram estocados a -20 °C em criotubos contendo Caldo Triptona de Soja (TSB) em dupla concentração e glicerol a 20%. Sete destes 15 isolados possuem representante de mesmo sorotipo recuperado de humanos, e oito isolados pertencem a sorotipos recuperados só de caninos, conforme apresentado na **Figura 1**.

4.1.2 Isolados de *E. coli* provenientes de humanos

Foram utilizados cinco isolados de aEPEC provenientes de material fecal diarréico de humanos (crianças com idade entre dois e 24 meses), sendo dois da cidade de São Paulo, cedidas pelo Laboratório da Prof. Dra. Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal do Estado de São Paulo (UNIFESP), e três da cidade do Rio de Janeiro, cedidas pelo Prof. Dr. Dennys Monteiro Girão, do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sendo que os isolados humanos foram renomeados neste estudo como H1 a H5, conforme apresentado na **Tabela 1**. Os isolados foram estocados a -20°C em criotubos contendo TSB 2X e glicerol a 20%. Todos os sorotipos recuperados de humanos possuem ao menos um representante de mesmo sorotipo recuperado de cães (**Figura 1**).

Tabela 1: Isolados de EPEC atípicas de cães e humanos, com sua respectiva origem, idade e sintoma clínico principal, sorotipo, local e ano de isolamento e referência de isolamento, que foram utilizadas no presente estudo.

Isolado	Origem	Idade, Sinal clínico	Sorotipo^a	Local / ano isolamento	Referência
2.3	Canino	NI, D	O51:H40	RJ/2005	1
21	Canino	NI, D	O51:H40	RJ/2005	1
41.1	Canino	NI, D	O4:H16	RJ/2005	1
41.3	Canino	NI, D	O4:H16	RJ/2005	1
41.4	Canino	NI, D	O4:H16	RJ/2005	1
41.5	Canino	NI, D	O4:H16	RJ/2005	1
46	Canino	NI, D	O11:H16	RJ/2005	1
47	Canino	NI, D	O156:H ⁻	RJ/2005	1
70	Canino	NI, D	O181:H18	RJ/2005	1
71	Canino	NI, D	O159:H23	RJ/2005	1
72	Canino	NI, D	O2:H19	RJ/2005	1
73	Canino	NI, D	O28:H16	RJ/2005	1
75	Canino	NI, D	O49:H10	RJ/2005	1
77	Canino	NI, D	O117:H40	RJ/2005	1
78	Canino	NI, D	O136:H ⁻	RJ/2005	1
4361-2/89 (H1)	Humano	1 a 9 m, D	O51:H40	SP/1989	3
1461-1/89 (H2)	Humano	1 a 10 m, D	O11:H16	SP/1989	3
98222 (H3)	Humano	2 a, D	O4:H16	RJ/1998	2
21535 (H4)	Humano	2 m., D	O49:H10	RJ/2001	2
21323 (H5)	Humano	1 a 6 m, D	O51:H40	RJ/2001	2

D: diarreia; NI: não informado; RJ: Rio de Janeiro; SP: São Paulo; a: anos; m: meses; (H1 a H5): os isolados humanos foram renomeados neste estudo; 1: ALMEIDA, 2005; 2: GIRÃO, 2007; 3: VIEIRA et al, 2001; ^a O, antígeno somático; H, antígeno flagelar; H⁻, amostra imóvel; NI: não informado.

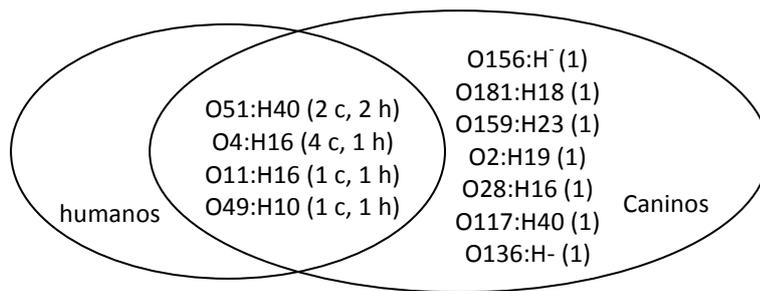


Figura 1: Diagrama de Venn representando o conjunto dos sorotipos, e suas respectivas origens, de isolados de EPEC atípicas recuperados de cães e de humanos. (n) número de isolados; c: canino; h: humano.

4.2 Métodos

Todos os meios de cultura utilizados nos ensaios realizados no presente estudo foram adquiridos dos fabricantes Himedia (Mumbai, Índia), Merck (Rio de Janeiro, Brasil) ou Difco (Lawrence, EUA). Todos os reagentes utilizados nos ensaios moleculares (reagentes do “mix” de PCR, gel de agarose e marcador de peso molecular) foram obtidos do fabricante Invitrogen (Carlsbad, EUA).

4.2.1 Ensaios de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Todas as reações de PCR realizadas para a pesquisa dos marcadores genéticos de virulência foram realizadas em triplicata.

4.2.1.1 Obtenção de DNA dos isolados

Para obtenção de quantidade suficiente de células bacterianas para extrair o DNA, primeiramente repicaram-se, a partir do estoque, os isolados em Caldo Triptona de Soja (TSB), os quais foram mantidos em estufa à 37°C “por 18 horas”. Posteriormente, o crescimento foi semeado em placas de ágar Triptona de Soja (TSA) ou Cistina Lactose Eletrólito-Deficiente (CLED), que foram mantidas em estufa nas mesmas condições, durante 24 horas. Após esse período, as placas foram lavadas com 2 mL de salina tamponada fosfatada (PBS; NaCl 80g; KH₂PO₄ 3,4g; K₂HPO₄ 12,1g, H₂O q.s.p. 1000 mL, [pH 7.3]) e 1 mL dessa suspensão foi colocado em tubos de alíquotas de 1,5 mL, e o DNA foi obtido por meio da lise por fervura (100°C durante 10 minutos) (STEWART, TORTORELLO &

GENDEL, 1998), com posterior centrifugação durante 10 s, e congelamento a -20°C. O DNA extraído foi utilizado em um prazo máximo de 30 dias, sendo que, depois de decorrido este tempo, o DNA de cada isolado foi novamente extraído. Alíquotas de 2,5 µL deste material foram usadas como DNA molde para cada um dos diversos protocolos de amplificação utilizados neste estudo.

4.2.1.2 Pesquisa de marcadores de virulência do “locus” LEE e outros marcadores de virulência cromossomiais e plasmidiais

Os isolados foram testados quanto à presença dos genes do “locus” LEE: *eae* (subtipos α , β , γ , δ , ϵ , θ , ζ , ι e θ), *tir* (subtipos α , β , γ), *espB* (subtipos α , β , γ), e também de outros marcadores de EPEC, (pEAF e *bfpA*) e STEC (*stx1*, *stx2* e *stx2f*). Além destes, foi realizada a pesquisa de outros genes de virulência cromossomiais e plasmidiais, os quais estão apresentados na **Tabela 2**.

4.2.1.3 Controles positivos e negativos da PCR

As seguintes cepas de *E.coli* foram utilizadas como controles positivos das reações de PCR: E2348/69 (*eae* α , *tir* α , *espA* α , *espB* α , pEAF, *bfpA* e *lpfA1-1*), H-30 (*eae* β , *tir* β , *espA* β e *espB* β), E40705 (*eae* γ , *tir* γ , *espA* γ , *espB* γ , *ehxA* e *iha*), ICC95 (*eae* δ), PMK5 (*eae* ϵ), 1251-6 (*tccP2*), EDL933 (*stx*, *tccP*, *lpfA1-3*, *lpfA2-2*), T4/97 (*stx2f*), J96 (*pap*), KS52 (*afa*), RS218 (*kps*), MR219 (*cnf1*), U4-41 (*hlyA*) e EAEC 042 (*astA* e *aggR*), (FV10094 (*lpfA1-2*), FV10106 (*lpfA1-5*) e O113:H2 (*lpfA2-1*). Para o gene *fimH* foi utilizada como controle positivo a amostra de UPEC A22 da coleção do laboratório de Enteropatógenos e Microbiologia de Alimentos do MIP/UFF. Os genes *eae* ζ (zeta) e *eae* ι (iota) não possuíam controle positivos.

A amostra DH5 α (K-12) foi utilizada como controle negativo em todas as reações, exceto para pEAF e *bfpA*, para as quais foram utilizadas a amostra JPN-15, e para os seis subtipos dos genes *lpfA1* e *lpfA2*, para as quais foram utilizadas a amostra HB101.

Tabela 2: Marcadores de virulência pesquisados em isolados de aEPEC de caninos e humanos no presente estudo.

Genes	Descrição	Função
<i>eae</i> ^a	Proteína intimina	Adesina
<i>tir</i> ^a	Receptor translocado da intimina	Receptor
<i>espB</i> ^a	Proteína efetora secretada pelo T3SS de <i>E. coli</i>	Formadora de poro
<i>espA</i> ^a	Proteína efetora estrutural do T3SS de <i>E. coli</i>	Estrutural do T3SS
pEAF	Fragmento do plasmídeo “ <i>E. coli</i> adherence factor”	Plasmídeo
<i>bfpA</i>	Pilus formador de feixe (“Bundle forming pilus”)	Adesina
<i>stx1</i>	Toxina Shiga 1	Toxina
<i>stx2</i>	Toxina Shiga 2	Toxina
<i>stx2f</i>	Variante 2f da toxina Shiga	Toxina
<i>hlyA</i>	Alfa-hemolisina	Toxina
<i>ehxA</i>	Enterohemolisina	Toxina
<i>astA</i>	Toxina termoestável tipo I de EAEC	Toxina
<i>cnf1</i>	Fator de necrose citotóxica 1	Toxina
<i>efa1</i>	Fator de aderência de EHEC	Adesina
<i>iha</i>	Adesina homóloga a IrgA de <i>Vibrio cholerae</i>	Adesina
<i>afa</i>	Adesina afimbrial I	Adesina
<i>pap</i>	Pilus associado a pielonefrite/fimbria P	Adesina
<i>lpfA1</i>	4 Subtipos do gene da fímbria polar longa tipo 1	Adesina
<i>lpfA2</i>	2 Subtipos do gene da fímbria polar longa tipo 2	Adesina
<i>fimH</i>	Fímbria tipo 1	Adesina
<i>aggR</i>	Gene ativador transcripcional das adesinas fimbriais I e II	Regulador
<i>tccP</i>	Proteína ligadora do Tir ao citoesqueleto	Proteína sinalizadora
<i>tccP2</i>	Proteína ligadora do Tir ao citoesqueleto	Proteína sinalizadora
<i>kps</i>	Cápsula associada à aderência	Cápsula

a – genes do “locus” LEE.

4.2.1.4 Reação de PCR

As amplificações foram executadas em dois termocicladores, um modelo PTC 100 (MJ Research, Watertown, MA, EUA) e outro modelo TC050A (Labnet International, Edison, NJ, EUA). Os oligonucleotídeos e suas respectivas temperaturas de anelamento estão apresentados nas **Tabelas 3, 4 e 5**. As concentrações dos reagentes utilizados nas reações de amplificação foram utilizadas de acordo com as referências específicas para cada par de oligonucleotídeos.

4.2.1.5 Gel de agarose

Os produtos da PCR amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE; Tris-base 89mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM). A corrida eletroforética foi feita no mesmo tampão e a voltagem utilizada foi de 90 V mantendo-se a amperagem em torno de 100 mA, por aproximadamente 60 minutos, utilizando fonte modelo EPS250 (CBS, Scientific Company, DelMar, CA, EUA) e cuba modelo MGU-502T (CBS, Scientific Company, DelMar, CA, EUA). Nos poços do gel foram colocados os controles, os amplicons e o marcador de peso molecular (1 kb plus DNA Ladder), que é adequado para mapear fragmentos de DNA fita dupla de 100 pb a 12 kb. Concluída a corrida eletroforética, o gel foi retirado da cuba e corado em solução de TBE com brometo de etídio (0,5 µg/mL) durante 15 minutos, visualizado em transiluminador UV (Ultravioleta) modelo TCX 26.M (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, França) e fotografado com máquina fotográfica digital modelo Power Shot G7 (Canon, Tokyo, Japão), acoplada ao transluminador.

4.2.2 Extração e perfil plasmidial

Os isolados bacterianos foram submetidos à extração do DNA plasmidial, segundo método descrito por Birnboim & Doly (1979), para comparação de seus perfis (**Figura 2**). Os isolados foram semeados em 3 mL de caldo LB (Luria Bertani) e incubados a 37°C durante 16-18 horas. O crescimento obtido foi centrifugado a 5000 rpm (rotações por minuto) durante 15 minutos a 4°C. Os sedimentos foram ressuspensos em 500 µL da solução I (Tris-HCl 25 mM, [pH 8,0]/ EDTA 10 mM/ Glicose 50 mM/ Lisozima 1 mg), homogeneizados e mantidos em banho de gelo por 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 1 mL da solução II

(SDS 1% [p/v]/ NaOH 0,2 M) recém-preparada e os tubos foram invertidos lentamente por 5 vezes. Em seguida, os tubos foram incubados em banho de gelo durante 10 minutos e após foram adicionados 750 µL da solução III (Acetato de Sódio [pH 4,8] 3 M). Após nova homogeneização, os tubos foram incubados em banho de gelo durante 1 hora. Posteriormente, as preparações foram centrifugadas a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C e os sobrenadantes transferidos para tubos esterilizados, aos quais foram adicionados igual volume de álcool isopropílico, sendo os tubos incubados por 18 horas a -20°C. Após centrifugação, os sedimentos foram ressuspensos em 500 µL da solução IV (Tris-HCl 50 mM, [pH 8,0] / Acetato de Sódio 0,1 mM, [pH 7,0]) e 1 mL de etanol absoluto, procedendo-se incubação por 18 horas a -20°C. Após nova centrifugação, os sedimentos foram lavados com etanol a 70 °GL e secos à temperatura ambiente por 3 horas. O DNA plasmidial obtido foi então ressuspenso em 25 µL de solução tampão TE (Tris 10 mM/ EDTA 1 mM, [pH 8,0]) e submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

Foi realizada a análise mediante comparação com plasmídeos de pesos moleculares conhecidos carregados pelas cepas *E. coli* R861 (plasmídeos de 4,6, 23,9, 42 e 98 MDa [Mega Dalton]) e V517 (plasmídeos de 1,1; 1,5; 1,7; 2,2; 3,0; 3,5; 5,2 e 32 MDa).

4.2.3 Amplificação Randômica de DNA Polimórfico (RAPD-PCR)

4.2.3.1 Obtenção de DNA

Cada isolado, obtido do estoque, foi semeado em 2 mL de TSB, distribuído em tubos 18x180 mm, os quais foram mantidos inclinados sob agitação constante (120 rpm) por 18 horas a 37°C, em estufa Certomat® BS-1 (B. Braum Biotech international, Pennsylvania, EUA). Após o período de incubação, a densidade óptica (DO) a 600 nm de uma diluição 1:10 em água, de uma alíquota da cultura, foi determinada em espectrofotômetro modelo QI1080 (Quimis®, Diadema, SP, Brasil). Para uma DO de 0,4, foi utilizada uma alíquota de 200 µL do crescimento original, suspensa em 900 µL de PBS estéril (PACHECO et al, 1997). As suspensões foram fervidas por 10 minutos a 100°C, sendo após centrifugadas brevemente e colocadas em gelo, para posterior utilização como fonte de DNA para as reações de amplificação.

4.2.3.2 Reação de amplificação

Todas as reações foram executadas em um mesmo termociclador PTC-100. A reação foi realizada utilizando 4 µL dos oligonucleotídeos 1254 (5'-CCGCAGCCAA-3') e 1252 (5'-GTGGATGCGA-3') (30 pmol/mL), 3 µL de tampão de PCR, 1,8 µL MgCl₂ (1,5 mM), 3 µL de dNTP (2,5 mM), 3,0 µL de Taq polimerase (1,5 U) e 3,0 µL do DNA molde para um volume final de 30 µL (PACHECO et al, 1997).

Foram utilizados os seguintes parâmetros para o programa de amplificação: 4 ciclos de 94°C (5 min), 37°C (5 min) e 72°C (5 min), seguidos de 30 ciclos de 94°C (1 min), 37°C (1 min) e 72°C (2 min) e uma etapa final de extensão de 72°C (10 min) (PACHECO et al, 1997).

4.2.3.3 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos do RAPD-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,2% (p/v) em tampão TBE, em fonte modelo EPS250 e cuba modelo MGU-502T, com voltagem de 70 V e amperagem aproximada de 80 mA, por quatro horas. Imediatamente após a corrida, o gel foi corado com solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL), visualizado em transiluminador UV modelo TCX 26.M e fotografado com máquina Canon modelo Power Shot G7, acoplada ao transluminador. No gel, além dos isolados, foi colocado o marcador de peso molecular Ladder 100 pb Ludwig Biotec.

4.2.3.4 Análise da similaridade genética dos isolados

Para análise da similaridade genética dos isolados, utilizou-se o programa RAPDistance1.04 (ARMSTRONG et al, 1994), utilizando-se como algoritmo de similaridade o coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1901). Na caracterização dos isolados considerou-se como de mesmo tipo RAPD-PCR (designado por números romanos) aquelas que apresentassem índice de similaridade acima de 75% (GRIF et al, 1998). Os subtipos foram designados por letras minúsculas. A matriz de distâncias gerada pelo programa foi utilizada para a construção de um dendograma, empregando o método UPGMA (agrupamento pareado por médias aritméticas), com o auxílio do programa MEGA4 (TAMURA et al, 1994).

4.2.4 Ensaios “in vitro” de aderência em células Caco-2

O protocolo utilizado foi adaptado de Cravioto e colaboradores (1979). Foram utilizadas as linhagens celulares humanas Caco-2 (ATCC HTB37; adenocarcinoma de cólon, representativa de enterócitos do topo das vilosidades) em monocamada com 14 dias de crescimento. Para a realização dos testes de adesão, os cultivos celulares foram tripsinizados (tripsina 0,2%; EDTA 0,02% em PBS 0,01 M [pH 7,2]) para obtenção de uma suspensão celular em meio novo e cerca de 10^5 células/ml foram distribuídas em câmaras de cultura de placas de 24 poços (Nunc, Rochester, EUA), contendo lamínulas de vidro de 13 mm. As células foram utilizadas para o teste quando da constatação da presença de domos celulares característicos do processo de diferenciação, que se inicia após aproximadamente sete dias de incubação (PINTO et al, 1983).

4.2.4.1 Ensaio de adesão

O meio de crescimento das células foi desprezado e, após 3 lavagens com PBS, foi acrescentado outro meio contendo 2% de soro fetal bovino e 1% de D-manose, este último utilizado para inibição da adesão mediada pela fímbria tipo 1. Inoculou-se uma alíquota de 35 μ L do crescimento dos isolados, que estavam incubados em estufa em caldo LB durante 18 horas (contendo aproximadamente 10^7 bactérias/mL), sobre a monocamada celular e então as microplacas foram incubadas a 37°C por 3 horas. Nos testes de interação de 3 horas, após transcorrido este período, as monocamadas celulares foram lavadas com PBS e posteriormente fixadas, enquanto nos testes de 6 horas, após as lavagens, foi adicionado meio novo e as placas foram incubadas por um período adicional de 3 horas.

A fixação das células foi realizada com metanol durante 15 minutos e em seguida as células foram submetidas à coloração com solução de May-Grünwald a 0,1% em tampão fosfato (0,03 M [pH 7,3]), por 5 minutos, e solução de Giemsa diluída 1:3 (v/v) no mesmo tampão, por 20 minutos. Para visualização dos resultados foi utilizado microscópio óptico modelo Alphaphot YS (Nikon, Tokyo, Japão), em um aumento de 100 X, os quais foram analisados por dois avaliadores diferentes.

Para a interpretação dos resultados foram considerados os seguintes padrões de adesão: adesão localizada (AL); adesão localizada “like” (ALL); adesão difusa (AD); adesão agregativa (AA), não aderente (NA) e adesão indeterminada (AI). Na AL as bactérias formam

microcolônias compactas características na superfície da célula Hep-2; na ALL, também se formam microcolônias, porém mais frouxas; na AA, que define EAEC, as bactérias aderem umas às outras distantes das células, assim como na superfície da célula, em uma configuração característica conhecida como “tijolos empilhados”; na AD, que define DAEC, as bactérias estão dispersas sobre a superfície das células (NATARO & KAPER, 1998). Na AI ocorre a aderência irregular das bactérias em pequeno número ou isoladamente sobre o tapete e/ou espaços intercelulares. Além do padrão, também foi avaliada a intensidade de adesão das bactérias às células, considerando-se, em visualização com aumento de 400x, as seguintes intensidades: fraca, quando da presença de poucas áreas do tapete celular com presença de bactérias (menos de 10 em 50 campos examinados) e estas num número baixo (menos de 50 bactérias por campo); moderada, entre 10 e 30 campos por 50 campos e entre 50 e 100 bactérias por campo; intensa, com mais de 30 campos por 50 campos examinados e mais de 100 bactérias por campo.

No ensaio foram utilizados isolados bacterianos controles apresentando alguns dos fenótipos de adesão (cepas E23 [AL]; 3881-3 [ALL] e 2741-5/85 [AA] - UNIFESP) e um poço sem inoculação bacteriana para controle do tapete celular.

4.2.5 Produção de enterohemolisina e α -hemolisina

A partir do estoque a -20°C , os isolados foram inoculados em TSB e incubados com aeração durante 6 horas a 37°C em estufa modelo Certomat® BS-1. Após esse período uma alíquota de 5 μL do crescimento foi inoculada em forma de “spot” em uma placa de meio base para ágar sangue, acrescido de CaCl_2 a 10 mM e 5% de sangue desfibrinado de carneiro lavado três vezes em PBS estéril e em outra placa de meio base para ágar sangue, nas mesmas condições, porém com sangue de carneiro não lavado. As placas foram incubadas a 37°C em estufa Luferto (Lutz Fernando, São Paulo, Brasil). A primeira leitura do teste foi feita 3 horas depois da inoculação para a detecção da produção de α -hemolisina, enquanto que a segunda leitura foi realizada após 18 a 20 horas de incubação para detecção da produção de enterohemolisina (BEUTIN, 1991). Nos testes foram incluídas também as amostras controle *E. coli* K12 DH5- α (não hemolítica), *E. coli* U4-41 (α -hemolítica) e *E. coli* C3888 (enterohemolítica).

Tabela 3: Sequências e temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos empregados na caracterização dos genes do “locus” LEE*, e tamanho do fragmento amplificado.

Gene	Sequências dos oligonucleotídeos	Produto da PCR (pb)	Temperatura de Anelamento	Referência
<i>eae α</i>	B73 5'- TAC TGA GAT TAA GGC TGA TAA - 3' B138 5'- GAC CAG AAG AAG ATC CA - 3'	452	50°C**	CHINA et al, 1999
<i>eae β</i>	B73 5'- TAC TGA GAT TAA GGC TGA TAA - 3' B137 5'- TGT ATG TCG CAC TCT GAT T - 3'	520		CHINA et al, 1999
<i>eae γ</i>	B73 5'- TAC TGA GAT TAA GGC TGA TAA - 3' B74 5'- AGG AAG AAG GTT TTG TGT T - 3'	778		CHINA et al, 1999
<i>eae δ</i>	Int-δ 5' - TACGGATTTTGGGGCAT - 3' Int-rv 5'- TTT ATT TGC AGC CCC CCA T - 3'	545	45°C	ADU-BOBIE et al, 1998
<i>eae ε</i>	SK1 5'- CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC - 3' LP5 5'- AGC TCA CTC GTA GAT GAC GGC AAG CG - 3'	2608	52°C	OSWALD et al, 2000
<i>eae ζ</i>	SK1 5'- CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC - 3' LP6B 5'- TAG TTG TAC TCC CCT TATC C - 3'	2430	53°C	JORES et al, 2003
<i>eae ι</i>	SK1 5'- CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC - 3' LP7 5' – TTT ATC CTG CTC CGT TTG CT - 3'	2685	52°C	ZHANG et al, 2002
<i>tir α</i>	B139 5'- CAGCCTGC CACTTACCTTCACA - 3' B152 5'- CGCTAACCTCCAAACCATT - 3'	342	50°C**	CHINA et al, 1999
<i>tir β</i>	B139 5'- CAGC CTGC CACTTACCTTCACA - 3' B140 5'- GAT TTT TCC CTC GCC ACT A - 3'	560		CHINA et al, 1999
<i>tir γ</i>	B139 5'- CAG CCT GCCA CTT ACC TTC ACA - 3' B141 5'- GTC GGC AGT TTC AGT TTC AC - 3'	781		CHINA et al, 1999
<i>espB α</i>	B148 5'- GCC GTT TTT GAG AGC CA - 3' B151 5'- TCC CCA GGA CAG ATG AGA T - 3'	94		CHINA et al, 1999

Continuação Tabela 3

<i>espB</i> β	B148 5'- GCC GTT TTT GAG AGC CA - 3'	233	50°C**	CHINA et al, 1999
	B149 5'- CTT TCC GTT GCC TTA GT - 3'			
<i>espB</i> γ	B148 5'- GCC GTT TTT GAG AGC CA - 3'	188		CHINA et al, 1999
	B150 5'- GCC GTT TTT GAG AGC CA - 3'			
<i>espA</i> α	B163 5'- TGA GGC ATC TAA (AG)G(AC) GTC - 3'	269		CHINA et al, 1999
	B165 5'- GCT GGC TAT TAT TGA CCG - 3'			
<i>espA</i> β	B163 5'- TGA GGC ATC TAA (AG)G(AC) GTC - 3'	101	48°C**	CHINA et al, 1999
	B166 5'- TGC CTT TCT TAT TCT TGT CA - 3'			
<i>espA</i> γ	B163 5'- TGA GGC ATC TAA (AG)G(AC) GTC - 3'	172		CHINA et al, 1999
	B164 5'- ATC ACG AAT ACC AGT TAC CA - 3'			

*Locus of enterocyte effacement; ** Multiplex PCR.

Tabela 4: Sequências e temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos empregados para a pesquisa de genes de virulência cromossomiais, e tamanho do fragmento amplificado.

Gene	Sequências dos oligonucleotídeos	Produto da PCR (pb)	Temperatura de Anelamento	Referência
<i>stx1</i>	Stx1 F 5' - CAG TTA ATG TGG TGG CGA AGG - 3' Stx1 R 5' - CAC CAG ACA ATG TAA CCG CTG - 3'	348	56°C **	CEBULA, PAYNE & FENG, 1995
<i>stx2</i>	Stx2 F 5' - ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G - 3' Stx2 R 5' - GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C - 3'	548		
<i>cnf1</i>	Cnfs 5' - TTA TAT AGT CGT CAA GAT GGA - 3' Cnfas 5' - CAC TAA GCT TTA CAA TAT TGA - 3'	760	60°C	DE RYCKE, MILON & OSWALD, 1999
<i>kps</i>	KpsII 5' - CAT CCA GAC GAT AAG CAT GAG CA - 3' KpsI 5' - GCG CAT TTG CTG ATA CTG TTG - 3'	272	63°C	BEKAL et al, 2003
<i>fimH</i>	FimHf 5' - AAC AGC GAT GAT TTC CAG TTT GTG TG - 3' FimHr 5' - ATT GCG TAC CAG CAT TAG CAA TGT CC - 3'	465	60°C	USEIN et al, 2001
<i>afa</i>	Afa1 5' - GCT GGG CAG CAA ACT GAT AAC TCT C - 3' Afa2 5' - CAT CAA GCT GTT TGT TCG TCC GCC G - 3'	750	65°C	LE BOUGUENEC, ARCHAMBAUD & LABIGNE, 1992
<i>pap</i>	Pap1 5' - GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G - 3' Pap2 5' - GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G - 3'	328	65°C	LE BOUGUENEC, ARCHAMBAUD & LABIGNE, 1992
<i>efa-1</i>	Efa-1f 5' - TGG GCA GAA CAT TTT CAC CAG TTC - 3' Efa-r 5' - CTT TCA GGT GGG GAA CCA TAT GGC - 3'	725	58°C	MORABITO et al, 2003.
<i>iha</i>	Iha-1 5' - CTG GCG GAG GCT CTG AGA TCA - 3' Iha-2 5' - TCC TTA AGC TCC CGC GGC TGA - 3'	1305	56°C	SCHMIDT et al, 2001.
<i>hlyA</i>	HlyA-f16 5' - CAG TCC TCA TTA CCC AGC AAC - 3' HlyA-b14 5' - ACA GAC CCC TTG TCC TGA AC - 3'	355	52,6°C	PATON & PATON, 1998
<i>tccP</i>	TccPf 5' - ATG ATT AAC AAT GTT TCT TCA - 3' TccPr 5' - TCA CGA GCG CTT AGA TGT ATT A - 3'	550-1300	59°C	OGURA et al, 2007§

Continuação Tabela 4

<i>tccP2</i>	TccP2f 5'- ATG ATA AAT AGC ATT AAT TCT T - 3' TccPr 5'- TCA CGA GCG CTT AGA TGT ATT A - 3'	700-1800	54°C	OGURA et al, 2007§
<i>stx2f</i>	Stx2f f 5'-TGT CTT CAG CAT CTT ATG CAG - 3' Stx2f r 5'-CAT GAT TAA TTA CTG AAA CAG AAA C - 3'	150	58°C	WANG, CLARK & RODGERS, 2002§
<i>lpfA1-1</i>	LpfA1-AF 5'- AGT TGG TGA TAA ATC ACC AT - 3' LpfA1-AR 5'- GTG CTG GAT TCA CCA CTATTCATGC - 3'	222	59°C	TORRES et al, 2009
<i>lpfA1-2</i>	LpfA1-B1F 5'- AAG TCT GTA TTT ACT GCT ATG - 3' LpfA1-B1R 5'- GAA ATA CAG AAC GGT CTG A - 3'	273	57°C	TORRES et al, 2009
<i>lpfA1-3</i>	LpfA1-CF 5'- GGT TGG TGA CAA ATC CCC G - 3' LpfA1-CR1 5'- CGT CTG GCC TTT ACT CAG A	244	62°C	TORRES et al, 2009
<i>lpfA1-5</i>	LpfA 1-CF 5'- GGT TGG TGA CAA ATC CCC G - 3' LpfA1-CR1 5'- CGT CTG GCC TTT ACT CAG A	250	60°C	TORRES et al, 2009
<i>lpfA2-1</i>	LpfA2- B1F 5'- GGT AGT CTG GCG TCG CCA CAG A - 3' LpfA2-B1R 5'- AAT ACG AAT ACC AAG CCC G - 3'	207	69°C	TORRES et al, 2009
<i>lpfA2-2</i>	LpfA2-CF 5'- CTA CAG GCG GCT GAT GGA ACA - 3' LpfA2-CR 5'- GCT AAT ACC AGC GGC AGC ATC GT - 3'	297	72°C	TORRES et al, 2009

** Multiplex PCR; § Protocolo de PCR adaptado pelo grupo.

Tabela 5: Sequências e temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos empregados para a pesquisa de genes de virulência plasmídeos ou fragmento de plasmídeo***, e tamanho do fragmento amplificado.

Gene	Sequências dos oligonucleotídeos	Produto da PCR (pb)	Temperatura de Anelamento	Referência
<i>bfpA</i>	Bfp - 1 5' - AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC -3' Bfp -2 5' - GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA -3'	324	50°C	RILEY et al, 1995;
<i>ehxA</i>	EhxA-1 5' - GCA TCA TCA AGC GTA CGT TCC - 3' EhxA-2 5' - AAT GAC CCA AGC TGG TTA AGC - 3'	564	60°C	PATON & PATON, 1998
<i>aggR</i>	AggR F 5' - CTA ATT GTA CAA TCG ATG TA - 3' AggR F 5' - ATG AAG TAA TTC TTG AAT - 3'	308	40°C	CZECZULIN et al, 1999
<i>astA</i>	EAST11a 5' - CCA TCA ACA CAG TAT ATC CGA - 3' EAST11b 5' - GGT CGC GAG TGA CGG CTT TGT - 3'	111	55°C	YAMAMOTO & ECHEVERRIA, 1996
pEAF***	EAF-1 5' - CAG GGT AAA AGA AAG ATG ATA A -3' EAF-2 5' - TAT GGG GAC CAT GTA TTA TCA - 3'	397	60°C	FRANKE et al, 1994;

§ Protocolo de PCR adaptado pelo grupo.

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de PCR para pesquisa de genes de virulência

A **Tabela 10** apresenta de forma conjunta os resultados obtidos na caracterização dos isolados estudados.

5.1.1 Pesquisa de marcadores de virulência do “locus” LEE e marcadores de tEPEC e STEC

Os isolados humanos e caninos foram primeiramente testados quanto à subtipagem dos genes *eae*, *tir* e *espB*. Além disso, a ausência dos marcadores de tEPEC, *bfpA* e pEAF e dos marcadores de STEC, *stx1*, *stx2* e *stx2f* foi confirmada. Os resultados estão apresentados na **Tabela 10**. Os isolados provenientes de caninos já haviam sido parcialmente caracterizados quanto aos genes do “locus” LEE (ALMEIDA, 2005), porém alguns resultados foram confirmados ou testados para outros subtipos.

Na subtipagem de *eae*, 70% dos isolados apresentaram o subtipo β (n=8) ou γ (n=5) do gene *eae*. Foram identificados 5 alelos de *eae* incluindo β (n=8), γ (n=5), ϵ (n=2), β/δ (n=2) e γ/θ (n=2). O isolado canino 71 não foi subtipado para este gene com os oligonucleotídeos usados neste estudo. Na tipagem dos genes *tir*, 50% (n=10) dos isolados apresentaram o subtipo α , 40% (n=8) o subtipo β , um isolado humano apresentou resultado para dois subtipos de *tir* (α/β), e um isolado canino (71), não foi subtipado para este gene com os oligonucleotídeos utilizados.

Na tipagem dos genes *espB* encontrou-se o subtipo α e β , em 60% (n=12) e 40% (n=8) dos isolados, respectivamente. Já na subtipagem do gene *espA*, foram detectados os subtipos α e β , em 46,6% (n=7) e 40% (n=6) dos isolados caninos, respectivamente, e em 13,4% (n=2) dos isolados (71 e 72), não foi possível realizar a subtipagem para este gene com os oligonucleotídeos utilizados. A subtipagem deste gene não foi realizada nos cinco isolados humanos.

Conforme apresentado anteriormente, o isolado 71 (O159:H23), na subtipagem dos genes *tir*, *eae* e *espA*, assim como o isolado 72 (O2:H19), na subtipagem do gene *espA*, não geraram amplicons com os oligonucleotídeos utilizados neste estudo. Foram utilizados os oligonucleotídeos para os subtipos de *eae* α , β , γ , δ , ϵ , ζ , ι e θ e para detecção de *tir* e *espA* dos subtipos α , β e γ .

5.1.2 Pesquisa de marcadores de virulência cromossomiais e plasmidiais

Além da pesquisa dos genes do “locus” LEE e dos marcadores de tEPEC e STEC, todos os isolados foram testados quanto à presença de 13 genes de virulência e quanto à subtipagem de seis variantes dos genes *lpfA1* e *lpfA2*, pela técnica de PCR, cujos resultados estão apresentados nas **Tabelas 6, 7 e 10**.

Tabela 6: Isolados de aEPEC caninos e humanos quanto à presença ou ausência de genes de virulência cromossomiais e plasmidiais pesquisados neste estudo.

Isolado	<i>pap</i>	<i>afa</i>	<i>fimH</i>	<i>cnf1</i>	<i>kps</i>	<i>efa-1</i>	<i>ehxA</i>	<i>iha</i>	<i>tccP2</i>	<i>tccP</i>	<i>hlyA</i>	<i>astA</i>	<i>aggR</i>
2.3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
21	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41.1	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
41.3	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
41.4	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
41.5	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
46	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
47	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
70	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
73	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
77	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H1	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
H2	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
H3	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-
H4	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
H5	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

+: presença do gene; -: ausência do gene

Na detecção dos genes de virulência relacionados à STEC, verificou-se que o gene *efa-1* foi detectado em 35% (n=7) dos isolados, sendo seis caninos e um humano; o gene *iha* foi detectado em 25% (n=5) dos isolados, todos oriundos de humanos e em nenhum isolado canino; nenhum isolado foi positivo para o gene *ehxA* e 15% (n=3) dos isolados foram positivos para o gene *hlyA*, todos de origem humana.

Na avaliação dos genes *tccP2* e *tccP*, 35% (n=7) dos isolados foram positivos para o gene *tccP2*, sendo 4 caninos e 3 humanos, e apenas 10% (n=2) dos isolados foram positivos para o gene *tccP*, sendo um canino e um humano.

Em relação aos genes associados à EAEC, o gene *astA* foi detectado em 10% (n=2) dos isolados, ambos de caninos, entretanto, todos isolados, caninos e humanos, foram negativos para o gene *aggR*.

A maioria dos isolados, representando 85% (n=17), foram positivos para o gene *fimH*, sendo 13 oriundos de caninos e 4 de humanos. No entanto, na pesquisa dos genes *afa*, *cnf1*, *kps* e *pap*, relacionados mais diretamente à UPEC, todos os isolados caninos e humanos foram negativos para os mesmos.

Tabela 7: Isolados de aEPEC humanos e caninos quanto à subtipagem de 6 variantes da fímbria polar longa do tipo 1 e 2 (*lpfA1* e *lpfA2*).

Isolado	<i>lpfA1-1</i>	<i>lpfA1-2</i>	<i>lpfA1-3</i>	<i>lpfA1-5</i>	<i>lpfA2-1</i>	<i>lpfA2-2</i>
2.3	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	+	-
41.1	-	-	-	-	-	-
41.3	-	-	-	-	-	-
41.4	-	-	-	-	-	-
41.5	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-
47	-	+	-	+	+	-
70	-	-	-	-	+	-
71	-	-	-	-	+	-
72	-	+	-	-	+	-
73	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-
77	-	+	-	-	+	-
78	-	-	-	-	-	-
H1	-	+	-	-	+	-
H2	-	+	-	-	+	-
H3	-	+	-	-	+	-
H4	-	+	-	-	+	-
H5	-	+	-	-	+	-

Na subtipagem do gene *lpf*, 55% (n=11) dos isolados apresentaram amplificação para alguma das 6 variantes de *lpfA1* ou *lpfA2* testadas. As variantes mais frequentes foram *lpfA1-2* associado a *lpfA2-1*, encontrada em 35% (n=7) dos isolados, sendo os 5 humanos e 2 caninos (72 e 77). A variante *lpfA2-1* foi detectada em 15% (n=3) dos isolados, todos de origem canina (21, 70 e 71). Por fim, a variante *lpfA1-2* associada a *lpfA1-5* e *lpfA2-1* foi encontrada em um isolado canino (47) (Tabelas 7 e 10).

5.2 Extração e perfil plasmidial

Foi realizada a extração plasmidial de todos os isolados provenientes de caninos e de humanos. Após a realização da extração plasmidial, os isolados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 0,8%, conforme previamente relatado (Figura 2 e Tabela 8).

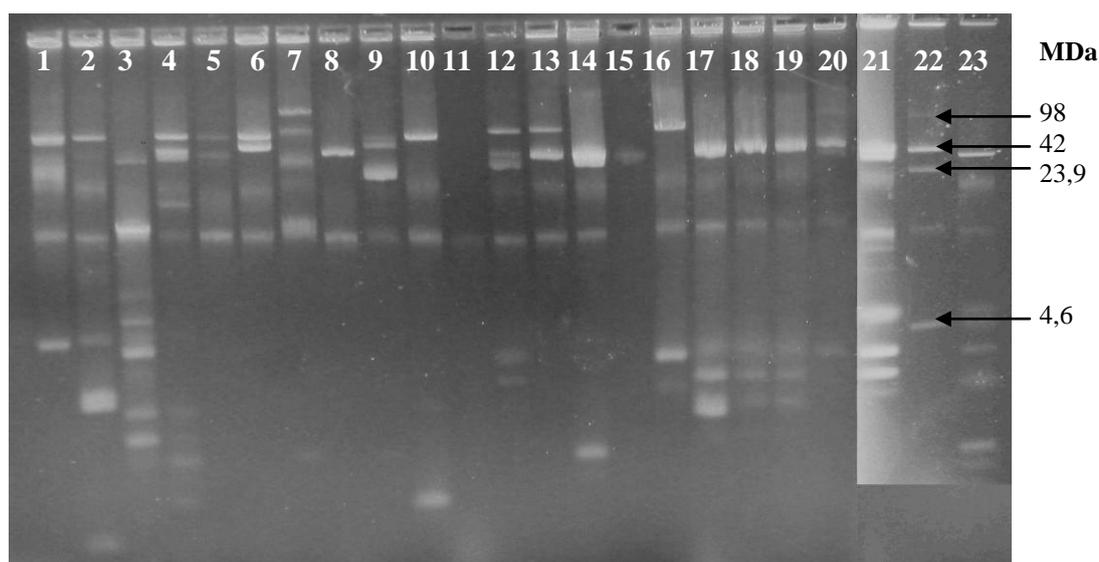


Figura 2: Foto representativa de gel de agarose a 0,8% da extração plasmidial de isolados de *E. coli* provenientes de material fecal de caninos e humanos. Poço 1: isolado H1; 2: isolado H2; 3: isolado H3; 4: isolado H4; 5: isolado H5; 6: isolado 2.3; 7: isolado 21; 8: isolado 46; 9: isolado 47; 10: isolado 70; 11: isolado 71; 12: isolado 72; 13: isolado 73; 14: isolado 75; 15: isolado 77; 16: isolado 78; 17: isolado 41.3; 18: isolado 41.4; 19: isolado 41.5; 20: controle R861 (plasmídeos de 4,6, 23,9, 42 e 98 MDa); 21: isolado 41.1; 22: controle R861; 23: controle V517 (plasmídeos de 1,1; 1,5; 1,7; 2,2; 3,0; 3,5; 4,6 e 32). MDa: Mega Dalton.

A amostra *E. coli* (K12) R861 (poços 20 e 22) é carreadora de plasmídeos de 4,6, 23,9, 42 e 98 MDa, e a amostra V517 (poço 23) é carreadora de plasmídeos de 1,1; 1,5; 1,7; 2,2; 3,0; 3,5; 4,6 e 32 MDa, as quais foram utilizadas como controle por terem plasmídeos de pesos moleculares conhecidos.

Tabela 8: Ocorrência de plasmídeos de alto e baixo peso molecular em 20 isolados aEPEC provenientes de material fecal diarréico de caninos e de humanos:

Isolado	Plasmídeo de Alto Peso Molecular (nº de bandas)	Plasmídeo de Baixo Peso Molecular (nº de bandas)
2.3	2	1
21	3	3
41.1	2	5
41.3	2	4
41.4	2	4
41.5	2	4
46	1	1
47	2	3
70	1	3
71	-	-
72	3	3
73	3	1
75	2	5
77	1	-
78	1	3
H1	2	3
H2	2	7
H3	1	9
H4	3	6
H5	2	-

5.3 Perfil genético gerado após ensaios de RAPD-PCR

Na análise dos fragmentos gerados após a realização da RAPD-PCR, observou-se que com o uso do oligonucleotídeo 1254 (**Figura 3**) obteve-se uma maior variedade de bandas polimórficas (20 bandas), que variaram de 250 a 3000 pb, em relação ao

oligonucleotídeo 1252 (**Figura 4**), que gerou um padrão de 06 bandas polimórficas, com tamanhos variando entre 500 e 2100 pb.

A matriz de distâncias gerada pelo programa RAPDistance1.04 foi utilizada para a construção de um dendograma (**Figura 5**), empregando o método UPGMA (agrupamento pareado por médias aritméticas) com o auxílio do programa MEGA4 (TAMURA et al, 1994).

Na caracterização dos isolados considerou-se como de mesmo tipo RAPD-PCR (designado por números romanos) aquelas que apresentassem índice de similaridade acima de 75% (GRIF et al, 1998). Sendo assim, obteve-se 5 tipos RAPD-PCR (nomeados I a V) e 13 subtipos (nomeados em letras minúsculas). O dendograma mostra que 13 isolados (pertencentes ao tipo I) formam um agrupamento de isolados com mais de 75% de similaridade genética.

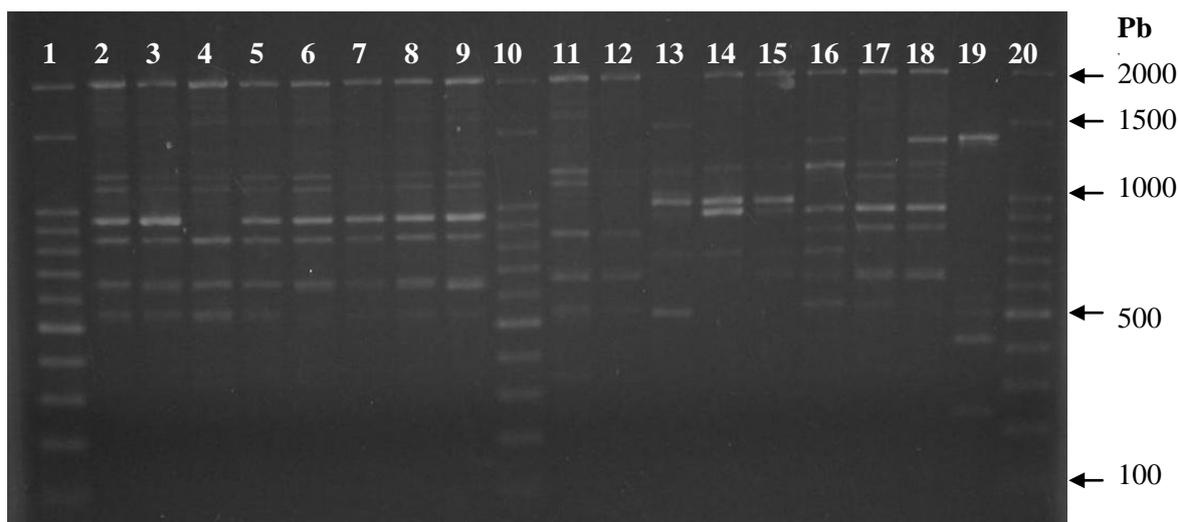


Figura 3: Foto representativa do ensaio de RAPD-PCR com oligonucleotídeo 1254 com isolados aEPEC de humanos e caninos: 1, 10 e 20: marcador de peso molecular; 2, 3, 4 e 5: isolados 2.3, 21, H1 e H5 (sorotipo O51:H40); 6 e 7: isolados 46 e H2 (sorotipo O11:H16); 8 e 9: isolados 41.4 e H3 (sorotipo O4:H16); 11 e 12: isolados 75 e H4 (sorotipo O49:H10). 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19: isolado 47 (sorotipo O156:H-), 70 (sorotipo 1812:H18), 71 (sorotipo O159:H2), 72 (sorotipo O2:H19), 73 (sorotipo O28:H16), 77 (sorotipo O117:H40) e 78 (sorotipo O136:H-). Pb: pares de bases do marcador de peso molecular.

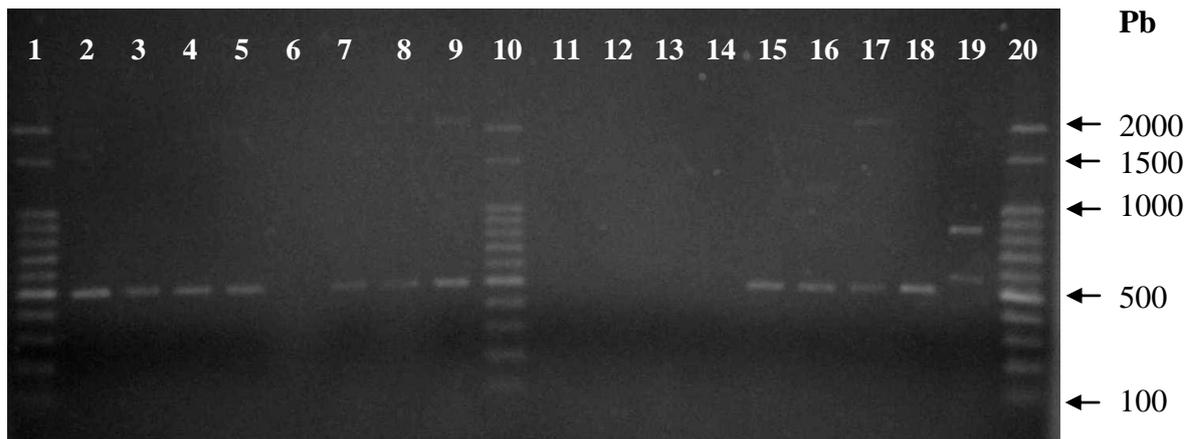


Figura 4: Foto representativa do ensaio de RAPD-PCR com oligonucleotídeo 1252 com isolados de aEPEC de humanos e caninos: 1, 10 e 20: marcador de peso molecular; 2, 3, 4 e 5: isolados 2.3, 21, H1 e H5 (sorotipo O51:H40); 6 e 7: isolados 46 e H2 (sorotipo O11:H16); 8 e 9: isolados 41.4 e H3 (sorotipo O4:H16); 11 e 12: isolados 75 e H4 (sorotipo O49:H10). 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19: isolado 47 (sorotipo O156:H-), 70 (sorotipo 1812:H18), 71 (sorotipo O159:H2), 72 (sorotipo O2:H19), 73 (sorotipo O28:H16), 77 (sorotipo O117:H40) e 78 (sorotipo O136:H-). Pb: pares de bases do marcador de peso molecular.

O tipo I compreendeu 13 isolados com mais de 75% de similaridade genética (isolados 41.1, 41.3, 41.4, 41.5, H3, 21, H2, H5, 2.3, H1, 75, H4 e 46). Todos os isolados de sorotipos comuns de caninos e humanos agruparam-se neste grupo. O tipo II compreendeu 3 isolados com mais de 80% de similaridade entre si (isolados 77, 72 e 73). O tipo III foi representado pelo isolado 47 e o tipo IV por dois isolados (70 e 71) com mais de 80% de similaridade genética entre si. O tipo V foi representado pelo isolado canino 78, que apresentou menos de 60% de similaridade com os demais grupos.

Os isolados 41.1, 41.3 e 41.5 não foram incluídos nas fotos dos géis de RAPD, pois em ensaio anterior (não mostrado), foi observado que estes isolados, juntamente com o isolado 41.4 apresentaram o mesmo perfil RAPD.

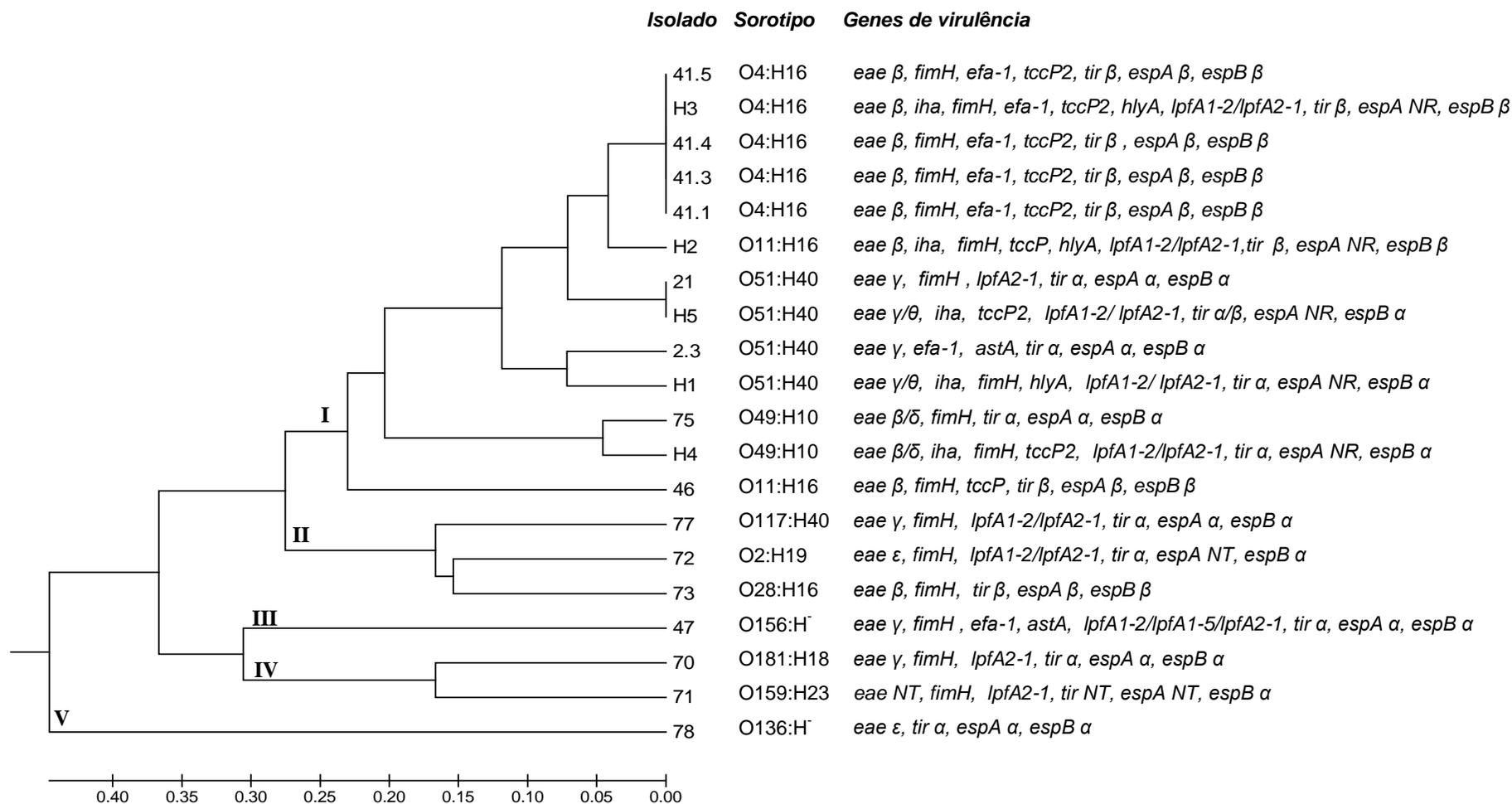


Figura 5: Dendrograma dos isolados de aEPEC de caninos e humanos (H1 a H5), construído pelo método UPGMA do Programa MEGA4 (TAMURA et al, 1994) após ensaios de RAPD-PCR com o uso dos oligonucleotídeos 1252 e 1254. Os valores da escala denotam a distância genética entre os ramos. Adicionalmente, é apresentado o perfil de marcadores de virulência presentes nos isolados do presente estudo. NT: não tipável com os oligonucleotídeos utilizados neste estudo.

5.4 Ensaio “in vitro” de aderência em células Caco-2

Os resultados foram analisados por dois avaliadores, quanto ao padrão de adesão predominante (ALL, AA, AI ou NA) e intensidade de aderência (fraca, moderada ou intensa), em células Caco-2, em 3 horas e em 6 horas de incubação (**Tabela 9**).

Devido ao fato da incubação de 3 horas ter gerado, em sua maioria, padrões de aderência fracos e/ou irregulares e indefinidos, usou-se como resultado para análise o padrão gerado após 6 horas de incubação. A maioria dos isolados, representando 90% (n=16), apresentaram um padrão ALL que variou entre fraco (n=2), fraco a moderado (n=3), moderado (n=5) e intenso (n=6) (**Figura 6**). Dois isolados apresentaram um padrão ALL associado com AP na forma de cordões, semelhantes à AA (**Figura 7**), sendo um com intensidade moderada (H3) e outro de intensidade forte (H4). Dois isolados apresentaram um padrão AI.

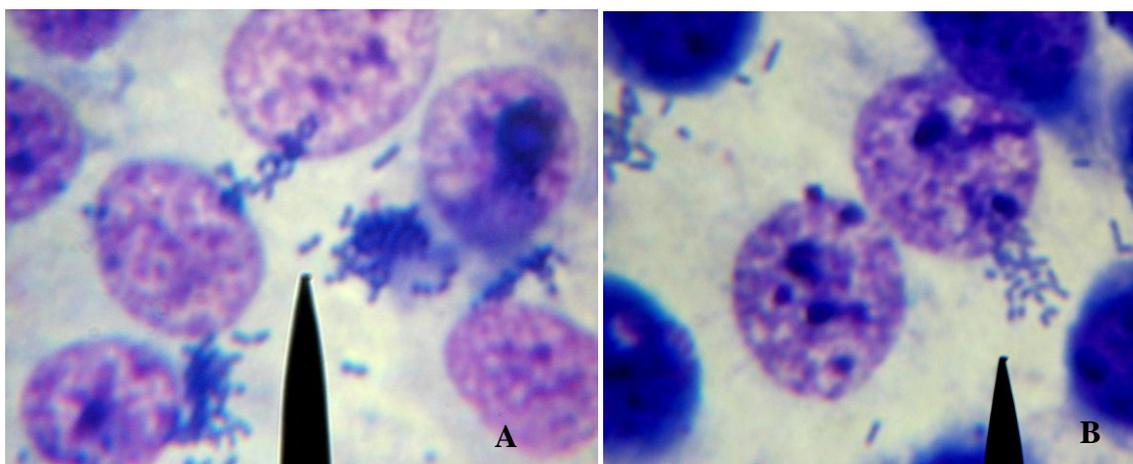


Figura 6: Foto representativa da aderência localizada “like” apresentada por isolados de aEPEC após 6 horas de interação com células Caco-2. A: isolado canino 78 (O136:H); B: isolado humano H5 (O51:H40).

Tabela 9: Aderência em células Caco-2 de 20 isolados de aEPEC de origem canina e humana após 3 e 6 horas de incubação.

Isolados	Adesão 3 horas Intensidade/Padrão Sugestivo	Adesão em 6 horas Intensidade/Padrão Sugestivo
2.3	Fraca/AI	Moderada/ALL
21	Moderada/AI	Fraca/ALL
41.1	Forte/AA	Forte/ALL
41.3	Moderada/AA	Forte/ALL
41.4	Moderada/AA	Forte/ALL
41.5	Moderada/AA	Forte/ALL
46	Fraca/AI	Forte/ALL
47	Fraca/AI	Fraca/ALL
70	Moderada/AI Periférica	Moderada/ALL
71	Fraca/AI	Fraca/Moderada/AI
72	Fraca/AI	Fraca/AI
73	Fraca/AI	Fraca/Moderada/ALL
75	Fraca/AI	Fraca/Moderada/ALL
77	Fraca/AI	Moderada/ALL
78	Fraca/AI	Forte/ALL
H1	Fraca/AI	Fraca/Moderada/ALL
H2	Moderada/AI	Moderada/ALL
H3	Moderada/AI	Moderada /ALL e AP em cordões
H4	Fraca/AI	Forte/ALL e AP em cordões
H5	Fraca/AI	Moderada/ALL

AA – Aderência Agregativa; ALL – Aderência Localizada “like”; AP - Aderência Periférica; AI – Aderência Irregular/indeterminada.

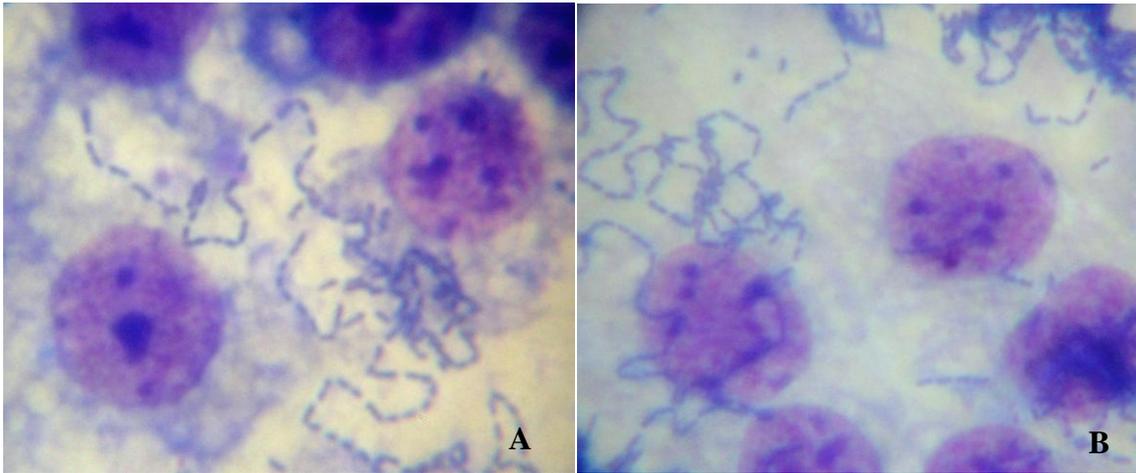


Figura 7: Foto representativa da aderência localizada “like” associada à aderência periférica na forma de cordões, apresentadas por 2 isolados humanos de aEPEC após 6 horas de interação com células Caco-2. A: isolado humano H3 (O4:H16); b: isolado humano H4 (O49:H10).

5.5 Produção de enterohemolisina e α -hemolisina

Nenhum dos isolados apresentou α -hemólise e apenas um isolado (H1, 5%) apresentou produção de enterohemolisina no teste fenotípico de produção de hemolisinas.

Tabela 10: Caracterização genotípica e fenotípica de isolados de aEPEC de origem canina e humana:

Isolado	Origem* / Cidade	Sorotipo	Genes “locus” LEE				Subtipagem genes <i>lpfA1</i> e <i>lpfA 2</i>	Outros genes de virulência**	Adesão Caco-2 (6h)	Tipo RAPD- PCR
			<i>eae</i>	<i>tir</i>	<i>espA</i>	<i>espB</i>				
2.3	Can, RJ	O51:H40	γ	α	α	α	NT	<i>efa-1, astA</i>	ALL	Id
21	Can, RJ	O51:H40	γ	α	α	α	<i>lpfA2-1</i>	<i>fimH</i>	ALL	Ic
4361-2 (H1)	Hum, SP	O51:H40	γ/θ	α	NR	α	<i>lpfA1-2/ lpfA2-1</i>	<i>iha, fimH, hlyA, ¥</i>	ALL	Ie
21323 (H5)	Hum, RJ	O51:H40	γ/θ	α/β	NR	α	<i>lpfA1-2/ lpfA2-1</i>	<i>iha, tccP2</i>	ALL	Ic
41.1	Can, RJ	O4:H16	β	β	β	β	NT	<i>fimH, efa-1, tccP2</i>	ALL	Ia
41.3	Can, RJ	O4:H16	β	β	β	β	NT	<i>fimH, efa-1, tccP2</i>	ALL	Ia
41.4	Can, RJ	O4:H16	β	β	β	β	NT	<i>fimH, efa-1, tccP2</i>	ALL	Ia
41.5	Can, RJ	O4:H16	β	β	β	β	NT	<i>fimH, efa-1, tccP2</i>	ALL	Ia
98222 (H3)	Hum, RJ	O4:H16	β	β	NR	β	<i>lpfA1-2/lpfA2-1</i>	<i>iha, fimH, efa-1, tccP2, hlyA</i>	ALL/AP§	Ia
46	Can, RJ	O11:H16	β	β	β	β	NT	<i>fimH, tccP</i>	ALL	Ih
1461-1 (H2)	Hum, SP	O11:H16	β	β	NR	β	<i>lpfA1-2/lpfA2-1</i>	<i>iha, fimH, tccP, hlyA</i>	ALL	Ib
75	Can, RJ	O49:H10	β/δ	α	α	α	NT	<i>fimH</i>	ALL	If
21535 (H4)	Hum, RJ	O49:H10	β/δ	α	NR	α	<i>lpfA1-2/lpfA2-1</i>	<i>iha, fimH, tccP2</i>	ALL/AP§	Ig
47	Can, RJ	O156:H	γ	α	α	α	<i>lpfA1-2/lpfA1-5/lpfA2-1</i>	<i>fimH, efa-1, astA</i>	ALL	III
70	Can, RJ	O181:H18	γ	α	α	α	<i>lpfA2-1</i>	<i>fimH</i>	ALL	IVa
71	Can, RJ	O159:H23	NT	NT	NT	α	<i>lpfA2-1</i>	<i>fimH</i>	AI	IVb
72	Can, RJ	O2:H19	ε	α	NT	α	<i>lpfA1-2/lpfA2-1</i>	<i>fimH</i>	AI	IIb
73	Can, RJ	O28:H16	β	β	β	β	NT	<i>fimH</i>	ALL	IIc
77	Can, RJ	O117:H40	γ	α	α	α	<i>lpfA1-2/ lpfA2-1</i>	<i>fimH</i>	ALL	IIa
78	Can, RJ	O136:H	ε	α	α	α	NT	-	ALL	V

*Todos isolados provenientes de fezes diarreicas; **todos os isolados foram negativos na PCR para os genes *stx2f, afa, cnf1, pap, kps, stx1, stx2, aggR, pEAF e bfpA*; Can: Canino; Hum: Humano; ¥ Produtor de enterohemolisina; -: PCR negativa; NR: Não realizado; NT: Não tipável com os oligonucleotídeos utilizados; ALL: Aderência Localizada “like”; AP: Aderência Periférica; AP§: AP em forma de cordões, semelhante à aderência agregativa; AI: Aderência Irregular.

6 DISCUSSÃO

Cepas de aEPEC vêm sendo detectadas de forma crescente nos últimos anos, tanto em países desenvolvidos, como em desenvolvimento. A interação de animais e humanos na epidemiologia de aEPEC ainda está por ser esclarecida. O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de comparar isolados de aEPEC proveniente de cães e de crianças, sendo que alguns sorotipos, como O4:H16, O11:H16, O49:H10 e O51:H40 foram recuperados de crianças e de cães. Os demais isolados de aEPEC estudados, dos sorotipos O2:H19, O28:H16, O117:H40, O136:H-, O156:H, O159:H23 e O181:H18, foram recuperados apenas de cães.

Ainda não se tem comprovação do reservatório de cepas aEPEC e muitos estudos têm sido realizados nos últimos cinco anos para caracterizar estas amostras, genética e fenotipicamente, com o intuito de melhor compreendê-las. O contato próximo entre os cães e humanos não pode ser subestimado e, tendo-se isolado no nosso laboratório diversas cepas de aEPEC de cães, procurou-se avaliar cepas de aEPEC de mesmo sorotipo provenientes de humanos, com a finalidade de compará-las e avaliá-las quanto a sua similaridade. Para esta comparação, realizou-se a pesquisa de 13 genes de virulência, muitos deles relacionados a outros patótipos de *E. coli*, além da subtipagem dos genes do “locus” LEE (*eae*, *tir*, *espB* e *espA*) e da caracterização de 6 subtipos da fímbria polar longa *lpfA1* e *lpfA2*. Além da pesquisa e caracterização de genes de virulência, foram realizados ensaios de RAPD-PCR, determinação do perfil plasmidial, ensaios de adesão “in vitro” em células Caco-2 e teste fenotípico de produção de hemolisinas.

A caracterização dos genes do “locus” LEE já havia sido parcialmente realizada nos 15 isolados caninos (ALMEIDA, 2005), porém alguns resultados foram confirmados. Todos os 20 isolados foram positivos para algum dos 4 genes do “locus” LEE estudados. A detecção dos genes do “locus” LEE em cepas EPEC é um indicador de seu potencial para formar lesões A/E (CLEARY et al, 2004).

Na subtipagem de *eae*, que é a proteína que promove a adesão íntima da bactéria à célula do hospedeiro na lesão A/E, foram identificados 5 alelos de *eae*, sendo os mais comuns os subtipos β (8 isolados) e γ (5 isolados), além de ε (2 isolados), β/δ (2 isolados) e γ/θ (2 isolados). O predomínio destes genótipos de *eae* coincide com outros relatos, nos quais geralmente tem-se um perfil variado de subtipos de *eae* em aEPEC, porém ocorrendo uma maior frequência dos subtipos α , β , γ , ζ , δ e ε entre aEPEC de diferentes sorotipos do

mundo inteiro (GOMES et al, 2004, revisado em HERNANDES et al, 2009). Os resultados coincidem também com estudo recente que abordou 126 isolados de aEPEC provenientes de humanos, e encontrou os subtipos α , β e γ de *eae* como sendo os mais frequentes (SCALETSKY et al, 2010). Entretanto, outro estudo recente realizado com crianças do Peru encontrou os subtipos β , θ e κ como os mais frequentes neste patotipo (CONTRERAS et al, 2010). Moura e colaboradores (2009), estudando cepas de aEPEC de diversas fontes animais, encontraram, para a totalidade dos isolados de cães, os subtipos $\beta 1$ (2 isolados) e γ/θ (3 isolados). Esses dados mostram a variabilidade genética de cepas aEPEC, nas quais um mesmo sorotipo pode carrear diferentes subtipos de intimina.

A presença de dois subtipos de *eae* (gene *eae*) no isolado canino 75 e nos isolados humanos H1, H4 e H5, foi confirmada por meio da realização de várias reações de PCR. Como poderia haver a possibilidade de existir mais de uma cepa de *E. coli* no mesmo estoque bacteriano, foi realizado cultivo e reativação destes isolados em ágar TSA, com o isolamento de colônias. Após, foram selecionadas 10 colônias de cada isolado para extração do DNA separadamente. Foi realizada a subtipagem deste gene nestas 10 extrações provenientes de cada isolado, obtendo-se o mesmo resultado.

A intimina δ é considerada por Oswald e colaboradores (2000) como um subtipo de β ($\beta 2$) caracterizável por meio de análise de RFLP do amplicom. Os alelos de intimina α , β e γ foram subgrupados, por análise de restrição, em $\alpha 1$ - $\alpha 2$, $\beta 1$ - $\beta 2$ e $\gamma 1$ - $\gamma 2$ (OSWALD et al, 2000). A variante $\beta 2$ foi chamada de δ por Adu-Bobie e colaboradores (1998), explicando o motivo pelo qual os dois isolados do sorotipo O49:H10 (75 e H4) amplificaram para os dois subtipos, β e δ (ou seja, provavelmente são a mesma variante). Além disso, quando se analisa a árvore filogenética das variantes de intimina apresentada por Zhang e colaboradores (2002), observa-se que a variante $\gamma 2$ é idêntica à variante θ , o que por sua vez explica o fato de os dois isolados humanos do sorotipo O51:H40 terem amplificado para γ e θ . O grau de divergência entre intiminas varia em diferentes regiões da molécula, e quando se avalia a região C-terminal da molécula, a intimina θ é similar à intimina γ (TARR & WHITTAM, 2002). Essa variação evidencia que essas recombinações intragênicas são frequentes (McGRAW et al, 1999), e sugerem novamente o motivo pelo qual estes isolados foram positivos para estes dois subtipos de *eae*. Análises adicionais, como o sequenciamento genético, são necessárias para esclarecer estas dúvidas. Segundo Blanco e colaboradores (2006b), os genes das intiminas $\gamma 1$, $\gamma 2$ e θ estão reunidos em um dos seis grupos de genes de intiminas que são proximamente relacionadas. Os mesmos autores em outro relato comentam

que o subtipo $\gamma 1$ tem 91% de similaridade genética com θ , e $\gamma 2$ tem 99% de similaridade com θ (BLANCO et al, 2006a).

Na tipagem do gene *tir*, que é o gene que codifica a proteína translocada pelo T3SS e que atua como receptor de *eae*, 50% dos isolados (n=10) apresentaram o subtipo α , 40% o subtipo β (n=8) e um isolado humano apresentou resultado para dois subtipos de *tir* (α/β). No estudo realizado com cepas aEPEC por Moura e colaboradores (2009), os subtipos de *tir* mais comumente encontrados também foram α e β .

Na tipagem dos genes *espB* encontrou-se o subtipo α e β em 60% (n=12) e 40% (n=8) dos isolados, respectivamente. Já na subtipagem do gene *espA*, foram detectados os subtipos α e β em 46,6% (n=7) e 40% (n=6) dos isolados caninos, respectivamente, e em dois isolados (13,4%) não foi possível realizar a subtipagem com os oligonucleotídeos utilizados. A subtipagem do gene *espA* não foi realizada nas cinco cepas humanas. Os genes *espA* e *espB* estão localizados em LEE4, e foram encontrados em uma alta frequência nas cepas estudadas. Ambos codificam proteínas que fazem parte do T3SS. No estudo de Mairena e colaboradores (2004), apenas 38,9% das cepas de aEPEC possuíam o gene *espB*, porém foram utilizados oligonucleotídeos que amplificam outros fragmentos do gene, provenientes do protótipo EPEC 2348/69, o que pode explicar sua baixa frequência, ao contrário do presente estudo, no qual 100% dos isolados foram subtipados para *espB*.

Alguns isolados não foram tipáveis para alguns genes do “locus” LEE, como o isolado 71, com o qual não se obteve amplificação para os subtipos de *eae*, *tir* ou *espA* investigados. No entanto, todos os isolados amplificaram para algum dos subtipos de *espB* testados, assim como encontrado por Moura e colaboradores (2009) em um estudo com cepas aEPEC. Esses dados sugerem que as aEPEC podem adquirir a região LEE inteira ou apenas alguns genes desta região (AFSET et al, 2008). Ressalta-se, entretanto, que o isolado canino 71, de sorotipo O159:H23, não teve seu gene *eae* subtipado, porém foi positivo na PCR realizada com primer genérico de *eae* (dado não mostrado). Apesar de terem sido realizados testes com os principais oligonucleotídeos para os principais subtipos de intimina encontrados em aEPEC, para definir seu subtipo entre os 28 existentes são necessários ensaios mais completos, como descrito por Lacher e colaboradores (2006), que utilizaram um protocolo de RFLP fluorescente revelado em eletroforese capilar. Neste estudo, foram utilizados oligonucleotídeos que amplificam para 26 destes 28 subtipos. Também não foi possível subtipar os genes *tir* e *espA* deste isolado 71, como informado anteriormente, assim como o gene *espA* do isolado 72, com os oligonucleotídeos utilizados em nosso laboratório.

Os isolados 70, 71 e 72 foram os únicos isolados, entre os caninos, que foram negativos no teste FAS (“fluorescent actin staining”) (dados não mostrados) (ALMEIDA, 2005), que é um teste realizado para detecção “in vitro” da formação da lesão A/E (KNUTTON, LLOYD & McNEISH, 1987). Esses resultados em conjunto podem indicar a incapacidade funcional do “locus” LEE nestas cepas e/ou a ocorrência de subtipos diferentes dos amplificados pelos oligonucleotídeos utilizados neste estudo, conforme já observado por Mairena e colaboradores (2004). Como são FAS negativas provavelmente possuem um “locus” LEE defectivo, entretanto, mesmo sendo FAS negativas, por ser este um ensaio “in vitro”, devem ser realizados ensaios “ex vivo” para a confirmação da incapacidade da formação da lesão A/E (BAI et al, 2008). A porção C-terminal da intimina é responsável pela ligação com o receptor celular, sugerindo que diferentes intiminas podem ser responsáveis por diferentes tropismos às células do tecido do hospedeiro (TORRES, ZHOU & KAPER, 2005). Estudos de sequenciamento genético podem excluir a presença ou caracterizar o seu subtipo.

Conforme esperado, todos os 20 isolados foram negativos na PCR para pEAF e *bfpA*, marcadores de tEPEC, assim como para *stx1*, *stx2* e *stx2f*, genes da toxina Shiga subtipos 1, 2 e 2f, marcadores de STEC. Sabe-se que esta diferenciação entre tEPEC e aEPEC não é simples pois algumas cepas podem ser negativas para o marcador de pEAF, mas podem expressar o Bfp, sendo então classificadas como cepas de tEPEC (TRABULSI, KELLER & GOMES, 2002; ABE et al, 2009). O contrário também é válido, já que cepas podem ser positivas para o gene *bfpA* e negativas para pEAF, porém não expressam Bfp no teste fenotípico, sendo classificadas como aEPEC (TRABULSI, KELLER & GOMES, 2002; ABE et al, 2009). Em relação aos marcadores de STEC, optou-se por testar o gene *stx2f* devido a um relato recente da sua detecção em cepas classificadas anteriormente como aEPEC, provenientes de crianças com diarreia, e que foram reclassificadas no patotipo STEC depois da detecção desta variante (PRAGER et al, 2009). O subtipo 2f era associado apenas a *E. coli* provenientes de pombos selvagens (MORABITO et al, 2001). Como o pEAF não é encontrado em cepas STEC, a presença de genes codificadores da toxina Shiga é o critério para diferenciar STEC de aEPEC (KAPER, 1996).

Apesar dos genes relacionados às cepas de UPEC já terem sido relatados em cepas EPEC, como a adesina afimbrial I (*afa*), o pilus associado a pielonefrite (*pap*) e a cápsula do grupo II (*kps*), relatados por BEKAL e colaboradores (2003), assim como o fator de necrose citotóxica 1 (*cnf1*), relatado por TAVECHIO e colaboradores (2004), os mesmos não foram detectados nos 20 isolados de aEPEC deste estudo. Os genes *pap*, *cnf* e *kps* também já foram

encontrados em cepas provenientes de fezes humanas (revisado em YAMAMOTO et al, 2007). Além disso, o gene da adesina Afa foi relatado recentemente em 10% de 126 cepas de aEPEC de humanos (SCALETSKY et al, 2010). A fímbria do tipo 1, que é codificada pelo gene *fimH*, é o fator de virulência mais comum entre cepas UPEC (USEIN et al, 2001; revisado em YAMAMOTO et al, 2007), porém é frequentemente encontrado em cepas não-UPEC (revisado em YAMAMOTO et al, 2007; REGUA-MANGIA et al, 2009). Para o gene *fimH*, verificou-se que 85% dos isolados foram positivos, sendo 13 caninos e 4 humanos. Apenas 2 isolados caninos e 1 humano não foram positivos para este gene com os oligonucleotídeos utilizados, sendo que a negatividade da reação de PCR não significa que o operon *fim* está ausente nestas cepas, já que este gene é reconhecidamente variável (SOKURENKO et al, 1998).

Um aspecto chave da infecção intestinal causada por *E. coli* é a colonização do trato gastrointestinal, que é mediada por fatores de aderência específicos. As cepas aEPEC possuem a adesina intimina, porém não possuem o Bfp, que, juntamente com o pEAF, é um dos diferenciais das cepas tEPEC, que os possuem. Sendo assim, pesquisaram-se a presença de outros genes associados à adesão, muitos deles característicos de outros patótipos, como por exemplo, as adesinas codificadas pelos genes *efa-1* e *iha*.

O gene *efa-1* foi detectado em 35% dos isolados, sendo 6 caninos e 1 humano, sendo que o isolado humano H3 positivo para esta adesina também possui os genes de aderência *iha* e *lpfA*. Nicholls e colaboradores (2000) encontraram a sequência genética *efa-1* em 100% das cepas positivas para *eae*, porém, Scaletsky e colaboradores (2010) encontraram 32% de 126 cepas aEPEC, positivas para *efa1*.

Entre os isolados estudados no presente trabalho, o gene da adesina Iha (*iha*) foi detectado em todos (n=5) isolados oriundos de humanos (25% do total de isolados) e o gene da alfa-hemolisina (*hlyA*) foi detectado em 3 isolados humanos (15% do total de isolados), mostrando o maior potencial virulento dos isolados humanos em relação aos isolados caninos. Estudo recente realizado em São Paulo, mostrou que entre 117 cepas de aEPEC, 26,5% possuíam o gene *lpfA*_{O113}, 25,5% possuíam o gene *iha* e 6% o gene *ehxA*, que são genes de virulência de STEC (revisado em HERNANDES et al, 2009). Em outro estudo recente, envolvendo a análise de 126 cepas de aEPEC provenientes de humanos, foram encontrados 25% das cepas positivas para *lpfA*_{O113} e 21% para *iha* (SCALETSKY et al, 2010). Entretanto no presente estudo, no teste fenotípico, um isolado humano (H1, do sorotipo O51:H40) produziu enterohemolisina e nenhum produziu alfa-hemolisina. Este

resultado sugere que o gene da alfa-hemolisina (*hlyA*) não está sendo expresso ou é um gene defectivo, sendo que diversos fatores podem estar associados à repressão do gene ou síntese do seu produto. De outra forma, o isolado H1 produziu a enterohemolisina mas não teve seu gene *ehxA* amplificado.

Os resultados mostram que as cepas humanas foram positivas, em diferentes frequências de ocorrência, para diversos dos genes de STEC testados (*efa-1*, *iha*, *hlyA*). Entre estes genes, os isolados caninos só foram positivos para o gene *efa-1* (6 isolados). Alguns autores inclusive já sugeriram que a maioria das cepas aEPEC associadas com diarreia sanguinolenta em humanos são provavelmente EHEC que perderam os fagos codificadores de Stx durante a infecção (BIELASZEWSKA et al, 2008), o que também pode ser sugerido em relação aos isolados humanos, que apresentaram diversos genes de virulência relacionados à STEC (100% dos isolados humanos positivos para *iha*, 60% positivos para *hlyA* e 20% positivos para *efa-1*). Se os genes são expressos, ou quando o são, ainda não se sabe, porém muitos dos genes testados são associados à diarreia, como os genes *efa-1*, *lpfA* (AFSET et al, 2006) e *astA* (DULGUER et al, 2003).

O gene *efa1* foi primeiramente estudado em uma cepa do patotipo STEC do sorotipo O111:H, obtida de um paciente com HUS (síndrome urêmica hemolítica), porém os mesmos autores investigaram a sua presença e encontraram este gene em 116 amostras de *E. coli eae+* (99 EHEC, 15 EPEC e 2 REPEC), não o encontrando em nenhuma cepa negativa para *eae*. Mesmo com esta alta prevalência em cepas carreadoras de intimina, concluíram que esta adesina não é requerida para a formação da lesão A/E. A sua ausência em cepas não patogênicas e sua presença ubíqua em *E. coli* que possuem *eae* demonstram o seu papel na virulência (NICHOLLS et al, 2000).

Aparentemente as cepas de origem humana se mostraram mais virulentas, sugerindo a proximidade do patotipo aEPEC com STEC, conforme já relatado, devido a frequência na detecção de fatores de virulência relacionados a este patotipo. O mesmo pode ser corroborado quando se percebe que 55% (n=11) dos 20 isolados possuem o genes *lpfA1* e/ou *lpfA2*, os quais foram detectados primeiramente em STEC (TORRES et al, 2002), mas que posteriormente foram detectados em outros patotipos de *E. coli*, como tEPEC, aEPEC, ExPEC e até mesmo cepas comensais (TORRES et al, 2009). Este trabalho associou as intiminas $\beta 1$ ou $\epsilon 2$ combinadas com as variantes de *lpfA1-2* e *lpfA2-1* em isolados de aEPEC. Entre os 7 isolados (35%) do presente estudo que apresentaram essa combinação de *lpfA*, 4 foram positivos para os subtipos β ou ϵ (H2, H3, H4 e 72) de intimina (sendo que um destes

isolados, H4, amplificou também para o subtipo δ de intimina além do β), e entre as demais cepas que tiveram essa combinação de *lpf*, uma foi positiva para o subtipo γ (77) e 2 para γ/θ (H1 e H5). Outros 3 isolados que amplificaram para o gene da proteína Lpf, todos oriundos de caninos (21, 70 3 71), apresentaram apenas o subtipo *lpfA2-1*, com as intiminas do subtipo γ (21 e 70) ou NT (71), sendo que a presença de ambos os alelos de *lpf* em um isolado foi sugerido por Torres e colaboradores (2009) de ser encontrado em cepas patogênicas de *E. coli*, mostrando que estas cepas talvez não sejam tão virulentas, até porque as mesmas foram positivas apenas para o gene *fimH* entre os 13 genes de virulência testados. Um isolado canino (47, de sorotipo O156:H) amplificou para 3 subtipos de *lpfA*, evidenciando uma combinação única de duas variantes de *lpfA1* (*lpfA1-2* e *lpfA1-5*) associada à variante *lpfA2-1*. Torres e colaboradores (2009) encontraram uma combinação única, porém com as variantes *lpfA1-5* com *lpfA2-1* em uma cepa O145:H8 proveniente do Chile, sendo este resultado da cepa canina inesperado. O trabalho de Torres e colaboradores (2009) evidencia que a aquisição de diferentes clusters do gene *lpfA* em linhagens específicas de *E. coli* podem estar contribuindo para a emergência de cepas altamente virulentas, derivadas de organismos comensais que também possuem variantes de *lpfA* únicas.

Em relação à presença de genes relacionados a EAEC, 10% (n=2) dos isolados foram positivos para o gene *astA*, sendo os dois oriundos de caninos. Yuste e colaboradores (2006) encontraram 15,6% de amostras de AEEC, provenientes de bovinos saudáveis, positivas para este gene, que é considerado um determinante adicional na patogênese da diarreia por *E. coli*. Dulguer e colaboradores (2003) associaram a presença deste gene em aEPEC com a ocorrência de diarreia em crianças. Todos os isolados de crianças do presente estudo foram provenientes de fezes diarreicas e foram negativos para *astA*. Os dois isolados de caninos positivos para *astA* foram também positivos para *efa-1* e foram provenientes de fezes diarreicas. Ruttler e colaboradores (2006) encontraram uma alta frequência deste gene em EPEC isoladas de crianças com diarreia na Argentina. Uma cepa de aEPEC foi detectada em um surto de diarreia aquosa em adolescentes no Japão e a mesma era positiva para o gene *astA* (YATSUYANAGY et al, 2003). Entretanto, no estudo recente de Moura e colaboradores (2009), envolvendo 42 isolados de aEPEC de humanos e animais (cães, gatos, macacos e bovinos), não foi encontrada a presença deste gene em nenhum isolado, evidenciando mais uma vez a heterogeneidade genética das cepas aEPEC.

Na avaliação dos genes que codificam as proteínas TccP e TccP2, que estão envolvidas nas vias de remodelamento da actina para formação da lesão A/E, 35% dos

isolados foram positivos para o gene *tccP2*, sendo 4 caninos e 3 humanos, e apenas 2 isolados (10%), foram positivos para o gene *tccP*, sendo um canino e um humano, ambos de mesmo sorotipo (O11:H16). 100% de EHEC O157:H7 são positivos para TccP (GARMENDIA et al 2005), porém os genes que codificam esta proteína foram também encontrados em isolados de tEPEC e aEPEC (GARMENDIA et al 2005; WHALE et al, 2006). Garmendia e colaboradores (2005) pesquisaram a presença de *tccP* em 246 isolados de aEPEC e encontraram apenas 10 cepas (4,1%) positivas, cujos tamanhos variaram de 850 a 1300 pb, e entre estes isolados positivos de aEPEC, um é pertencente ao sorotipo O11:H16, que foi justamente o único sorotipo positivo para o gene *tccP* no presente estudo (2 isolados). Ooka e colaboradores (2007) pesquisaram a presença do gene *tccP2* em 83 não-O26 aEPEC e observaram uma frequência de 41% de cepas positivas. Entre as cepas O26, encontraram 82,3% positivas para este gene. Neste mesmo estudo, não foi encontrada nenhuma cepa do sorotipo O51:H40 positiva para *tccP2* ou *tccP*.

O *tccP* presente na cepa EDL 933 é de 1150 pb (GARMENDIA et al, 2004). Este gene exibe polimorfismo de tamanho entre cepas (550 a 1300 pb), sendo que em isolados de EPEC, o gene comumente tem tamanho de 870 pb (GARMENDIA et al, 2005; WHALE et al, 2006). No presente estudo verificou-se que o fragmento encontrado é de aproximadamente 1000 pb.

Comparando-se a ocorrência dos fatores de virulência testados, que não os do “locus” LEE, dos isolados de sorotipos comuns, isto é, que foram recuperados de caninos e também de humanos, percebe-se que o representante humano de cada sorotipo apresenta um perfil genotípico mais virulento, ou seja, com uma maior presença dos genes de virulência testados. Comparando os dois isolados de sorotipo O51:H40 de origem humana e dois isolados de origem canina do mesmo sorotipo, verifica-se que enquanto os dois isolados humanos (H1 e H5) apresentaram o gene *iha* e um deles (H5) apresentou também o gene *tccP2* e o outro (H1) apresentou também o gene *hlyA*, um dos representantes canino deste sorotipo (isolado 2.3) apresentou os genes *efa-1* e *astA*. Além disso, um dos isolados humanos (H1) e um canino (21) apresentaram também o gene *fimH*. Na avaliação da tipagem de *lpfA*, verificou-se que os dois isolados humanos foram subtipados como *lpfA1-2* associado à *lpfA2-1*, enquanto que entre os isolados caninos, o isolado 21 apresentou apenas o subtipo *lpfA2-1* e o isolado 2.3 foi negativo para *lpfA* com os oligonucleotídeos testados. Apesar destes dois isolados caninos do sorotipo O51:H40 mostrarem-se virulentos, os representantes humanos apresentaram um perfil virulento mais pronunciado.

Comparando os isolados do sorotipo O4:H16, e tendo em vista que os quatro representantes caninos deste sorotipo (41.1, 41.3, 41.4 e 41.5) foram isolados do mesmo animal em períodos diferentes, verifica-se que todos foram positivos para os genes *fimH*, *efa-1* e *tccP2*, enquanto que o representante humano deste sorotipo (H3), mostrou amplificação na PCR para estes três genes e também para os genes *iha* e *hlyA*. Na tipagem de *lpfA* apenas o isolado humano foi subtipado, para *lpfA1-2* associado à *lpfA2-1*, sendo que os isolados caninos foram negativos para *lpfA* com os oligonucleotídeos testados, evidenciando mais uma vez o potencial virulento dos isolados humanos.

Na comparação dos isolados de sorotipo O11:H16, o representante humano (H2) foi positivo para os genes *iha*, *fimH*, *tccP* e *hlyA*, enquanto o representante canino (46) foi positivo apenas para *fimH* e *tccP*. Na subtipagem de *lpfA*, o isolado humano foi subtipado como *lpfA1-2* associado à *lpfA2-1* e o isolado canino foi negativo para *lpfA* com os oligonucleotídeos testados.

Já na comparação do sorotipo O49:H10 essas diferenças também foram marcantes, sendo que o isolado canino (75) foi positivo apenas para o gene *fimH*, enquanto o isolado humano (H4) foi positivo para *fimH*, *iha* e *tccP2*, além de possuir também, assim como os demais isolados humanos deste estudo, os subtipos *lpfA1-2* e *lpfA2-1*.

Quando se avalia os isolados dispostos no dendograma, observa-se que mesmo os isolados sendo diferentes em seus perfis genéticos, tanto sob o ponto de vista dos isolados de mesmo sorotipo, quanto do ponto de vista de isolados caninos “versus” humanos, o que chama atenção é que 13 isolados possuem 75% de similaridade, a partir dos resultados gerados após os ensaios RAPD-PCR, constituindo um agrupamento genético formado pelo tipo I. No Tipo I estão agrupados todos os isolados de sorotipo comum a humanos e caninos, dos sorotipos O4:H16 (4 caninos e 1 humano), do sorotipo O11:H16 (um humano e um canino), do sorotipo O49:H10 (um humano e um canino), além dos quatro isolados do sorotipo O51:H40 (H1, H5, 2.3 e 21). Com exceção dos quatro isolados O51:H40 e dos dois isolados O49:H10, os demais participantes do grupo I são possuidores do antígeno flagelar H16. Pode-se observar também que o isolado canino do sorotipo O11:H16 (isolado 46), ficou agrupado no tipo I, porém distante dos demais representantes de sorotipo igual, evidenciando mais uma vez a heterogeneidade do patotipo das aEPEC.

Quando se analisam os isolados com uma maior proximidade genética, os isolados 2.3 e H1 (sorotipo O51:H40), que apresentam mais de 90% de similaridade genética no RAPD-PCR, e os isolados 21 e H5 (sorotipo O51:H40), que apresentaram 100% de

similaridade genética entre si, observa-se que, em relação ao perfil plasmidial, todos os isolados possuem no mínimo dois plasmídeos de alto peso molecular, sendo que o isolado canino 21 possui três plasmídeos de alto peso, porém os perfis plasmidiais são diferentes.

Os isolados 75 e H4 (sorotipo O49:H10) têm 95% de similaridade genética no RAPD-PCR, e observa-se diferença nos perfis plasmidiais entre estes dois isolados de mesmo sorotipo, canino e humano.

Os isolados 41.1, 41.3, 41.4 e 41.5 foram recuperados de um mesmo cão, em períodos diferentes (dados não mostrados), e após os ensaios de RAPD-PCR e de pesquisa dos genes de virulência, observou-se que se trata de um mesmo isolado, já que mostram 100% de similaridade genética no dendograma, além de apresentarem o mesmo perfil de marcadores de virulência. Na avaliação do perfil plasmidial gerado para estes quatro isolados, observa-se que os isolados 41.3, 41.4 e 41.5 apresentam perfil idêntico. O isolado 41.1 foi colocado em outro gel no momento da corrida eletroforética, o que dificultou sua comparação com os demais isolados do mesmo animal, porém é similar aos demais. Além disso, o isolado H3, proveniente de humano, tem 100% de similaridade genética com estas cepas 41.1, 41.3, 41.4 e 41.5, e é também do sorotipo O4:H16. Este grupo, associado ao H3, têm 95% de similaridade genética com H2, que é do sorotipo O11:H16. O isolado H3 possui um plasmídeo de alto peso molecular e o H2 possui dois, porém os perfis são diferentes entre si e diferentes dos isolados 41.1, 41.3, 41.4 e 41.5.

O isolado 77 apresentou apenas uma banda de plasmídeo, e o isolado 71 não apresentou bandas plasmidiais, apenas a banda referente ao DNA cromossômial), o que ocorreu por dispersão do material na hora da sua pipetagem no gel de agarose ou, menos provavelmente, por ausência de plasmídeos nestas amostras. Os demais isolados apresentaram plasmídeos de alto e/ou baixo peso molecular, e que mostram um perfil variado. Vale ressaltar, entretanto, que todos os isolados (com exceção de 71 e 77), apresentaram plasmídeos de alto peso molecular, nos quais a presença de genes de virulência é maior se comparado com os plasmídeos de baixo peso molecular.

Nos ensaios de adesão em células Caco-2, a maioria dos isolados (80%, 16 isolados) apresentou, após 6 horas de interação, o padrão ALL, 10% (2 isolados humanos) apresentaram um padrão ALL, porém com regiões semelhantes à AA (aderência agregativa), com grupos de bactérias se organizando na forma de cordões, e 10% (2 isolados caninos) apresentaram um perfil de aderência irregular/indeterminado. Sabe-se que não existe um padrão característico único em cepas aEPEC, ao contrário de cepas tEPEC (que fazem uma

aderência localizada) ou EAEC (que mostram um padrão agregativo característico), as aEPEC podem apresentar tanto os padrões ALL, que é o mais frequentemente encontrado nestas cepas (VIEIRA et al, 2001, GOMES et al, 2004; SCALETSKY et al, 2010), quanto LA, DA, AA ou até mesmo não serem aderentes (revisado em HERNANDES et al, 2009; SCALETSKY et al, 2010). Entre os 18 isolados com padrão ALL em células Caco-2, apenas 3 deles, 2 caninos (21 e 41.5) e 1 humano (H5) não apresentaram o mesmo padrão em células HeLa/HEp-2 (dados não mostrados). O isolado canino 21 apresentou um perfil de aderência indeterminado em células HeLa (ALMEIDA, 2005), assim como o isolado humano H5 em HEp-2 (GIRÃO, 2007). O isolado canino 41.5 não teve seu perfil de adesão testado em células HEp-2 ou HeLa. Entretanto, os padrões característicos em *E. coli* só podem ser definidos em ensaios com HeLa/HEp-2, pois em outras linhagens esses padrões podem variar se as condições ambientais favorecerem a expressão de outras adesinas. Em Caco-2 as diferenças de padrão devem-se a outros receptores, presença de regiões periféricas menos diferenciadas ou meio de cultivo diferente, como já explanado anteriormente, sendo inapropriada a comparação entre os padrões gerados utilizando-se diferentes linhagens de células.

Sendo assim, verifica-se que os isolados de sorotipo comum a caninos e humanos estudados apresentaram uma grande variabilidade nos subtipos e presença dos marcadores de virulência estudados, apesar de estarem relacionados geneticamente (mais de 75% de similaridade) a partir do ensaio de RAPD-PCR.

Diversos estudos descrevem a heterogeneidade das aEPEC, tanto na subtipagem de intimina, quanto na sorotipagem dos isolados (VIEIRA et al, 2001; ABE et al, 2009; MOURA et al, 2009), sugerindo que a alta frequência de ocorrência de aEPEC associada à doença diarréica não ocorra devido a um surto originado por um determinado grupo de cepas (ABE et al, 2009).

Gomes e colaboradores (2004) demonstraram que aEPEC dos sorogrupos não-clássicos de EPEC são mais variadas em seus fatores de virulência que as eEPEC dos sorogrupos clássicos. Já que os genes codificadores dos fatores de virulência se localizam em plasmídeos, PAI's, transposons ou bacteriófagos transmissíveis, a emergência de diferentes combinações de sequências genéticas de virulência encontradas nas aEPEC não é surpreendedora. Estas sequências podem ser transferidas horizontalmente para estas cepas no intestino e/ou no ambiente. Em adição, algumas destas cepas são provavelmente tEPEC que

perderam o pEAF ou parte dele, ou EHEC que perderam as sequencias do fago codificador de Stx durante uma infecção (HERNANDES et al, 2009).

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo, em consonância com os objetivos propostos, permitiram elaborar as seguintes conclusões:

- Os isolados de aEPEC estudados apresentaram um perfil de virulência heterogêneo, predominando porém, a ocorrência de maior quantidade de fatores de virulência entre os isolados de origem humana, inclusive quando se compara isolados de mesmo sorotipo proveniente de caninos e humanos;
- A aderência dos isolados aEPEC estudados a células intestinais foi semelhante entre as amostras de origem humana e canina, sendo mais intenso em ensaios de 6 horas e predominantemente com um perfil ALL;
- Os isolados aEPEC de sorotipo comum estudados, provenientes de cães e humanos, apesar de não terem apresentado identidade genética, mostraram-se fortemente relacionados, apresentando-se em um mesmo agrupamento;
- Os isolados aEPEC de origem canina, mesmo que em menor grau, apresentaram perfil genético compatível com virulência tanto animal como humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, C.M.; TRABULSI, L.R.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; DAHBI, G.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; FRANZOLIN, M.R.; TADDEI, C.R.; MARTINEZ, M.B.; PIAZZA, R.M.F.; ELIAS, W. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the *eae*⁺ EAF-negative *stx*⁻ genetic profile. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, 64 (4): 357-365, 2009.

ADU-BOBIE, J., FRANKEL, G., BAIN, C., GONÇALVES, A.G., TRABULSI, L.R., DOUCE, G., KNUTTON, S., DOUGAN, G. Detection of intimins α , β , γ and δ , four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, 36, 662-668, 1998.

AFSET, J.E.; BERGH, K.; BEVANGER, L. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**, 52: 1015-1019, 2003.

AFSET, J.E.; BEVANGER, L.; ROMUNDSTAD, P.; BERGH, K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**, 53: 1137-1144, 2004.

AFSET, J.E.; ANDERSEN, E.; BRUANT, G.; HAREL, J.; WIELER, L.; BERGH, K. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat stable enterotoxin and diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, 46 (7), 2280-2290, 2008.

ALMEIDA, P.M.P. Caracterização Fenotípica e Genotípica de *Escherichia coli* produtora da lesão “attaching and effacing” (AEEC) isoladas de cães na região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2005, 62 f. **Dissertação (Mestrado). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.**

ARMSTRONG, J.S.; GIBBS, A.J.; PEAKALL, R.; WEILLER, G. The RAPDistance Package'. <ftp://life.anu.edu.au/pub/software/RAPDistance> or <http://life.anu.edu.au/molecular/software/rapd.html>, 1994.

BAI, L.; SCHULLER, S.; WHALE, A.; MOUSNIER, A.; MARCHES, O.; WANG, L. OOKA, T.; HEUSCHKEL, R. TORRENTE, F.; KAPER, J.B.; GOMES, T.A.T.; XU, J.; PHILLIPS, A.D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli* O125:H6 triggers attaching and effacing lesions on human intestinal biopsy specimens independently of Nck and TccP/Tccp2. **Infection and Immunity**, 76 (1): 361-368, 2008.

BARDIAU, M.; LABROZZO, S.; MAINIL, J.G. Putative adhesins of Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* of serogroup O26 isolated from humans and cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, 47 (7): 2090-2096, 2009.

BEKAL, S.; BROSSEAU, R.; MASSON, L.; PREFONTAINE, G.; FAIRBROTHER, J.; HAREL, J. Identification of *Escherichia coli* Pathotypes by virulence genes detection with DNA microarrays. **Journal of Clinical Microbiology**, 41 (5): 2113-2125, 2003.

BETANCOR, A.; RUMI, M.V.; GENTILINI, M.V.; SARDOY, C.; IRINO, K.; AGOSTINI, A.; CATALDI, A. Shiga toxin-producing and attaching and effacing *Escherichia coli* in cats and dogs in a high hemolytic uremic syndrome incidence region in Argentina. **FEMS Microbiology Letters**, 267: 251-256, 2007.

BEUTIN, L., PRADA, J., ZIMMERMANN, S., STEPHAN, R., ORSKOV, I., ORSKOV, F. Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene A**. 267 (4): 576-588, 1988.

BEUTIN, L. The different hemolysins of *Escherichia coli*. **Medical Microbiology and Immunology**, 180: 167-182, 1991.

BIELASZEWSKA, M.; MIDDENDORF, B.; KOCK, R.; FRIEDERICH, A.W.; FRUTH, A.; KARCH, H.; SCHMIDT, M.A.; MELLMANN, A. Shiga toxin-negative attaching and effacing *Escherichia coli*: distinct clinical associations with bacterial phylogeny and virulence traits and inferred in-host pathogen evolution. **Clinical Infectious Disease**, 47: 208-217, 2008.

BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, 7:1513-1523, 1979.

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

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; DAHBI, G.; ALONSO, M.P.; MORA, A.; COIRA, M.A.; MADRID, C.; JUÁREZ, A.; BERNÁRDEZ, M.I.; GONÁLEZ, E.A., BLANCO, J. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **International Microbiology** 9: 103-110, 2006b.

BOCZEK, L.A.; JOHNSON, C.H.; RICE, E.W.; KINKLE, B.K. The widespread occurrence of the enterohemolysin *ehlyA* among environmental strains of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, 254: 281-284, 2006.

BOKETE T.N; WHITTAM T.S.; WILSON R.A.; CLAUSEN C.R.; O'CALLAHAN C.M.; MOSELY S.L. Genetic and phenotypic analysis of *Escherichia coli* with enteropathogenic characteristics isolated from Seattle children. **Journal of Infectious Diseases**, 175:1382-1389, 1997.

BRIKUN, I.; SUZIEDELIS, K. & BERG, D. DNA sequence divergence among derivatives of *Escherichia coli* K-12 detected by arbitrary primer PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) fingerprinting. **Journal of Bacteriology**, 176: 1673-1682, 1994.

BUERIS, V.; SIRCILI, M.P.; TADDEI, C.R.; DOS SANTOS, M.F.; FRANZOLIN, M.R.; MARTINEZ, M.B.; FERRER, S.R.; BARRETO, M.L.; TRABULSI, L.R. Detection of diarrhegenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2007.

CEBULA, T.A.; PAYNE, W.L. & FENG, P. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(1):248-250, 1995.

CHINA, B.; GOFFAUX, F.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Comparison of *eae*, *tir*, *espA* and *espB* genes of bovine and human attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex Polymerase Chain Reaction. **FEMS Microbiology Letters**, 178: 177-182, 1999.

CLEARY, J.; LAI, L.; SHAW, R.K.; STRAARMAN-IWANOSKA, A.; DONNENBERG, M.S.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), *EspA* filaments and intimin. **Microbiology**, 150: 527-538, 2004.

CONTRERAS, C.C.; OCHOA, T.J.; LACHER, D.W.; DEBROY, C.; NAVARRO, A.; TALLEDO, M.; DONNENBERG, M.S.; ECKER, L.; GIL, A.I.; LANATA, C.F.; CLEARY, T.G. Allelic variability of critical virulence genes (*eae*, *bfpA* and *perA*) in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in Peruvian children. *Journal of Clinical Microbiology*, 59: 25-31, 2010.

COSTA, J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. **Enfermedades Infecciosas e Microbiología Clínica**, 22(5): 299-305, 2004.

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. **Current Microbiology**, 3: 95-99, 1979.

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

DE RYCKE J.; MILON A.; OSWALD E. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animals pathogens. **Veterinary Research** 30: 221-233; 1999.

DULGUER, M.V.; FABRICOTTI, S.H.; BANDO, S.Y.; MOREIRA-FILHO, C.A.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, C.A. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. **The Journal of Infectious diseases**, 188: 1685-1694, 2003.

ELLIOT, S.J.; WAINWRIGHT, L.A.; McDANIEL, T.K.; JARVIS, K.G.; DENG, Y.; LAI, L.; McNAMARA, B.P.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Molecular Microbiology*, 28 (1): 1-4, 1998.

FRANCO, B.D.G.M. & LANDGRAF, M. In: **Microbiologia dos Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 194 p, 2002.

FRANKE, J.; FRANKE, S.; SCHMIDT, H.; SHWARZKOPF, A.; WIELER, L.H.; BALJER, G.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. **Journal of Clinical Microbiology**, 32 (10): 2460-2463, 1994.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A.D.; ROSENSHINE, I.; DOUGAN, G.; KAPER, J.B.; KNUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Molecular Microbiology**, 30 (5): 911–921, 1998.

FRANZOLIN, M. R.; CAMPOS, L.C. & TRABULSI, L.R. *Escherichia coli* que causa infecções extra-intestinais (Ex-PEC). In: **TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia**, 4^a Ed, Editora Atheneu, 303-309, 2005.

FUJIOKA, M.; KASAI, K.; MIURA, T.; SATO, T; OTOMO, Y. Rapid Diagnostic Method for the Detection of Diarrheagenic *Escherichia coli* by Multiplex PCR. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, 62: 476-480, 2009.

GARMENDIA, J; PHILLIPS, A.D.; CARLIER, M-F; CHONG, Y.; SCHULLER, S.; MARCHES, O.; DAHAN, S.; OSWALD, E.; SHAW, R.K.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. **Cellular Microbiology**, 6 (12), 1167-1183, 2004.

GARMENDIA, J.; REN, Z.; TENNANT, S.; VIEIRA, M.A.M.; CHONG, Y.; WHALE, A.; AZZOPARDI, K.; DAHAN, S.; SIRCILI, M.P.; FRANZOLIN, M.R.; TRABULSI, L.R.; PHILLIPS, A.; GOMES, T.A.T.; XU, J.; ROBINS-BROWNE, R.; FRANKEL, G. Distribution of *tccP* in clinical enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, 43 (11): 5715-5720, 2005.

GARRIDO, P.; BLANCO, M.; MORENO-PAZ, M.; BRIONES, C.; DAHBI, G.; BLANCO, J.; PARRO, V. STEC-EPEC Oligonucleotide Microarray: A New Tool for Typing Genetic Variants of the LEE Pathogenicity Island of Human and Animal Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) and Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Strains. **Clinical Chemistry**, 52 (2): 192–201, 2006.

GIRÃO, D.M. Etiologia da diarreia infantil na região metropolitana do Rio de Janeiro: caracterização de possíveis marcadores de virulência em *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e de uma adesina relacionada ao fenótipo agregativo em amostras que co-expressam AD. **Tese (doutorado). Universidade de São Paulo, USP**, São Paulo, 2007.

GOMES, T.A.T.; IRINO, K.; GIRÃO, V.B.C.; GUTH, B.E.C; VAZ, T.M.I.; MOREIRA, F.C.; CHINARELLI, S.H.; VIEIRA, M.A.M. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? **Emerging Infectious Diseases**, 10: 1851-1855, 2004.

GRIF, K.; KARCH, H.; SCHNEIDER, C.; DASCHNER, F. D.; BEUTIN, L.; CHEASTY, T.; SMITH, H.; ROWE, B.; DIERICH, M. P. & ALLERBERGER, F. Comparative study of five different techniques for epidemiological typing of *Escherichia coli* O157. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, 32: 165-176, 1998.

GUTH, B.E.C.; RAMOS, S.R.T.S.; CERQUEIRA, A.M.F.; ANDRADE, J.R.C.; GOMES, T.A.T. phenotypic and genotypic characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli*

strains isolated from children in São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 97(8): 1085-1089, 2002.

HERNANDES, R.T.; ELIAS, W.P.; VIEIRA, M.A.M.; GOMES, T.A.T. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, 297: 137-149, 2009.

HOPKINS, K.L. & HILTON, A.C. Use of multiple primers in RAPD analysis of clonal organisms provides limited improvement in discrimination. **Bio Techniques**, 30 (6): 1262-1267, 2001.

ISHII, S. ; MEYER, K.P. ; SADOWSKY, J. Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. **Applied and Environmental Microbiology**, 73 (18): 5703-5710, 2007.

JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin Société Vaudoise des Sciences Naturelles**, 37: 547-579, 1901.

JOHNSON, J.R.; JELACIC, S.; SCHOENING, L.M.; CLABOTS, C.; SHAIKH, N.; MOBLEY, H.L.T.; TARR, P. The *irgA* homologue adhesin *Iha* is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. **Infection and Immunity**, 73 (2): 965-971, 2005.

JORES, J. ; ZEHMKE, K. ; EICHBERG, J. ; RUMER, L. ; WIELER, L. Description of a novel Intimin variant (type ζ) in the bovine O84:NM Verotoxin-Producing *Escherichia coli* strain 537/89 and the diagnostic value of Intimin typing. **Experimental Biology and Medicine**, 228 (4): 370-376, 2003.

KAPER, J.B. Defining EPEC. Proceedings of the International Symposium on Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Revista de Microbiologia**, 27 : 130-133, 1996.

KAPER, J. B.; ELLIOT, S.; SPERANDIO, V.; PERNA, N. T.; MAYHEW, G. F. & BLATTNER, F. R. Attaching-and-effacing intestinal histopathology and the locus of enterocyte effacement. In: KAPER, J. B. & O'BRIEN, A. D. (Editors), ***Escherichia coli O157:H7 and other Shiga Toxin-Producing E. coli strains***, ASM Press, Washington, D.C. pp.163-182, 1998.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, 2: 123-140, 2004.

KARMALI, M.A.; MASCARENHAS, M.; SHEN, S.; ZIEBELL, K.; JOHNSON, S.; REID-SMITH, R.; ISAAC-RENTON, J.; CLARK, C.; RAHN, K.; KAPER, J. Association of Genomic O Island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. **Journal of Clinical Microbiology**, 41 (11): 4930-4940, 2003.

KENNY, B.; DEVINNEY, R.; STEIN, M.; REINSCHEID, D. J.; FREY, A. & FINLAY, B. B. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**, 91: 7991-7995, 1997.

KNUTTON, S.; LLOYD, D.R.; McNEISH, A.S. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. **Infection and Immunity**, 55 (1): 69-77, 1987.

KNUTTON, S.; ROSENSHINE, I.; PALLEN, M.J.; NISAN, I.; NEVES, B.C.; BAIN, C.; WOLFF, C.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. A novel espA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. **The EMBO Journal**, 17 (8): 2166-2176, 1998.

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

LACHER, D.W.; STEINSLAND, H.; WHITTAM, T. Allelic subtyping of the intimin locus (*eae*) of pathogenic *Escherichia coli* by fluorescent RFLP. **FEMS Microbiology Letters**, 261: 80-87, 2006.

LE BOUGUENEC, C.; ARCHAMBAUD, M.; LABIGNE, A. rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, 30 (5): 1189-1193, 1992.

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

McDANIEL, T.K., JARVIS, K.G., DONNENBERG, M.S., KAPER, J.B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 92: 1664-1668, 1995.

McDANIEL, T.K., KAPER, J.B. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. **Molecular Microbiology**, 23, 399-407, 1997.

McGRAW, E.; LI, J.; SELANDER, R.K.; WHITTAM, T. Molecular Evolution and Mosaic Structure of α , β , and γ Intimins of Pathogenic *Escherichia coli*. **Molecular Biology and Evolution**, 16 (1): 12-22, 1999.

MENDEZ-ALVAREZ, S. & PÉREZ-ROTH, E. La PCR múltiple en microbiología clínica. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 22(3): 183-92, 2004.

MOHAMED, J.A.; HUANG, D.B.; JIANG, Z.D.; DUPONT, H.L.; NATARO, J.P.; BELKIND-GERSON, J.; OKHUYSEN, P.C. Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. **Journal of Clinical Microbiology**, 45 (1): 121-126, 2007.

MORABITO, S.; DELL'OMO, G.; AGRIMI, U.; SCHMIDT, H.; KARCH, H.; CHEASTY, T.; CAPRIOLI, A. Detection and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. **Veterinary Microbiology**, 82: 275-283, 2001.

MORABITO, S.; TOZZOLI, R.; OSWALD, E.; CAPRIOLI, A. A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of *Escherichia coli* O157:H7 is frequently present in attaching and effacing *E. coli*. **Infection and Immunity**, 71 (6): 3343-3348, 2003.

MOREIRA, F.C.; VIEIRA, M.A.M.; FERREIRA, A.J.; GIRÃO, D.M.; VAZ, T.M.I.; ROSA, A.C.P.; KNOBL, T.; IRINO, K.; FREYMULLER, E.; GOMES, T.A.T. *Escherichia coli* strains of serotype O51:H40 comprise typical and atypical enteropathogenic *E. coli* strains and are potentially diarrheagenic. **Journal of Clinical Microbiology**, 46 (4): 1461-1465, 2008.

MORENO, A.C.R.; FILHO, A.F.; GOMES, T.A.T.; RAMOS, S.T.S.; MONTEMOR, L.P.G.; TAVARES, V.C.; FILHO, L.S.; IRINO, K.; MARTINEZ, M.B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases** 66: 55-57, 2010.

MOURA, R.A.; SIRCILI, M.P.; LEOMIL, L.; MATTÉ, M.H.; TRABULSI, L.R.; ELIAS, W.P.; IRINO, K.; PESTANA DE CASTRO, A.F. Clonal Relationship among Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. **Applied and Environmental Microbiology**, 75 (23): 7399-7408, 2009.

MUNNICH, A.; LUBKE-BECKER, A. *Escherichia coli* infections in newborn puppies - clinical and epidemiological investigations. **Theriogenology**, 62: 562-575, 2004.

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

NATARO, J. P. & KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, 11: 142-201, 1998.

NICHOLLS, L.; GRANT, T.H. & ROBINS-BROWNE, R.M. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. **Molecular Microbiology**, 35: 275-288, 2000.

OGURA, Y.; OOKA, T.; WHALE, A.; GARMENDIA, J.; BEUTIN, L.; TENNANT, S.; KRAUSE, G.; MORABITO, S.; CHINEN, I.; TOBE, T.; ABE, H.; TOZZOLI, R.; CAPRIOLI, A.; RIVAS, M.; ROBBINS-BROWNE, R.; HAYASHI, T. and FRANKEL, G. TccP2 of O157:H7 and non-enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): Challenging the dogma of EHEC-Induced Actin Polymerization. **Infection and Immunity**, 75 (2): 604-612, 2007.

OOKA, T.; VIEIRA, M.A.M.; OGURA, Y.; BEUTIN, L.; LA RAGIONE, R.; VAN DIEMEN, P.M.; STEVENS, M.P.; AKTAN, I.; CAWTHRAW, S.; BEST, A.; HERNANDES, R.T.; KRAUSE, G.; GOMES, T.A.T.; HAYASHI, T. and FRANKEL, G. Characterization of *tccP2* carried by atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Reviews**, 271: 126-135, 2007.

- OSWALD, E., SCHMIDT, H., MORABITO, S., KARCH, H., MARCHÉS, O., CAPRIOLI, O. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. **Infection and Immunity**, 68, 64-71, 2000.
- PACHECO, A. B. F.; GUTH, B. E. C.; SOARES, K. C. C.; NISHIMURA, L.; ALMEIDA, D. F. & FERREIRA, L. C. S. Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. **Journal of Clinical Microbiology**, 35: 1521-1525, 1997.
- PATON, J. C. & PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, 11: 450-479, 1998.
- PINTO, M.; ROBINE-LEON, S.; APPAY, M. D.; KEDINGER, M.; TRIADOU, N.; DUSSAULX, E.; LACROIX, B.; SIMON-ASSMANN, P.; HAFFEN, K.; FOGH, J. & ZWEIBAUM, A. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. **Biology of the Cell**, 47: 323-330, 1983.
- PRAGER, R.; FRUTH, A.; SIEWERT, U.; STRUTZ, U., TSCHAPE, HELMUT. *Escherichia coli* encoding Shiga toxin 2f as an emerging human pathogen. **International Journal of Medical Microbiology**, 9 (5): 343-353, 2009.
- REGUA-MANGIA, A.H; GOMES, T.A.T.; VIEIRA, M.A.M.; IRINO, K.; TEIXEIRA, L.M. Molecular typing and virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhea in Rio de Janeiro city, Brasil. **Journal of Medical Microbiology**, 58: 414-422, 2009.
- RILEY, L.W., S.T., GUNZBURG, N.G., TORNIEPORTH. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. **Journal of Clinical Microbiology**, 33, 1375-1377, 1995.
- RODRIGUES, J.; THOMAZINI, C.M.; MORELLI, A.; BATISTA, G.C. Reduced etiological role for enteropathogenic *Escherichia coli* in cases of diarrhea in Brazilian infants. **Journal of Clinical Microbiology**, 42 (1): 398-400, 2004a.
- RODRIGUES, J.; THOMAZINI, C.M.; LOPES, C.A.M.; DANTAS, L.O. Concurrent infection in a dog and colonization in a child with a human enteropathogenic *Escherichia coli* clone. **Journal of Clinical Microbiology**, 42 (3): 1388-1389, 2004b.
- RUTTLER, M.E.; YANZON, C.S.; CUITINO, M.J.; RENNA, M.F.; PIZARRO, M.A.; ORTIZ, A.M. Evaluation of a Multiplex PCR method to detect enteroaggregative *Escherichia coli*. **Biocell**, 30 (2): 301-308, 2006.
- SAIER, M.H. evolution of bacterial type III protein secretion systems. **Trends in Microbiology**, 12 (3): 113-115, 2004.
- SAVARINO, S. J.; MCVEIGH, A.; WATSON, J.; MOLINA, J.; CRAVIOTO, A.; ECHEVERRIA, P.; BHAN, M. K.; LEVINE, M. M. & FASANO, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**, 173: 1019-1022, 1996.

SCALETSKY, I.C.A.; ARANDA, K.R.S.; SOUZA, T.B.; SILVA, N.P.; MORAIS, M.B. Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, 47 (11): 3756-3759, 2009.

SCALETSKY, I.C.A.; ARANDA, K.R.S.; SOUZA, T.B.; SILVA, N.P. Adherence factors in atypical *Escherichia coli* strains expressing the localized adherence-like pattern in Hep2 cells. **Journal of Clinical Microbiology**, 48 (1): 302-306, 2010.

SCHMIDT, H.; ZHANG, W.L.; HEMMRICH, U.; JELACIC, S.; BRUNDER, W.; TARR, P.I.; DOBRINDT, U.; HACKER, J.; KARCH, H. Identification and characterization of a novel genomic island integrated at *Selc* in locus of Enterocyte Effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, 69 (11): 6863-6873, 2001.

SCHROEDER, C.M.; MENG, J.; ZHAO, S.; DEBROY, C.; TORCOLINI, J.; ZHAO, C.; McDERMOTT, P.F.; WAGNER, D.D.; WALKER, R.D.; WHITE, D.G. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O26, O103, O111, O128, and O145 from animals and humans. **Emerging Infectious Diseases** 8(12): 1409-1414, 2002.

SCOTLAND S.M.; SMITH H.R.; CHEASTY T.; SAID B.; WILLSHAW G.A.; STOKES N. Use of gene probes and adhesion tests to characterize *Escherichia coli* belonging to enteropathogenic serogroups isolated in the United Kingdom. **Journal of Medical Microbiology** 44: 438-43, 1996.

SOKURENKO, E.V.; CHESNOKOVA, V.; DYKHUIZEN, D.E.; OFEK, I.; WU, X.; KROGFELT, K.A.; STRUVE, C.; SCHEMBRI, M.A.; HASTY, D.L. Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural variation of the FimH adhesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 95: 8922-8926, 1998.

SPERANDIO, V.; KAPER, J.B.; BORTOLINI, M.R.; NEVES, B.C.; KELLER, R.; TRABULSI, L.R. Characterization of the locus of Enterocyte Effacement (LEE) in different enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, 164: 133-139, 1998.

STARCIC, M.; JOHNSON, J.R.; STELL, A.L.; VAN DER GOOT, J.; HENDRIKS, H.G.C.J.M.; VAN VORSTENBOSCH, C.; VAN DIJK, L.; GAASTRA, W. Haemolytic *Escherichia coli* isolated from dogs with diarrhea have characteristics of both uropathogenic and necrotoxic strains. **Veterinary Microbiology**, 85: 361-377, 2002.

STEWART, D.S., TORTORELLO, M.L. & GENDEL, M.S. Evaluation of DNA preparation techniques for detection of the SLT-1 gene of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces using the polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, 26: 93-97, 1998.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. & N. KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 (MEGA1.02). *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599, 1994.

Download In: <http://www.megasoftware.net/mega.html>

TARR, P. I.; BILGE, S.S.; VARY JR, J.C.; JELACIC, S.; HABEEB, R.L.; WARD, T.R.; BAYLOR, M.R.; BESSER, T. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. **Infection and Immunity**, 68 (3): 1400-1407, 2000.

TARR, C.L. & WHITTAM, T.S. Molecular Evolution of the intimin gene in O111 clones of Pathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, 184: 479-487, 2002.

TAVECHIO, A.T.; MARQUES, L.R.M.; ABE, C.M.; GOMES, T.A.T. Detection of cytotoxic necrotizing factor types 1 and 2 among fecal *Escherichia coli* isolates from Brazilian children with and without diarrhea. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 99 (1): 81-83, 2004.

TOMA, C.; LU, Y.; HIGA, N.; NAKASONE, N.; CHINEN, I.; BASCHKIER, A.; RIVAS, M.; IWANAGA, M. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, 41 (6), 2669–2671, 2003.

TORRES, A.G.; GIRON, J.A.; PERNA, N.T.; BURLAND, V.; BLATTNER, F.R.; AVELINO-FLORES, F.; KAPER, J. Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infection and Immunity**, 70 (10): 5416-5427, 2002

TORRES, A.G.; ZHOU, G.; KAPER, J.B. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. **Infection and Immunity**, 73: 18-29, 2005.

TORRES, A.G.; BLANCO, M.; VALENZUELA, P.; SLATER, T.M.; PATEL, S.P.; DAHBI, G.; LÓPEZ, C.; BARRIGA, X.F., BLANCO, J.; GOMES, T.A.T.; VIDAL, R.; BLANCO, J. Genes related to long polar fimbriae os pathogenic *Escherichia coli* strains as reliable markers to identify virulent isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, 47 (8): 2442-2451, 2009.

TRABULSI, L.R.; KELLER, R.; GOMES, TAT. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**. 8 (5), 2002.

TRABULSI, L.R.; ORDOÑEZ, J.G.; MARTINEZ, M.B. Enterobacteriaceae. **In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia**, 4ª Ed, Editora Atheneu, 269-276, 2005.

TRABULSI, L.R. & ORDOÑEZ, J.G.. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). **In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia**, 4ª Ed, Editora Atheneu, 277-283, 2005.

USEIN, C.R.; DAMIAN, M.; TATU-CHITOIU, D.; CAPUSA, C.; FAGARAS, R.; TUDORACHE, D.; NICA, M.; LE BOUGUENEC, C. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Romanian adult urinary tract infection cases. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 5 (3): 303-310, 2001.

VAZ, T.M.I.; IRINO, K.; KATO, M.A.M.F.; DIAS, A.M.G.; GOMES, T.A.T.; MEDEIROS, M.I.C.; ROCHA, M.M.M.; GUTH, B.E.C. virulence properties and characteristics of shiga

toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, 42 (2): 903–905, 2004.

VIEIRA, M.A.M.; ANDRADE, J.R.C.; TRABULSI, L.R.; DIAS, A.M.G.; RAMOS, S.R.T.S.; FRANKEL, G.; GOMES, T.A.T. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) serogroups that carry *eae* and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. **Journal of Infectious Diseases**, 183:762–772, 2001.

WALES, A.D.; WOODWARD, M.J.; PEARSON, G.R. Attaching-effacing bacteria in animals. **Journal of Comparative Pathology**, 132: 1-26, 2005.

WANG, G., CLARK, C. G., RODGERS, F. G. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga Toxin family by Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology** 40: 3613-3619, 2002.

WHALE, A.D.; GARMENDIA, J.; GOMES, T.A.; FRANKEL, G. A novel category of enteropathogenic *Escherichia coli* simultaneously utilizes the Nck and TccP pathways to induce actin remodeling. **Cellular Microbiology**, 8 (6): 999-1008, 2006.

WHALE, A.D.; HERNANDES, R.T.; OOKA, T.; BEUTIN, L.; SCHULLER, S.; GARMENDIA, J.; CROWTHER, L.; VIEIRA, M.A.M.; OGURA, Y.; KRAUSE, G.; PHILLIPS, A.D.; GOMES, T.A.T.; HAYASHI, T.; FRANKEL, G. TccP-2-mediated subversion of actin dynamics by EPEC 2 – a distinct evolutionary lineage of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology**. 153: 1743-1755, 2007.

WIELER, L.H.; MCDANIEL, T.K.; WHITTAM, T.S.; KAPER, J.B. Insertion site of locus of enterocyte effacement in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* differs in relation to the clonal phylogeny of strains. **FEMS Microbiology Letters**, 156: 49-53, 1997.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAC, K. J.; RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18: 6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; HANAFEY, M. K.; RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, 218: 704-741, 1993.

YAMAMOTO, T. & ECHEVERRIA, P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* Heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. **Infection and Immunity**, 64 (4): 1441-1445, 1996.

YAMAMOTO S. Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 13: 68-73, 2007.

YAN, F.; POLK, D.B. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. **Current Opinion in Gastroenterology**, 20: 565–571, 2004.

YATSUYANAGI, J.; SAITO, S.; MIYAJIMA, Y.; AMANO, K.I.; ENOMOTO, K. Characterization of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains Harboring the astA Gene That Were Associated with a Waterborne Outbreak of Diarrhea in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, 41 (5): 2033-2039, 2003.

YUSTE, M.; DE LA FUENTE, R.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; CID, D.; ORDEN, J.A. Detection of the *astA* (EAST1) gene in Attaching and Effacing *Escherichia coli* from Ruminants. **Journal of Veterinary Medicine. Series B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, 53: 75–77, 2006.

ZHANG, W.L.; KOHLER, B.; OSWALD, E.; BEUTIN, L.; KARCH, H.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A.; SUERBAUM, S.; SCHMIDT, H. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, 40 (12): 4486-4492, 2002.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)